

# Procjena genotoksičnosti i citotoksičnosti dentalnih implantata na gingivnim epitelnim stanicama

---

**Radović, Mirna**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:238174>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-31**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mirna Radović**

**PROCJENA GENOTOKSIČNOSTI I CITOTOKSIČNOSTI DENTALNIH  
IMPLANTATA NA GINGIVNIM EPITELNIM STANICAMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2019./2020.**

**Mentorica:**

**doc. dr. sc. Antonija Tadin**

**Split, srpanj 2020.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mirna Radović**

**PROCJENA GENOTOKSIČNOSTI I CITOTOKSIČNOSTI DENTALNIH  
IMPLANTATA NA GINGIVNIM EPITELNIM STANICAMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2019./2020.**

**Mentorica:**

**doc. dr. sc. Antonija Tadin**

**Split, srpanj 2020.**

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Materijali koji se koriste za izradu dentalnih implantata.....	3
1.2. Biokompatibilnost dentalnih implantata.....	7
1.3. Mikronukleus test .....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	16
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA .....	18
3.1. Ispitanici .....	19
3.2. Materijali i kirurški postupak .....	20
3.3. Uzorkovanje stanica i mikronukleus test.....	21
3.4. Statistička obrada podataka .....	22
4. REZULTATI .....	24
4.1. Višestruka regresijska analiza .....	28
5. RASPRAVA.....	32
6. ZAKLJUČCI .....	37
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	39
8. SAŽETAK.....	48
9. SUMMARY .....	50
10. ŽIVOTOPIS .....	52

*Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Antoniji Tadin na uloženom trudu, strpljivoj pomoći, stručnim i životnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada, ali i tijekom cijeloga studiranja.*

*Hvala svim mojim nastavnicima i profesorima koji su me pratili u obrazovanju na prenesenom znanju, pruženoj podršci i motivaciji za rad.*

*Najveću zahvalnost, pak, dugujem svojoj obitelji koja mi je izvor neizmjerne ljubavi i podrška u svakom koraku u životu. Hvala vam što ste bezuvjetno vjerovali u mene i poticali me u ostvarenju mojih ciljeva.*

## **1. UVOD**

Ljudska želja i potreba za nadoknadom jednog ili više zuba koji nedostaju seže u daleku prošlost. Sredstva koja se danas koriste za ponovno ostvarivanje funkcionalne i estetske cjeline ljudskog zubala su dentalni implantati. Oni su prešli dugačak razvojni put do oblika u kojem ih danas poznajemo. Čak i stari Egipćani spominju ligaturu od zlata koju koriste za učvršćivanje paradontno kompromitiranih zubi 2500 godina prije Krista. Pripadnici majske civilizacije su oko 600. godine u dentalne alveole ugrađivali replike zubi izrađenih od školjki za što su pronađeni i dijelovi takvih čeljusti kao dokaz. U Francuskoj je nedavno pronađena ljudska lubanja stara 2000 godina s ugrađenim implantatima od lijevanog željeza što nam je važan pokazatelj i potvrda kako je dentalna implantologija jedna od najstarijih grana stomatologije koju su poznavali i naši davni pretci (1,2).

Temelje moderne implantologije postavio je švedski anatom i profesor I. P. Brånemark čija istraživanja počinju 50-ih godina 20. stoljeća. On je, istražujući procese cijeljenja kosti, postavio titanske naprave u fibule zečeva kako bi pratio cijeljenje, a kada je naprave za nekoliko mjeseci trebalo izvaditi, primijetio je da se kost čvrsto vezala za materijal. Taj fenomen, za koji danas znamo da je preduvjet svake uspješne implantološke terapije, Brånemark je nazvao oseointegracijom. Godine 1965. ugradio je prvi titanski dentalni implantat *in vivo* na pacijentu, a na konferenciji u Torontu 1982. struka na temelju njegovih dugogodišnjih uspješnih rezultata donosi smjernice za implantologiju čime počinje standardizacija samog zahvata i komercijalni uzlet (3).

Dentalni implantat protetski je nadomjestak za korijen nedostajućeg zuba izrađen od aloplastičnog materijala, tj. nežive tvari. Kirurškim zahvatom umeće se u čeljust s ciljem ostvarivanja oseointegracije, što je pojam kojim je Brånemark nazvao vezu implantata i kosti s histološkog aspekta, gdje zatim služi kao sidro i potpora fiksnom ili mobilnom protetskom radu (4). Uz sam implantat usko je vezan i abutment, odnosno struktura koja spaja implantat i protetski rad koji zamjenjuje krunu zuba, a za razliku od samog implantata koji je u kosti, abutment je vidljiv i iznad razine gingive. Na implantat se pričvršćuje vijkom, a na protetski rad privremenim ili trajnim cementom ili također vijkom (5). Prijelazna struktura koja se koristi u implantološkoj terapiji nakon oseointegracije ili kad je oseointegracija skoro gotova, jest gingiva former koji služi modeliranju gingive kako bi se postigla idealna estetika mekih tkiva i dobio dobar izlazni profil, odnosno privid da umjetni zub izlazi iz gingive baš kao i

prirodni zub. Tada je, zbog prerastanja gingive preko implantata u procesu cijeljenja, potreban drugi kirurški zahvat „otvaranja“ implantata kako bi se mogao postaviti gingiva former. U nekim slučajevima, kad je primarna stabilnost implantata zadovoljavajuća, (između 25 i 35 Ncm) može se postaviti odmah nakon zahvata (6).

Svrha implantološke, odnosno implantoprotetske terapije jest omogućiti pacijentu zamjenu za izgubljene zube kako bi mu vratili pravilnu funkciju, estetiku i fonaciju te ponovno ostvarili stabilnost i cjelovitost žvačnog sustava (7).

Današnji intenzivan tehnološki napredak u području cijele stomatologije, a posebice u granama implantologije i implantoprotetike, omogućio je postavljanje implantata čak i u klinički najzahtjevnijim i najizazovnijim slučajevima, a sve zahvaljujući brojnim vrstama i sustavima implantata trenutačno dostupnih na tržištu, kao i dodatnim potpornim terapijskim zahvatima.

### 1.1. Materijali koji se koriste za izradu dentalnih implantata

Materijali koji se koriste za proizvodnju dentalnih implantata pripadaju skupini aloplastičnih, tj. neživih. Takve materijale koje unosimo u biološku sredinu sa svrhom postizanja interaktivne veze sa živom okolinom nazivamo biomaterijalima. Temeljni preduvjet za sve biomaterijale, pa time i za dentalne implantate, jest da budu neškodljivi lokalno i sistemski. To znači da materijal ne smije izazvati niti jednu neželjenu reakciju žive okoline (8).

Osnovna svojstva materijala dentalnih implantata možemo podijeliti na biološka, kemijska i mehanička. Što se tiče bioloških svojstava, osnovni zahtjev koji materijal mora ispuniti je biokompatibilnost, odnosno da ne djeluje štetno na organizam lokalno ni sistemski. Nadalje, materijal ne smije biti toksičan, kancerogen, radioaktivan, niti izazivati alergijsku ni upalnu reakciju u živoj okolini. Od kemijskih svojstava moraju posjedovati inertnost, netopljivost i otpornost na koroziju, a od mehaničkih su važni: čvrstoća, elastičnost slična ljudskoj kosti i otpornost na lom (8, 9). Sva spomenuta svojstva utječu na mikrostrukturu implantata, sastav površine te oblik dizajna, a sve zajedno do sad spomenuto određuje klinički ishod i uspjeh terapije (8).



S kemijskog gledišta materijale korištene u implantologiji prema gradivnom materijalu dijelimo na: metalne, keramičke i polimerne (Tablica 1) (9).

Tablica 1. Materijali koji se koriste u implantologiji

<b>Materijal implantata</b>	<b>Naziv ili skraćeni naziv</b>
<b>I. Metali</b>	
Titan	CpTi
	Ti-6Al-4V ekstra niski intersticijalni elementi (ELI)
	Ti-6Al-4V
Titanijeve legure	Ti-6Al-7Nb
	Ti-5Al-2.5Fe
	Ti-15 Zr-4Nb-2Ta-0.2Pd
	Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr
Nehrđajući čelik	SS, 316 LSS
Kobalt-krom legure	Vitallium, Co-Cr-Mo
Zlatne legure	Au legure
Tantal	Ta
<b>II. Keramika</b>	
Glinica (alumina)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , polikristalna glinica ili monokristalni safir
Hidroksiapatit	HA, Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>10</sub> , (OH) <sub>2</sub>
β-trikalcij-fosfat	β-TCP, Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
	C
Ugljik	Staklasti ugljik
	Izotropni ugljik niske temperature (LTI)
	Izotropni ugljik ultra niske temperature (ULTI)
Silicijev karbid	Si-C
Biostaklo	SiO <sub>2</sub> /CaO/Na <sub>2</sub> O/P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Cirkonij	ZrO <sub>2</sub>
Cirkonij ojačan glinicom	ZTA
<b>III. Polimeri</b>	
Polimetilmetakrilat	PMMA
Politetrafluoretilen	PTFE
Polietylen	PE
Polisulfon	PSF
Poliuretani	PU
Preuzeto i prilagođeno iz: (9).	

Metali koji se koriste za izradu implantata su: titan (Ti) i titanove legure, nehrđajući čelik (uz dodatak 18 % kroma i 8 % nikla), kobalt – krom – molibden (Co-Cr-Mo) legura (63 % kobalta, 30 % kroma, 5 % molibdena uz dodatak magnezija, ugljika i nikla) i tantal (Ta), dok se zlatne (Au) legure koriste za izradu abutmenta. (9).

Titan je metal srebrnobijele boje koji se u implantologiji uspješno koristi za izradu implantata zadnjih pedesetak godina i to nakon otkrića švedskog znanstvenika Brånemarka da oseointegrira. Od tada pa sve do danas titanski implantati smatraju se zlatnim standardom u implantologiji. Titan je biološki inertan i ima visoku otpornost na koroziju zbog sklonosti spontanom stvaranju sloja titanovog dioksida ( $\text{TiO}_2$ ) na površini koji ga na taj način odvaja od okoline. Debljina ovog oksidnog sloja iznosi od 3 do 10 nm i upravo je on ključan u mehanizmu oseointegracije koji se temelji na vezivanju nekoliko vrsta titan-oksida s proteinima i kolagenom biološke sredine. Stabilnost samog oksidnog sloja ovisi o strukturi i njegovoj debljini i on je taj koji osigurava titanu i njegovim legurama tako dobru biokompatibilnost za dentalne implantate. Pasivni film koji nastaje na titanu smatra se stabilnim čak i u biološkom sustavu usne šupljine (5, 10).

Kao glavni nedostatak titana smatra se njegova neestetska, sivkasta boja koja naročito predstavlja problem ako dođe do retrakcije gingive prilikom implantacije u prednjem segmentu maksile, odnosno estetskoj zoni te moguća preosjetljivost na titan kod nekih pacijenata (11). Također, istraživanja na glodavcima dokazala su nakupljanje čestica  $\text{TiO}_2$  u limfnim čvorovima, jetri i bubrezima, dok se u zadnje vrijeme intenzivno prati i već je dokazan toksičan učinak istih čestica na središnji živčani sustav štakora (12-14).

Prema Američkom društvu za ispitivanje i materijale (*American Society for Testing and Materials* - ASTM), postoji šest različitih vrsta titana pogodnih kao biomaterijali za implantate. Među tih šest materijala, četiri su razreda komercijalno čistog titana (*commercially pure titanium* (CpTi)) i dvije su slitine titana (Ti). Komercijalno čisti titanski materijali nazivaju se čistim titanom razreda 1, 2, 3 i 4, a podjela je nastala s obzirom na otpornost na koroziju, stupanj žilavosti, tj. duktilnosti (sposobnost materijala da plastičnom deformacijom razgradi naprezanja i na taj način povisi otpornost materijala na krhki lom) i čvrstoću. CpTi razreda 1. ima najveću čvrstoću, najveću otpornost na koroziju, najveću mogućnost oblikovanja i najnižu čvrstoću, dok razred 4. nudi najveću čvrstoću i umjerenu mogućnost oblikovanja. Većina dentalnih implantata izrađena je od cpTi razreda 4. jer je

čvršći od ostalih razreda. Komercijalno čisti titan naziva se još i nelegirani titan, a može sadržavati i neke elemente u tragovima kao što su: ugljik, kisik, dušik i željezo koji značajno poboljšavaju mehanička svojstva čistog titana. Njihov udio raste od 1. do 4. razreda (9).

Dvije legure titana su Ti-6Al-4V i Ti-6Al-4V-ELI (ekstra niska međuprostorna legura). Specifična legura koja se koristi jest legura titana razreda 5. koja ima veću čvrstoću i dinamičku čvrstoću (najveće dinamičko naprezanje koje materijal pri određenom broju promjena opterećenja može podnijeti, a da ne dođe do loma) nego čisti titan. Legura razreda 5., oznake Ti6Al4V, ima kemijski sastav od 6 % aluminija, 4 % vanadijuma, 0,25 % (maksimalno) željeza, 0,2 % (maksimalno) kisika i 90 % titana. CpTi ima ograničena mehanička svojstva, stoga kada su potrebne dobre mehaničke karakteristike, kao u stražnjim dijelovima čeljusti gdje su velike žvačne sile, prednost kao materijal ima legura Ti6Al4V. Zbog istraživanja koja su dokazala toksičnost vanadijuma, razvijene su legure bez vanadijuma, Ti-6Al-7Nb i Ti-5Al-2.5Fe. Također, zbog zabrinutosti u vezi toksičnosti ne samo vanadijuma, već i aluminija, legure s netoksičnim elementima, poput niobija (Nb), tantala (Ta), cirkonija (Zr) i paladija (Pd), su u fazi izrade (5, 9).

Još od Brånemarkova vremena, pa do danas, titan i njegove legure materijali su koji predstavljaju standard u izradbi dentalnih implantata, međutim, zadnjih nekoliko godina keramički materijali poput cirkonij oksida postaju sve popularnija alternativa budući da estetska očekivanja pacijenata sve više rastu.

Keramički materijali su prvotno u implantologiju uvedeni kao premazi na metalnim, odnosno titanskim implantatima kako bi poboljšali proces oseointegracije. Premazi mogu biti gusti ili porozni, debljine u rasponu od 1 do 100  $\mu\text{m}$ , ovisno o primijenjenoj metodi oblaganja. Međutim, cirkonij oksidna keramika ( $\text{ZrO}_2$ ), poznatija i kao Zirconia, zbog svojih se odličnih mehaničkih svojstava, otpornosti na koroziju i trošenje te biokompatibilnosti danas sve više koristi kao materijal za izradu implantata te predstavlja optimalnu zamjenu za titan. Istraživanja su dokazala da ima koštanu integraciju usporedivu s titanom, dok uzrokuje jednako ili čak bolje cijeljenje periimplantantnih mekih tkiva od titana, stvara manje upalnog infiltrata i prikuplja manje plaka na površini od čistog titana. Jedna od najvažnijih prednosti u usporedbi s titanom, a i metalnim implantatima općenito, jest u tome što u sastavu nema metala, stoga predstavlja alternativu titanskim implantatima kod ispitanika koji imaju preosjetljivost na titan. Također, posjeduje odlična estetska svojstva na račun bijele boje i

sličnosti zubu (9). Ipak, postoje istraživanja koja dokazuju veću incidenciju loma, tj. pucanja abutmenta od Zirconija u usporedni s metalnim abutmentima (15).

Ostali keramički materijali još uvijek služe kao premazi, dok se hidroksiapatit i  $\beta$ -trikalcij-fosfat koriste i kao materijali za nadogradnju kosti. Ugljični spojevi često se klasificiraju kao keramika zbog kemijske inertnosti i nedostatka duktilnosti, odnosno sposobnosti da podnesu plastičnu deformaciju bez loma (5).

Iako polimeri kao materijali još nisu zaživjeli u implantologiji, najviše zbog lošijih mehaničkih svojstava u usporedbi s ostalim korištenim materijalima, posljednjih se godina dosta istražuju i razvijaju kao materijali, najviše zbog dugogodišnjeg iskustva s kompozitima, biokompatibilnosti i ekonomske isplativosti. Implantati od polietereeterketon (PEEK) već postoje, međutim još nisu u kliničkoj uporabi (16).

## 1.2. Biokompatibilnost dentalnih implantata

Biokompatibilnost je svojstvo materijala da ostvari svoju svrhu uz odgovarajući odgovor domaćina u odnosu na stvarnu primjenu (17). Podrazumijeva harmonično međudjelovanje između domaćina, materijala i očekivane funkcije materijala. Idealan dentalni materijal korišten u usnoj šupljini trebao bi biti neškodljiv za sva oralna tkiva: oralnu sluznicu, gingivu, pulpu i kost. Ne smije sadržavati toksične, topive i raspršive tvari koje mogu biti apsorbirane u krvožilni sustav uzrokujući time sustavni odgovor, uključujući teratogene i kancerogene efekte. Također, materijal ne smije sadržavati agense koji mogu izazvati senzibilizaciju i alergijski odgovor kod senzibiliziranog pacijenta (18). Testovi za provjeru biokompatibilnosti materijala moraju zadovoljiti ISO 10993 standard koji se koristi za provjeru biokompatibilnosti svih medicinskih uređaja i naprava u Europi, SAD-u i Aziji, dok Američka agencija za hranu i lijekove FDA često traži dodatne testove. Ovisno o nekoliko čimbenika, kao što su vremenska duljina kontakta naprave s tkivom, vrsta tkiva koje je u kontaktu, način na koji će se uređaj, tj. naprava koristiti, hoće li se implantirati itd. ISO 10993 zahtijeva provedbu testova citotoksičnosti, senzibilizacije, iritacije, akutne sistemske toksičnosti, subkronične toksičnosti, genotoksičnosti, testa implantacije, kronične toksičnosti i kancerogenosti (19). Uobičajno je da se prvo provode *in vitro* testovi citotoksičnosti na

kulturama stanica, a zatim *in vivo* testovi senzibilizacije, implantacije i iritacija oralne sluznice nakon čega slijede pretklinički testovi (20). Ako materijal uspješno prođe navedene testove, može biti testiran na ljudima u kliničkim uvjetima, gdje se ocjenjuje njegovo zadovoljavanje funkcionalnosti te se prate sve povoljne i nepovoljne reakcije koje se mogu pojaviti za to vrijeme (21).

Najvažnije odrednice biokompatibilnosti, koje jedan dentalni implant mora zadovoljiti, jesu da nije citotoksičan, genotoksičan, kancerogen ni mutagen (8). Citotoksičnost je svojstvo određene tvari, odnosno materijala da uzrokuje staničnu smrt, procesom apoptoze ili nekroze stanica. Testovi citotoksičnosti provode se *in vitro* na kulturama stanica gdje se bilježe morfološka oštećenja stanica, rast stanica te prate promjene staničnog metabolizma (22). Genotoksičnost je svojstvo određene tvari, odnosno materijala da uzrokuje oštećenje genskog materijala, tj. deoksiribonukleinske kiseline (DNK) stanice, a da pritom ne mora doći do prijenosa genskog oštećenja na sljedeću generaciju stanica (23). Međutim, ako dođe do prijenosa genetske štete na sljedeće generacije stanica, govorimo o svojstvu mutagenosti. Mutagenost može biti i pokazatelj moguće kancerogenosti tvari koja je oštetila DNK. Nekoliko mutacija može dovesti do toga da mutagena tvar postane kancerogena (24).

Čimbenici koji utječe na biokompatibilnost implantata uključuju kemijska, mehanička, električna i specifična svojstva površine (16).

Glavno kemijsko svojstvo koje određuje biokompatibilnost implantata je korozija. Korozija se definira kao gubitak metalnih iona iz površine metala u okolno okruženje. Postoje tri osnovne vrste korozije: opća korozija, korozija nastala odnošenjem metala s vanjske površine (pitting) i pukotinska korozija. Opća korozija predstavlja ravnomjerno djelovanje korozije na metalnu površinu ili na površinu legure. Može se spriječiti odabirom otpornije vrste materijala ili primjenom posebnih boja, metalnih premaza i katodnom zaštitom.

Korozija nastala odnošenjem metala s vanjske površine (pitting) lokalnog je karaktera i događa se uslijed degradacije pasivne površine metala. Predstavlja ozbiljan oblik propadanja materijala zato što je iznimno teško predvidjeti težinu i opseg utjecaja korozije. Pukotinska korozija je oblik lokalizirane korozije koji nastaje zbog geometrije materijala (nastala zavarivanjem ili na spoju) kada je metalni materijal u kontaktu s nemetalnim materijalom ili zbog naslaga nakupljenih na površini metala (16).

Mehanička svojstva koja imaju utjecaj na biomaterijale od kojih se proizvode implantati su: modul elastičnosti, vlačna čvrstoća, tlačna čvrstoća, istežljivost te specifična svojstva odabranog metala. Među električna svojstva ubrajaju se: površinska energija, površinski naboj i sastav površine koji se optimiziraju u cilju poboljšanja kontakta kosti i implantata. Specifična fizikalno-kemijska svojstva i nanostrukturiranje površine implantata presudni su za adheziju, diferencijaciju i pravilno funkcioniranje koštanih stanica oko implantata. Stoga, kako bi se poboljšao proces osteintegracije, implantatima se na različite načine modificira površina (16).

Tehnike modificiranja površine implantata dijele se na aditivne i ablativne tehnike (8). Ablativne tehnike reduciraju površinski materijal stvarajući pore i među njima izdvajamo: hrapavljenje jetkanjem, pjeskarenjem, anodizacijom, kugličarenjem i laserom. Postižu povećanje površine implantata i poboljšanje oseointegracije (25, 26). Među aditivnim tehnikama, kao najkorišteniju, treba spomenuti raspršivanje plazmom kojom se dodavanjem zagrijanih čestica titana ili hidroksiapatita pod velikom brzinom dobiva porozna površina implantata (27).

U posljednje vrijeme pojavile su se nedoumice oko mogućnosti da titan izazove neželjenu reakciju domaćina. Za sada su dokazi o tome ograničeni na prikaze slučaja i klinička izvješća (28, 29). U literaturi se povezuju površinska korozija titana i reakcije preosjetljivosti domaćina. Nakon kontakta s kožom ili sluznicom, metalni ioni oslobađaju se s implantata, tvore komplekse s proteinima domaćina i djeluju kao alergeni, izazivajući reakcije preosjetljivosti (30). Također, na životinjskim modelima s neuspjelim implantatima otkrivena je povećana koncentracija titana u periimplantatnim tkivima, regionalnim limfnim čvorovima i plućima (14).

No, treba napomenuti da klinička važnost ovih otkrića još nije jasna (9). U medicinskoj je literaturi opisana i alergija na titan koja se očituje u obliku urtikarije, svrbeža kože ili sluznice, atopijskog dermatitisa, oslabljenog zacjeljivanja prijeloma i boli, nekroze i slabljenja ortopedskih implantata (31-33). Kao posljedica zabilježenih preosjetljivosti i alergija na titan te istraživanja koja su dokazala mogućnost degradacije pasivne površine TiO<sub>2</sub> i prisutnost čestica iz sastava implantata u okolnom tkivu te povezanost tih oslobođenih čestica s upalnim odgovorom u periimplantatnom tkivu, u zadnje vrijeme se povećala zabrinutost oko pitanja stvarne biokompatibilnosti dentalnih implantata i općenito materijala

korištenih u dentalnoj implantologiji, posebice uzimajući u obzir dinamičnost razvoja novih materijala u ovom području te njihove pojave na tržištu.

### 1.3. Mikronukleus test

Mikronukleus test je jednostavan, minimalno invazivan test koji se koristi za procjenu biokompatibilnosti određenog materijala, tvari ili kemikalije i često se upotrebljava pri toksikološkim ispitivanjima, u *in vivo* i *in vitro* uvjetima. Test predstavlja citogenetsku metodu kojom se pomoću mikroskopa određuje učestalost pojavljivanja stanica s mikronukleusom, ekstranuklearnim tjelešcem sastavljenim od cijelih kromosoma ili kromosomskih fragmenata koji se tijekom diobe nisu uspjeli inkorporirati u stanice kćeri (34). Do formiranja mikronukleusa može doći spontano ili kao posljedica djelovanja određenoga endogenoga ili egzogenoga faktora. Na temelju dobivenoga indeksa mikronukleusa iz promatranih stanica, koji služi kao biomarker izloženosti djelovanju određenog genotoksičnog agenta, procjenjuje se genomska nestabilnost i oštećenje kromosoma u stanicama te se utvrđuje postojanje rizika od razvoja karcinoma i drugih degenerativnih bolesti uzrokovanih oštećenjem DNK (35).

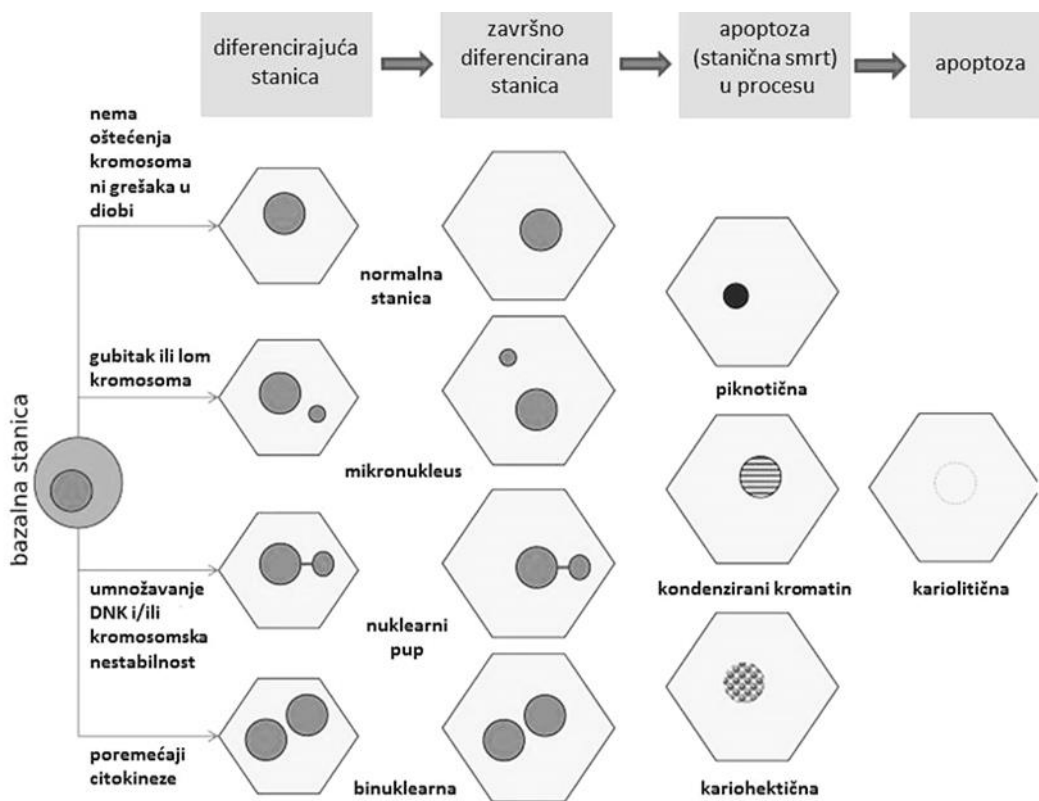
Mikronukleusi se mogu detektirati u svim stanicama koje se dijele, primjerice eritrocitima, limfocitima, epitelnim stanicama grlića maternice, jednjaka, mokraćnog mjehura, bronha, oralne sluznice i dr. u kojima mikronukleusi mogu biti *in vivo* pokazatelj oštećenja genoma (36). U usporedbi s cirkulirajućim eritrocitima i limfocitima, epitelne stanice oralne sluznice, a među njima i gingivne epitelne stanice, direktno su i stalno izložene dentalnim materijalima i njihovim potencijalno štetnim učincima, kao i mogućim kancerogenim agensima koji ulaze u tijelo disanjem ili ingestijom. Također, zbog velike proliferativne sposobnosti i konstantnog broja dioba nose i veći rizik od oštećenja DNK čemu ide u prilog činjenica da 90% karcinoma nastaje iz epitelnih stanica (35). Stoga, gingivne epitelne stanice, kao i ostale stanice oralne sluznice predstavljaju izvrsno ciljno mjesto za procjenu potencijalnih genotoksičnih događaja.

Oralni epitel sastoji se od četiriju slojeva stanica: bazalnog sloja (lat. *stratum germinativum*), trnastog sloja (*stratum spinosum*), zrnatog sloja (*stratum granulosum*) i

rožnatog sloja (*stratum corneum*) na površini. Obnavlja se kontinuiranom diobom matičnih stanica iz bazalnog sloja tako da novonastale stanice kćeri migriraju prema površini diferencirajući se u trnasti sloj stanica, zrnati i keratinizirani površinski sloj gdje zamjenjuju odljuštene stanice rožnatog sloja da bi kasnije i one same bile odljuštene u usnu šupljinu. Matične stanice bazalnog sloja mogu izraziti genetska oštećenja (gubitak ili lom kromosoma) u vidu formiranja mikronukleusa za vrijeme podjele jezgre u diobi (37).

Osim otkrivanja samog mikronukleusa kao glavne mjere, dokazano je da postoje i drugi biomarkeri genetskog oštećenja i degeneracije stanica, što daje sveobuhvatnu mjeru citotoksičnosti i genotoksičnosti, a uključuju sljedeće: otkrivanje stanica zaustavljenih u binuklearnoj fazi, stanica s jezgrinim pupom, s kondenziranim kromatinom, fragmentiranom jezgrom (karioreksa), piknotičnom jezgrom te stanica s potpunim gubitkom jezgrenog materijala (karioliza) (Slika 1) (38).





Slika 1. Prikaz različitih tipova stanica koje se mjere mikronukleus testom i mehanizmi njihovog nastanka. Preuzeto i prilagođeno iz: (34).

*Mikronukleus* pod svjetlosnim mikroskopom izgleda kao dodatna jezgra, ali je manjih dimenzija od glavne jezgre. Sastoji se od cijelih kromosoma ili kromosomskih fragmenata koji se nisu uspjeli uklopiti u stanice kćeri tijekom mitoze i nastaje na četiri osnovna načina: oštećenjem kromosoma, nestankom acentričnih kromosomskih fragmenata, oštećenjem diobenog vretena te nastankom hijazme u paracentričnoj regiji (Slika 2) (39).

*Binuklearna stanica* odlikuje se prisutnošću dviju jezgri (nukleusa) gotovo jednake veličine i intenziteta bojanja. Jezgre se dodiruju ili se nalaze u neposrednoj blizini jedna druge. Binuklearna stanica vjerojatno nastaje kao posljedica neuspjeha citokineze, odnosno diobe citoplazme (Slika 2) (38).

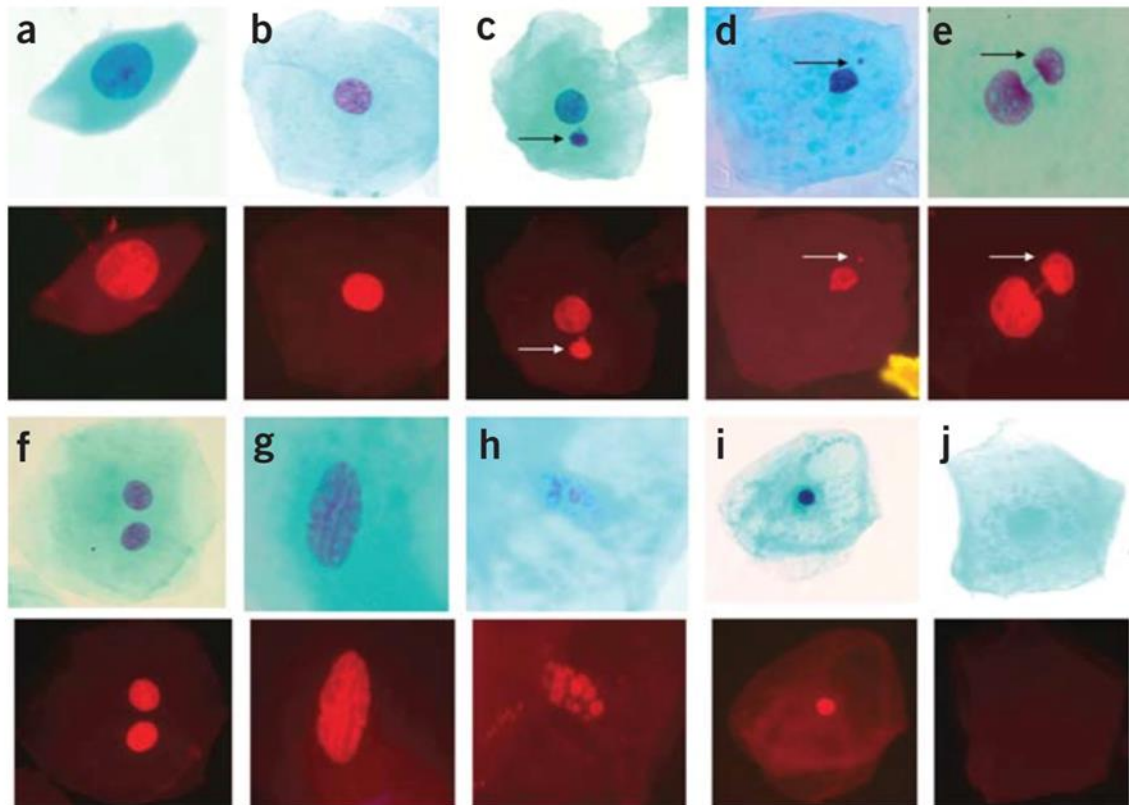
*Stanica s nuklearnim pupoljkom (pupom)* upućuje na umnožavanje DNK-a. Pod mikroskopom se prepoznaje na temelju sljedećih karakteristika: jezgra pokazuje oštro suženje koje formira pup od jezgrinog materijala, pup je iste teksture i intenziteta bojanja kao i jezgra, ali je zato veličinom manji i najčešće čini tek 1/3 do 1/6 veličine jezgre s kojom je spojen nukleoplazmičnom vezom (Slika 2) (38).

*Stanica s kariolizom* izgubila je svoj nukleusni, tj. genetski materijal i zato nema strukture koja se može obojiti te se pod mikroskopom doima i opisuje kao stanica nalik duhu. Ona se nalazi u uznapredovaloj fazi nekroze i apoptoze. Angularnog je oblika s citoplazmom veličine završno diferencirane stanice (Slika 2) (40).

*Stanica s kondenziranim kromatinom* predstavlja stadij apoptoze u kojem dolazi do brze proteolize nuklearnih matriksnih proteina. Ova stanica angularnog je oblika s citoplazmom koja je veličine završno diferencirane stanice. U jezgri se pod mikroskopom uočavaju prugaste paralelne trake kondenziranog kromatina koje su intenzivnije boje od ostatka jezgre (Slika 2) (34, 40).

*Stanica s karioreksom* predstavlja tipičnu kasnu fazu apoptoze. Jezgra takve stanice izgubila je cjelovitost, fragmentirana je te sadrži gušće agregirani kromatin od onoga u stanicama s kondenziranim kromatinom (Slika 2) (40).

*Stanica s piknotičnom jezgrom* predstavlja završno diferenciranu stanicu koja ima malenu, skupljenu i intenzivno obojanu jezgru promjera otprilike 1/3 normalne jezgre. Učestalost njezina pojavljivanja je u korelaciji s učestalošću pojavljivanja stanica kondenziranog kromatina i stanicama s karioreksom čime je zaključeno da su i one stanice u procesu stanične smrti (Slika 2) (40).



Slika 2. Odljuštene oralne epitelne stanice promatrane svjetlosnim (gornji red) i fluorescentnim svjetlosnim mikroskopom (donji red) pokazuju različite nuklearne anomalije na 1000x povećanju: (a) Bazalna stanica, (b) Diferencirana stanica, (c) Rano diferencirana stanica s mikronukleusom (strelica), (d) Kasno diferencirana stanica s mikronukleusom (strelica), (e) Stanica s nuklearnim pupoljkom (pupom), (f) Binuklearna stanica, (g) Stanica s kondenziranim kromatinom, (h) Stanica s karioreksom, (i) Stanica s piknotičkom jezgrom, (j) Stanica s kariolizom. Preuzeto iz: (41).

Dokazano je da nekoliko različitih čimbenika imaju utjecaj na detekciju mikronukleusa u oralnim epitelnim stanicama, a to su: vrijeme i način prikupljanja uzorka, tehnika fiksacije i bojanja uzorka, odabir i broj stanica, analiza preparata i ostale anomalije jezgre u normalnim i promijenjenim stanicama. Uzorak gingivnih epitelnih stanica može se uzeti drvenom ili metalnom špatulom, četkicom za zube i citološkom četkicom. Od svega navedenog, citološke četkice su se pokazale najučinkovitijima. Stanice se zatim fiksiraju na predmetnom stakalcu i bojaju bojama koje imaju veliki afinitet za DNK kako bi se olakšala identifikacija svih promjena (37, 40, 42).

Tolbert i suradnici (40) razvili su algoritam za broj stanica koji treba biti pregledan prema kojem se broji 1000 stanica, a ako se ne pronađe pet mikronukleusa u pregledu početnih 1000 stanica, podiže se broj na 2000, pa na 3000 stanica ako ima daljnje potrebe. Također, ustanovili su kriterije za odabir stanica, a kriteriji su: (a) intaktna citoplazma stanice i relativno ravan položaj (b) nikakvo ili minimalno preklapanje sa susjednom stanicom; (c) malo ili nimalo nečistoća; (d) netaknuta jezgra, jasnog, neprekinutog oblika. Također, predložili su sljedeće kriterije za identifikaciju mikronukleusa: (a) zaobljen, gladak obujam koji upućuje na membranu; (b) veličine manji od trećine promjera jezgre, ali dovoljno velik da mu se prepoznaje boja i oblik; (c) intenzitetom obojenja mora odgovarati obojenju jezgre; (d) slične teksture kao jezgra; (e) u istoj fokalnoj ravnini s jezgrom i (f) odsutnost preklapanja i bilo kakvog spajanja s jezgrom (40).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Titan i njegove legure materijali su koji se danas naširoko koriste u dentalnoj medicini. Čisti titan ( $Ti > 99\%$ ) i legirani Ti-6Al-4V dominantni su materijali za izradu dentalnih implantata prvenstveno zbog odličnih mehaničkih svojstava, biokompatibilnosti, otpornosti na koroziju i drugih pozitivnih odlika koje ovi materijali prema navodima proizvođača posjeduju. Iako se implantati na bazi titana smatraju biološki inertnima, otkriveno je da u tijelu mogu korodirati i tijekom vremena otpustiti pojedine sastavnice.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- Procijeniti citotoksični i genotoksični učinak dvaju sustava dentalnih implantata u gingivnim epitelnim stanicama u *in vivo* uvjetima na mjestu implantacije.
- Procijeniti razliku u citotoksičnom i genotoksičnom učinku između dvaju sustava dentalnih implantata u gingivnim epitelnim stanicama u *in vivo* uvjetima.

Hipoteza ovog istraživanja pretpostavlja da istraživani sustavi dentalnih implantata neće pokazati citotoksičan i genotoksičan učinak na mjestu implantacije.

### **3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA**

Ovo prospektivno istraživanje bilo je usmjereno na ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog učinka sustava dentalnih implantata u *in vivo* uvjetima primjenom mikronukleus testa i procjenom broja citogenetskih oštećenja u gingivnim epitelnim stanicama na mjestu implantacije.

U istraživanju su sudjelovali pacijenti ordinacije dentalne medicine dr. Marija Mendeša u Makarskoj i ordinacije Optimus dental u Splitu te je istraživanje provedeno u suradnji s Katedrom za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju integriranoga studija Dentalne medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu odobrilo je istraživanje, koje je u skladu s etičkim standardima i Helsinškom deklaracijom Svjetskoga medicinskog udruženja (*The World Medical Association*). Svi su sudionici bili upoznati sa svrhom istraživanja te su postpisali informirani pristanak.

### 3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na 78 ispitanika. Ukupno je sudjelovalo 50 muškaraca i 28 žena, starih između 39 i 71 godinu (srednja dob  $53,03 \pm 9,82$ ).

Ispitanici su birani sukladno ranije određenim kriterijima uključenja. Glavni kriterij uključenja bio je nedostatak jednog zuba u donjoj čeljusti u molarnoj ili premolarnoj regiji s obzirom da su to područja gdje postoji najčešći nedostatak zubi, a i kako bi se ujednačilo vrijeme uzorkovanja. Osim potrebe za implantološkom terapijom, dodatni kriteriji bili su: dobrovoljni pristanak na sudjelovanje u istraživanju, punoljetnost, pripadanje u skupinu ASA I ili ASA II pacijenata (prema Američkom anesteziološkom društvu oznaka ASA I označava zdrave pacijente, a oznaka ASA II pacijente s blagom sistemskom bolesti bez funkcionalnih ograničenja), pacijenti bez alergije na titan, bez protetskih i ortodontskih nadomjestaka u usnoj šupljini, bez prekanceroznih lezija u usnoj šupljini, bez zračenja u području glave i vrata i bez korištenja bisfosfanata i kortikosteroida u terapiji.

Od svakog ispitanika uzeta je detaljna medicinska i dentalna anamneza. Ispitanici su ispunili i strukturirani upitnik prilagođen ovom istraživanju koji je obuhvaćao podatke vezane uz demografske značajke (dob i spol), zdravstveni status (cjelokupno zdravstveno stanje,



uporaba lijekova, izloženost zračenju), životne navike (pušenje, konzumacija alkohola), prehrambene navike i oralno-higijenske navike. Kriteriji isključenja uključivali su sistemska oboljenja (npr. nekontrolirani dijabetes, bolesti sluznice, neliječeni gingivitis i parodontitis, endodontske lezije), pušenje više od deset cigareta dnevno, dubina džepova  $\geq 4$  mm na susjednim zubima, bruksizam, nedovoljne oralno-higijenske navike, trudnice i dojilje, korištenje antibiotika u posljednja tri mjeseca te tekućina za ispiranje usne šupljine koje u svom sastavu sadrže alkohol te povijest zračenja u području glave i vrata.

Analizom snage testa za zavisni t-test (razlike ispitivanih skupina u ROC analizi staničnih promjena mikronukleusa) prema sljedećim parametrima: razina značajnosti  $\alpha = 0,05$ , jednak broj ispitanika u objema skupinama, učinak veličine Cohen's  $d = 0,72$  (prema dobivenim rezultatima) u ispitivanje je za 80 % snagu testa potrebno uključiti najmanje 25 ispitanika po skupini.

### 3.2. Materijali i kirurški postupak

Ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine ovisno o sustavu dentalnog implantata korištenog u terapiji. U prvoj skupini za ugradnju korišteni su dentalni implantati Ankylos (Dentsplay Sirona, Charlotte, SAD), a u drugoj skupini Dentium SuperLine (Dentium Co., Seoul, Koreja) ( $n = 40$ ,  $n = 38$ ). Sastavi njihovih materijala, kako navode proizvođači, prikazani su u Tablici 2 (43, 44).

Tablica 2. Dentalni implantati korišteni u istraživanju

<b>Implantološki sustav</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Sastav</b>
<b>Ankylos</b>	Dentsplay Sirona, Charlotte, SAD	Titan razreda 2
<b>Dentium SuperLine</b>	Dentium Co., Seoul, Koreja	Titan razreda 4

Postavljanje implantata obavljeno je u skladu s uputama proizvođača o uporabi pojedinog sustava implantata, a tretman je izveden prema standardima i indikacijama

pacijenta. Sve je operativne zahvate obavio isti operater, sa sedmogodišnjim kliničkim iskustvom u postavljanju implantata, istim kirurškim pristupom, protokolom i instrumentarijem. Promjer i duljina implantata, kao i razina ugradnje implantata, odabrana je u skladu s pacijentovom indikacijom. Operacija je izvedena pod lokalnom anestezijom, a antibiotik Augmentin (875 mg amoksicilina + 125 mg klavulonske kiseline) je profilaktički uključen u terapiju 2 dana prije i 3 dana poslije zahvata, u dozi od 1 mg svakih 12 sati. U slučaju alergije na penicilin, pripisivan je Klindamicin (600 mg klindamicina), također 2 dana prije i 3 dana poslije zahvata, u dozi od 600 mg svakih 8 sati. Kako bi se osigurala postkirurška oralna higijena, pacijentima je preporučeno ispiranje usne šupljine otopinom 0.2 % klorheksidina (Miradent, Hager Pharma GmbH, Duisburg, Njemačka), 2 puta dnevno sve do uklanjanja šavova. Šavovi su uklonjeni 7-14 dana nakon implantacije. Implantati su cijelili potopljeni 12 tjedana na temelju kliničke prosudbe kirurga, danih indikacija i potrebe te sklonosti pacijenata. Nakon cijeljenja su postavljeni gingiva formeri. Šavovi su uklonjeni 7-14 dana nakon operacije drugog stupnja (45).

### 3.3. Uzorkovanje stanica i mikronukleus test

Kako bi se umanjile razlike među pojedincima, ispitanici su promatrani longitudinalno te je svaki ispitanik djelovao kao svoja kontrola. Uzorci gingivnih epitelnih stanica s mjesta implantiranja uzeti su kod svakog ispitanika tehnikom četkanja u tri različita vremena: kontrolni bris uzet je neposredno prije postavljanja dentalnog implantata (T0); drugi bris 90 dana nakon implantacije, a neposredno prije postavljanja gingiva formera (T1); treći bris 21 dan nakon postavljanja gingiva formera (T2). Ova vremena uzorkovanja odabrana su na temelju spoznaje da je za „turnover“, odnosno kompletnu obnovu epitelnih stanica gingive potrebno 41-45 dana. Navedeno vremensko razdoblje predstavlja minimalno potrebno vrijeme da bi se detektirala moguća oštećenja u stanicama.

Od svih sudionika istraživanja zatraženo je da se jedan sat prije uzorkovanja suzdrže od pušenja, jela te konzumacije alkoholnih pića. Neposredno prije uzorkovanja svi su ispitanici tri puta isprali usnu šupljinu vodovodnom vodom kako bi isprali mrtve odljuštene stanice. Primjenom citološke četkice (Cytobrush Plus, GmbH, Dietramszell-Linden, Njemačka), nježnim četkanjem gingivne sluznice oko mjesta predviđenog za implantat, a

kasnije i oko samog implantata, uzet je bris gingivnih epitelih stanica, nakon čega su stanice razmazane preko predmetnog stakalca.

Stanice su na predmetnom stakalcu fiksirane metanolom (80 % v/v), nakon čega su stakalca ostavljena da se osuše te obojana s 5 % otopinom Giemsa u trajanju od 10 minuta, isprana destiliranom vodom i osušena na zraku. Uzorak je potom analiziran svjetlosnim mikroskopom Olympus CX 40 (Olympus, Tokio, Japan) pod 400x povećanjem, dok su se svaki mikronukleus i ostale nuklearne anomalije dodatno provjeravale pod povećanjem od 1000x.

Kod svakog ispitanika analizirano je 2000 epitelih stanica za svaki pojedini vremenski period uzorkovanja u duplikatu. Učestalost pojavnosti nuklearnih anomalija, odnosno mikronukleusa, binuklearnih stanica, stanica s kondenziranim kromatinom, piknotičnih stanica, kariolize, kariorekse i jezgrinih pupoljaka, procijenjena je i kvalificirana prema Tolbert i sur. (20). Oni su iznijeli i sljedeće kriterije za identifikaciju mikronukleusa: (a) zaobljen, gladak obujam koji upućuje na membranu; (b) veličinom manji od trećine promjera jezgre, ali dovoljno velik da mu se prepoznaje boja i oblik; (c) intenzitetom obojenja mora odgovarati obojenju jezgre; (d) slične teksture kao jezgra; (e) u istoj fokalnoj ravnini s jezgrom i (f) odsutnost preklapanja i bilo kakvog spajanja s jezgrom.

#### 3.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je programski paket SPSS 25.0 (IBM SPSS, Armonk, NY, SAD) i Excel, dio programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Za određivanje osnovnih statističkih parametara (srednje vrijednosti, standardne devijacije) korištena je deskriptivna statistika. Analizom varijance (ANOVA) i Tukey-evim post hoc testom, utvrđivano je postojanje statistički značajne razlike u broju mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija unutar grupe i između dviju grupa ispitanika. Multipla regresijska analiza korištena je za procjenu učinka prediktorskih varijabli (dob, spol, prehrambene navike, implantološki sustav, pušenje, alkohol) na zavisne varijable (mikronukleus, binuklearne stanice, slomljeno jaje, jezgrin pup, piknotička stanica, stanice s kondenziranim kromatinom, kariolitična stanica i stanica s kariohektičnim kromatinom).

Rezultati su prikazani u formi Pareto dijagrama. U svim testovima korištena je razina značajnosti  $p < 0,05$ .

#### **4. REZULTATI**

U istraživanju je sudjelovalo 78 ispitanika, od kojih 28 muškaraca i 50 žena, u dobi od 39 do 71 godine. Podatci dobiveni na temelju posebno razvijenog upitnika za ovo istraživanje, a koji uključuju životne navike ispitanika kao što su pušenje, konzumiranje alkohola, prehrambene navike (konzumacija mesa, voća i povrća) te izloženost RTG zračenju, prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Deskriptivna statistika životnih navika ispitanika.

Karakteristika		Dentium n (%)	Ankylos n (%)	Ukupno n (%)
<b>Broj ispitanika (n)</b>		38 (48,7)	40 (51,2)	78 (100,0)
<b>Dob (X ± SD)</b>		52,16±10,11	53,86±9,51	53,03±9,82
<b>Spol</b>	Muškarac	12 (31,6)	16 (40,0)	28 (35,9)
	Žena	26 (68,4)	24 (60,0)	50 (64,1)
<b>Pušenje</b>	Nepušači	20 (52,6)	40 (100,0)	60 (76,9)
	< 10 cigareta/dan	18 (47,4)	0 (0)	18 (23,1)
<b>Izloženost RTG zračenju posljednja 3 mjeseca</b>	Ne	20 (52,6)	40 (100,0)	60 (76,9)
	Da	18 (47,4)	0 (0)	18 (23,1)
<b>Konzumacija alkohola</b>	Nikada	6 (15,8)	12 (30,0)	18 (23,1)
	≤ 12 jedinica/tjedno	13 (36,8)	16 (40,0)	30 (38,5)
	13-24 jedinica/tjedno	6 (15,8)	12 (30,0)	18 (23,1)
	≥ 25 jedinica/tjedno	12 (31,6)	0 (0)	12 (15,1)
<b>Konzumacija mesa</b>	≤ jednom/tjedno	4 (10,5)	8 (20,0)	12 (15,4)
	1-3x/tjedno	6 (15,8)	12 (30,0)	18 (23,1)
	4-6x/tjedno	4 (10,5)	12 (30,0)	16 (20,5)
	≥ 1x/dnevno	24 (63,2)	8 (20,0)	32 (41,0)
<b>Konzumacija voća</b>	4-6x/tjedno	16 (42,1)	24 (60)	40 (51,3)
	≥ 1x/dnevno	22 (57,9)	16 (40,0)	38 (48,7)
<b>Konzumacija povrća</b>	≤ jednom/tjedno	8 (21,1)	12 (30,0)	20 (25,6)
	1-3x/tjedno	8 (21,1)	8 (20,0)	16 (20,5)
	4-6x/tjedno	16 (42,1)	4 (10,0)	20 (25,6)
	≥ 1x/dnevno	6 (15,8)	16 (40,0)	22 (32,0)

Kratice: X – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija.

Rezultati mikronukleus testa za implantološki sustav Ankylos® prikazani su u Tablici 4. Rezultati analize varijance (ANOVA) pokazuju razliku između pojedinih vremena uzorkovanja za broj stanica s mikronukleusom ( $F = 4, 872, p = 0,009$ ), kariolizom ( $F = 3,839,$

p = 0,024), jezgrinim pupom (F = 3, 293, p = 0,024) i binuklearnih stanica (F = 6,134, p = 0,003). Dodatno je Tukey post hoc testom potvrđena razlika između vremena T0 i T1, prije i nakon postavljanja implantata, u broju binuklearnih stanica (p = 0,011). U odnosu na kontrolni bris prije postavljanja implantata i T2 vremena (nakon postavljanja gingiva formera) uočeno je statistički značajno povećanje binuklearnih stanica, stanica s mikronukleusom i kariolizom (p = 0,006, p = 0,007 i p = 0,027).

Tablica 4. Mikronukleus test (prosječan broj citogenetskih oštećenja/ 2000 gingivnih epitelnih stanica) među ispitanicima kojima je postavljen Ankylos sustav u različitim vremenima uzorkovanja.

Citogenetsko oštećenje		T0	T1	T2
Mikronukleus	X ± SD	2,08 ± 1,20 <sup>a</sup>	2,56 ± 1,29	2,93 ± 1,16 <sup>a</sup>
Jezgrin pup	X ± SD	0,50 ± 0,64	0,78 ± 0,57	0,80 ± 0,51
Slomljeno jaje	X ± SD	0,40 ± 0,54	0,60 ± 0,49	0,63 ± 0,62
Binuklearne stanice	X ± SD	4,75 ± 1,71 <sup>b, c</sup>	5,53 ± 1,24 <sup>b</sup>	5,58 ± 1,13 <sup>c</sup>
Karioreksa	X ± SD	1,55 ± 1,06	2,00 ± 0,96	2,03 ± 1,05
Karioliza	X ± SD	2,03 ± 1,06 <sup>d</sup>	2,12 ± 0,82	2,53 ± 0,67 <sup>d</sup>
Kondenzirani kromatin	X ± SD	1,95 ± 0,95	2,07 ± 0,69	2,00 ± 0,90
Piknoza	X ± SD	2,72 ± 1,06	2,70 ± 0,93	3,18 ± 1,01

\*Unutar istog reda, isto slovo označava statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa (p < 0,05; <sup>a</sup>p = 0,007, <sup>b</sup>p = 0,011, <sup>c</sup>p = 0,006, <sup>d</sup>p = 0,027). Kratice: X, srednja vrijednost; SD, standardna devijacija; T0, bris prije tretmana - početni; T1, 90 dana nakon postavljanja implantata; T2, 21 dan od postavljanja gingiva formera.

Rezultati za implantološki sustav Dentium SuperLine® prikazani su u Tablici 5. Rezultati analize varijance (ANOVA) pokazuju razliku između pojedinih vremena uzorkovanja za broj stanica s mikronukleusom (F = 6, 598, p = 0,002) i binuklearnih stanica (F = 9,723, p ≤ 0,001). Tukey post hoc testom potvrđeno je statistički značajno povećanje

stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica između vremena T0 i T1, prije i nakon postavljanja implantata ( $p = 0,002$  i  $p \leq 0,001$ , slijedom). U odnosu na kontrolni bris prije postavljanja implantata i T2 vremena (nakon postavljanja gingiva formera) uočeno je, također, statistički značajno povećanje binuklearnih stanica i stanica s mikronukleusom ( $p \leq 0,001$  i  $p = 0,022$ , slijedom).

Tablica 5. Mikronukleus test (prosječan broj citogenetskih oštećenja/ 2000 gingivnih epitelnih stanica) među ispitanicima kojima je postavljen Dentium sustav u različitim vremenima uzorkovanja.

Citogenetsko		T0	T1	T2
<b>oštećenje</b>				
<b>Mikronukleus</b>	X ± SD	1,92 ± 0,91 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,93 <sup>b</sup>	2,68 ± 0,98 <sup>a,b</sup>
<b>Jezgrin pup</b>	X ± SD	0,39 ± 0,67	0,63 ± 0,91	0,68 ± 1,04
<b>Slomljeno jaje</b>	X ± SD	0,34 ± 0,53	0,47 ± 0,60	0,53 ± 0,83
<b>Binuklearne stanice</b>	X ± SD	4,05 ± 1,22 <sup>c,d</sup>	5,18 ± 1,39 <sup>c</sup>	5,26 ± 1,38 <sup>d</sup>
<b>Karioreksa</b>	X ± SD	1,34 ± 1,14	1,74 ± 1,32	2,00 ± 1,29
<b>Karioliza</b>	X ± SD	2,34 ± 1,34	2,29 ± 0,98	2,71 ± 1,18
<b>Kondenzirani kromatin</b>	X ± SD	1,63 ± 1,14	1,74 ± 1,05	1,87 ± 1,41
<b>Piknoza</b>	X ± SD	2,87 ± 1,11	2,63 ± 0,67	3,13 ± 1,67

\*Unutar istog reda, isto slovo označava statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa ( $p < 0,05$ ; <sup>a</sup> $p = 0,002$ , <sup>b</sup> $p = 0,022$ , <sup>c,d</sup> $p \leq 0,001$ ). Kratice: X, srednja vrijednost; SD, standardna devijacija; T0, bris prije tretmana - početni; T1, 90 dana nakon postavljanja implantata; T2, 21 dan od postavljanja gingiva formera.

Analizom varijance promatrana je razlika između dva implantološka sustava kod ispitanika u odnosu na vremena uzorkovanja. Nije pronađena statistički značajna razlika među njima ni u jednom od ispitivanih vremena uzimanja uzoraka. U vremenu prije postavljanja implantata nije uočena razlika ni za jedno promatrano citogenetsko oštećenje: mikronukleus ( $p = 0,528$ ), karioreksa ( $p = 0,408$ ), karioliza ( $p = 0,243$ ), kondenzirani kromatin ( $p = 0,187$ ), pikonoza ( $p = 0,563$ ), pup ( $p = 0,483$ ), slomljeno jaje ( $p = 0,637$ ) i binuklearne stanice ( $p =$



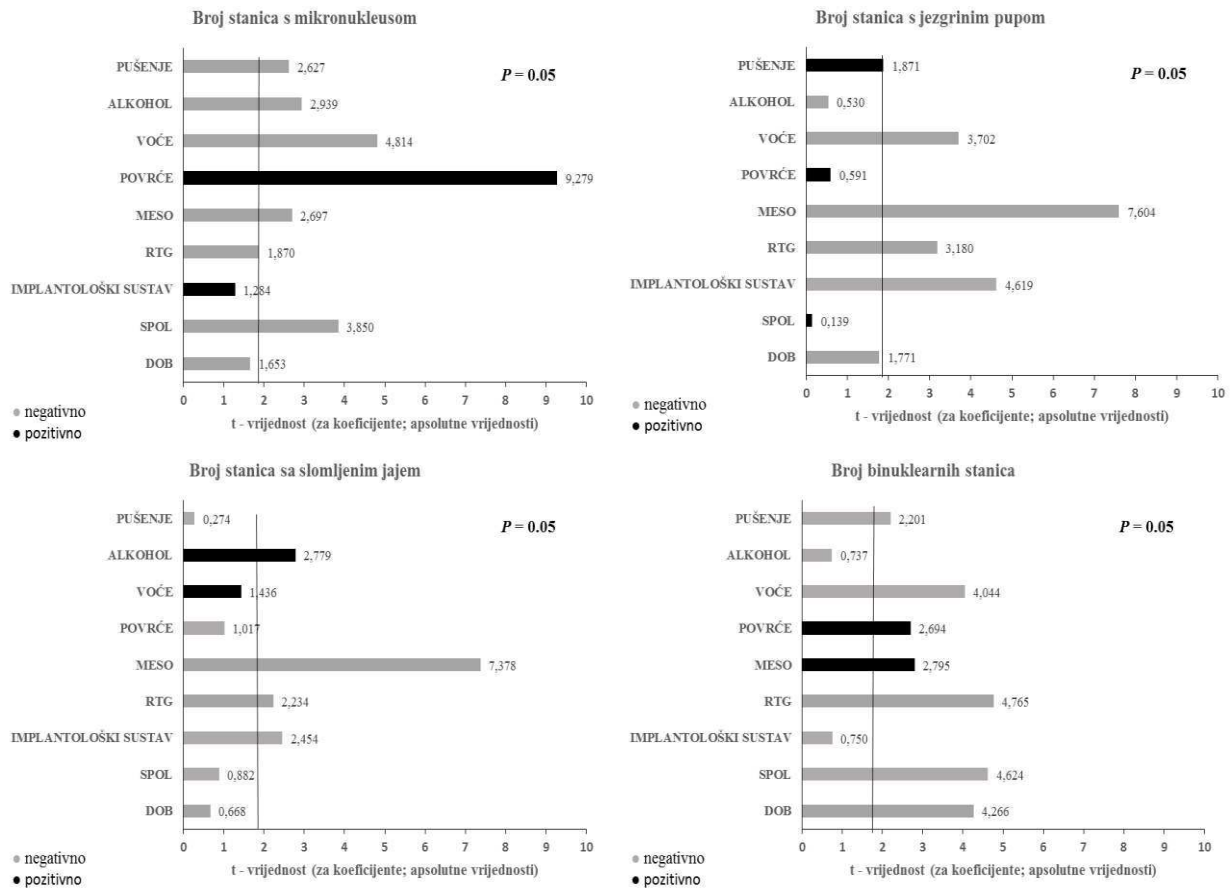
0,078). Nije uočena razlika ni za jedno promatrano citogenetsko oštećenje ni u vremenu T1 – tri mjeseca nakon postavljanja implantata: mikronukleus ( $p = 0,089$ ), karioreksa ( $p = 0,318$ ), karioliza ( $p = 0,425$ ), kondenzirani kromatin ( $p = 0,097$ ), pikonoza ( $p = 0,714$ ), pup ( $p = 0,407$ ), slomljeno jaje ( $p = 0,315$ ) i binuklarne stanice ( $p = 0,257$ ). Razlika nije pronađena ni za vrijeme T2 – 21 dan nakon postavljanja gingiva formera: mikronukleus ( $p = 0,329$ ), karioreksa ( $p = 0,925$ ), karioliza ( $p = 0,395$ ), kondenzirani kromatin ( $p = 0,625$ ), piknoza ( $p = 0,890$ ), pup ( $p = 0,533$ ), slomljeno jaje ( $p = 0,554$ ) i binuklarne stanice ( $p = 0,279$ ).

#### 4.1. Višestruka regresijska analiza

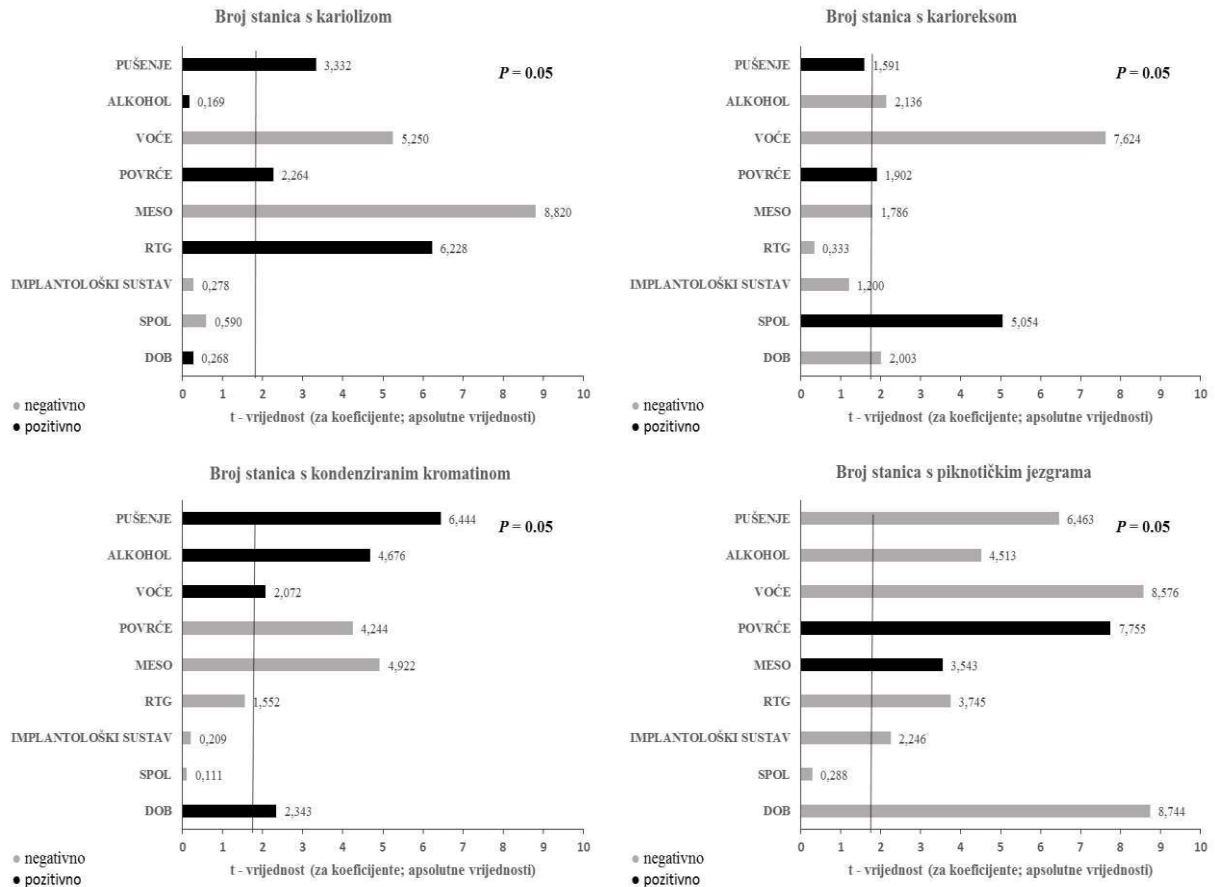
Ovisnost parametara mikronukleus testa o svim prediktorskim varijablama u ukupnoj ispitnoj skupini, utvrđena je generalnim regresijskim modelom i prikazana u obliku Pareto dijagrama (Slika 3. i Slika 4.).

Utjecaj na incidenciju broja stanica s mikronukleusom, od ispitivanih prediktorskih varijabli imaju: pušenje ( $\beta = -0,387$ ,  $SE = 0,147$ ,  $p = 0,009$ ), konzumacija alkohola ( $\beta = -0,242$ ,  $SE = 0,082$ ,  $p = 0,004$ ), konzumacija voća ( $\beta = -1,318$ ,  $SE = 0,274$ ,  $p \leq 0,001$ ), povrća ( $\beta = 0,862$ ,  $SE = 0,093$ ,  $p \leq 0,001$ ) i mesa ( $\beta = -0,178$ ,  $SE = 0,066$ ,  $p = 0,008$ ) te spol ( $\beta = -0,585$ ,  $SE = 0,152$ ,  $p \leq 0,001$ ). Utjecaj na pojavnost stanica s jezgrinim pupom imaju: konzumacija voća ( $\beta = -0,652$ ,  $SE = 0,176$ ,  $p \leq 0,001$ ), mesa ( $\beta = -0,323$ ,  $SE = 0,042$ ,  $p \leq 0,001$ ), RTG zračenje ( $\beta = -0,474$ ,  $SE = 0,149$ ,  $p = 0,002$ ) te dentalni implantat ( $\beta = -0,401$ ,  $SE = 0,098$ ,  $p \leq 0,001$ ). Na pojavnost stanica s jezgrom u izgledu slomljenog jaja utječu: konzumacija alkohola ( $\beta = 0,140$ ,  $SE = 0,050$ ,  $p = 0,006$ ), mesa ( $\beta = -0,298$ ,  $SE = 0,040$ ,  $p \leq 0,001$ ), RTG zračenje ( $\beta = -0,317$ ,  $SE = 0,142$ ,  $p = 0,026$ ) te vrsta dentalnog implantološkog sustava ( $\beta = -0,203$ ,  $SE = 0,082$ ,  $p = 0,015$  0,001). Kod pojave binuklearnih stanica pronađen je utjecaj sljedećih varijabli: pušenje ( $\beta = -0,424$ ,  $SE = 0,193$ ,  $p = 0,029$ ), konzumacija voća ( $\beta = -1,450$ ,  $SE = 0,359$ ,  $p = 0,006$ ), povrća ( $\beta = 0,328$ ,  $SE = 0,122$ ,  $p \leq 0,008$ ), mesa ( $\beta = 0,242$ ,  $SE = 0,086$ ,  $p \leq 0,001$ ), RTG zračenje ( $\beta = -1,446$ ,  $SE = 0,304$ ,  $p \leq 0,001$ ), spol ( $\beta = -0,921$ ,  $SE = 0,188$ ,  $p \leq 0,001$ ) i dob ( $\beta = -0,065$ ,  $SE = 0,015$ ,  $p \leq 0,001$ ). Karioliza je u ovisnosti s: pušenjem ( $\beta = 0,399$ ,  $SE = 0,12$ ,  $p \leq 0,001$ ), konzumacijom voća ( $\beta = -1,169$ ,  $SE = 0,223$ ,  $p \leq 0,001$ ), povrća ( $\beta = 0,171$ ,  $SE = 0,075$ ,  $p = 0,025$ ), mesa ( $\beta = -0,473$ ,  $SE = 0,054$ ,  $p \leq 0,001$ ) i RTG zračenjem ( $\beta = 1,174$ ,  $SE = 0,188$ ,  $p \leq 0,001$ ). Na pojavnost kariorekse utječu: konzumacija alkohola ( $\beta = -0,182$ ,  $SE = 0,085$ ,  $p = 0,034$ ), voća ( $\beta = -2,163$ ,  $SE =$

0,284 ,  $p \leq 0,001$ ) i spol ( $\beta = 0,796$ ,  $SE = 0,157$  ,  $p \leq 0,001$ ). Kod pojavnosti stanica s kondenziranim kromatinom vidljiv je učinak sljedećih varijabli: pušenje ( $\beta = 0,989$ ,  $SE = 0,153$  ,  $p \leq 0,001$ ), konzumacija alkohola ( $\beta = 0,401$ ,  $SE = 0,086$ ,  $p \leq 0,001$ ), voća ( $\beta = 0,591$ ,  $SE = 0,285$ ,  $p = 0,039$ ), povrća ( $\beta = -0,411$ ,  $SE = 0,097$  ,  $p \leq 0,001$ ), mesa ( $\beta = -0,339$ ,  $SE = 0,069$  ,  $p \leq 0,001$ ), RTG zračenje ( $\beta = -0,375$ ,  $SE = 0,242$ ,  $p = 0,122$ ), dentalni implantat ( $\beta = -0,029$ ,  $SE = 0,141$ ,  $p = 0,834$ ) i dob ( $\beta = 0,028$ ,  $SE = 0,012$ ,  $p = 0,020$ ). Na pojavu piknoze učinak imaju: pušenje ( $\beta = -1,003$ ,  $SE = 0,155$  ,  $p \leq 0,001$ ), konzumacija alkohola ( $\beta = -0,392$ ,  $SE = 0,087$  ,  $p \leq 0,001$ ), voća ( $\beta = -2,476$ ,  $SE = 0,289$ ,  $p \leq 0,001$ ), povrća ( $\beta = 0,759$ ,  $SE = 0,098$ ,  $p \leq 0,001$ ), mesa ( $\beta = 0,247$ ,  $SE = 0,070$ ,  $p \leq 0,001$ ), RTG zračenje ( $\beta = -0,915$ ,  $SE = 0,244$ ,  $p \leq 0,001$ ), dentalni implantat ( $\beta = -0,319$ ,  $SE = 0,142$  ,  $p = 0,026$ ) i dob ( $\beta = -0,107$ ,  $SE = 0,012$  ,  $p \leq 0,001$ ).



Slika 3. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost citogenetskih oštećenja u gingivnim epitelnim stanicama (broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom, slomljenim jajem i binuklearnim stanicama) s demografskim i životnim značajkama kao mogućim prediktivnim čimbenicima.



Slika 4. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost citogenetskih oštećenja u gingivnim epitelnim stanicama (broj stanica s kariolizom, karioreksom, kondenziranim kromatinom i piknozom) s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

## **5. RASPRAVA**

Cilj ove prospektivne studije bio je procijeniti citotoksičan i genotoksičan učinak dvaju dentalnih implantoloških sustava temeljenih na titanu u gingivnim epitelnim stanicama. Jednoj skupini ispitanika ugrađen je Ankylos implantološki sustav, a drugoj skupini Dentium. Na temelju briseva oralne sluznice s mjesta implantiranja, genotoksičnost i citotoksičnost su bile procjenjivane mikronukleus testom, pouzdanom metodom kojom se uspješno bilježe sva jezgrena oštećenja u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (46).

Rezultati istraživanja pokazuju da oba implantološka sustava, Ankylos i Dentium, izazivaju statistički značajno povećanje broja binuklearnih stanica tri mjeseca nakon njihova postavljanja u odnosu na kontrolni bris uzet prije implantacije ( $4,75 \pm 1,71$  naspram  $5,53 \pm 1,24$ ,  $p = 0,011$  i  $4,05 \pm 1,22$  naspram  $5,18 \pm 1,39$ ,  $p \leq 0,001$  te  $1,92 \pm 0,91$  naspram  $2,68 \pm 0,98$ ,  $p = 0,022$ ; slijedom). Gingiva former kod oba implantološka sustava, Ankylos i Dentium, dovodi do statistički značajnog povećanja broja stanica s mikronukleusom ( $2,08 \pm 1,20$  naspram  $2,93 \pm 1,16$ ,  $p = 0,007$  te  $1,92 \pm 0,91$  naspram  $2,68 \pm 0,98$ ,  $p = 0,022$ ; slijedom) i binuklearnih stanica ( $4,75 \pm 1,71$  naspram  $5,58 \pm 1,13$ ,  $p = 0,006$  te  $4,05 \pm 1,22$  naspram  $5,26 \pm 1,38$ ,  $p \leq 0,001$ ; slijedom) u odnosu na kontrolni bris prije postavljanja implantata. Ove rezultate, iako su statistički značajni, ne možemo smatrati biološki ni klinički relevantnima da bismo na osnovu njih donijeli zaključak kako su implantati genotoksični ili citotoksični jer su povećanja spomenutih parametara, gledajući apsolutne vrijednosti, još uvijek preniska. Stoga prihvaćamo nultu hipotezu postavljenu na početku istraživanja da implantati, odnosno implantološki sustavi ne uzrokuju genotoksična ni citotoksična oštećenja. Dobivene povećane parametre mikronukleusa nakon postavljanja gingiva formera možemo dovesti u vezu s nekoliko faktora. Gingiva former je nakon postavljanja cijelo vrijeme u direktnom kontaktu s gingivom, odnosno mjestom uzimanja brisa, za razliku od samog implantata koji je potopljen. Nadalje, na kontaktu implantata i gingiva formera, dolazi do mikropokreta i posljedično tome trenja na dodirnim površinama implantata i gingiva formera koje narušava cjelovitost zaštitnog sloja titanova dioksida, a time i sastava implantata jer pospješuje koroziju, a korozija daljnje trenje (47, 48). Za ovu pojavu međusobnog djelovanja fizikalne sile i kemijskog procesa koristi se termin tribokorozija, odnosno biotribokorozija jer se događa u biološkoj sredini usne šupljine i predstavlja pojavu koja je trenutačno predmet velikog interesa u području znanosti o biomaterijalima (48-51).

Veći broj citogenetskih oštećenja kod Ankylos implantološkog sustava u usporedbi s vrijednostima Dentiuma možemo pripisati različitosti materijala od kojih su građeni implantat (čisti titan razreda 2) i gingiva former (titanova legura Ti6Al4V) za razliku od SuperLinea gdje su obje strukture građene od čistog titana razreda 4 jer su istraživanja pokazala da je titanova legura Ti6Al4V, unatoč boljim mehaničkim svojstvima, slabije otporna na koroziju od čistog titana (52-54).

Povećan broj oštećenja nakon postavljanja gingiva formera može se objasniti i tako da se implantat isključivo koristi jedanput, dok se gingiva former zbog ekonomskih razloga, u praksi opetovano sterilizira i koristi. Stoga, osim utjecaja samoga sastava materijala na koroziju, postoji pitanje i utjecaja postupka sterilizacije i broja opetovanih sterilizacija na sastav materijala i koroziju. Allsobrook i sur. (55) istraživali su utjecaj ponavljanih sterilizacija na koroziju titanskih svrdala za kirurški postupak implantacije i zaključili su da su takva svrdla podložna gubitku materijala i otpuštanju čestica. Drugi autori dokazali su da sterilizacija u autoklavu pospješuje površinsku koroziju (56-58). Iako pregledom literature nismo našli nijedan rad o utjecaju opetovanih postupaka sterilizacije na sastav materijala gingiva formera, vjerujemo da postoji sličan obrazac djelovanja kao i sa svrdlima, čime dodatno potkrepljujemo objašnjenje dobivenih rezultata.

Povećane vrijednosti binuklearnih stanica nakon ugradnje implantata te nakon postavljanja gingiva formera mogu se objasniti ubrzanom proliferacijom stanica u upalnoj fazi cijeljenja rane koja je neizbježna nakon kirurškog manipuliranja tkivom, kako u prvom kirurškom zahvatu implantacije, tako i u drugom kirurškom zahvatu „otvaranja“ implantata i postavljanja gingiva formera (59). Dodatno, otkriveno je da upalu mogu potaknuti i oslobođene čestice iz sloja TiO<sub>2</sub> narušenog gore navedenim postupcima koje imunološki sustav prepoznaje kao strana tijela te pokreće upalnu reakciju koja posljedično uzrokuje oslobađanje citokina (49, 50, 60, 61). Među različitim vrstama oslobođenih citokina su i mitogeni citokini, prvenstveno IL-1 $\beta$  koji ubrzaju proliferaciju stanica (62, 63). Osim čestica TiO<sub>2</sub>, mislimo da još nešto utječe na povećanje citokina IL-1 $\beta$ . Naime, de Barros Lucena i sur. dokazali su akumulaciju biofilma u unutrašnjosti implantata kod 52,6 % umetnutih i potpuno zatvorenih implantata prije samog postavljanja gingiva formera i protetske suprastrukture. Tehnikom DNK-DNK hibridizacije potvrdili su prisutnost 40 vrsta bakterija na implantatima i od toga ih je 77,42 % bilo u mandibuli (64). Sljedeći korak u ovoj sekvenci događanja je da lipopolisaharidi prisutni u membrani Gram negativnih bakterija djeluju kao

ligandi za Toll like receptore (TLR) gingivnih epitelnih stanica (65). Štoviše, Eskan i sur. (66) utvrdili su da je povećana ekspresija TLR4 receptora na gingivnim epitelnim stanicama u korelaciji sa povećanom produkcijom IL-1 $\beta$ , a time i samom upalom i ubrzanom proliferacijom stanica. Posljednji korak u ovoj patofiziološkoj shemi događanja je da ubrzana proliferacija stanica dovodi do češćih grešaka u citokinezi i da kao posljedicu toga bilježimo veći broj binuklearnih stanica.

Naši rezultati u skladu su s istraživanjem koje su proveli Karahalil i sur. (67) u kojem su ispitivali genotoksičnost dentalnih implantata od titanove legure na gingivnim epitelnim stanicama 37 ispitanika koristeći mikronukleus test. Njihovi rezultati pokazali su blagi porast u pojavnosti mikronukleusa ( $p = 0,047$ ) u drugom brisu, uzetom nekoliko tjedana nakon zahvata ugradnje implantata te su zaključili da je razina otpuštanja čestica s implantata bila preniska da bi uzrokovala oštećenja DNK odnosno genotoksičnost. Nadalje, Ribeiro i sur. (68) izazvali su koroziju u nekoliko implantata različitih proizvođača držeći ih u otopini octene kiseline i NaCl nakon čega su epitelne stanice jajnika kineskog hrčka izložili toj otopini. Nakon provedbe komet testa, tj. mikrogel elektroforeze, zaključili su da nijedan dentalni implantat koji je bio uključen u ispitivanje nije uzrokovao genotoksičnost. Također, Camacho-Alonso i sur. (69) ispitivali su mikronukleus testom na bukalnim epitelnim stanicama postoje li genotoksična oštećenja u pacijenata s titanskim dentalnim implantatima i različitim metalnom restauracijom u ustima kao posljedica otpuštanja metalnih iona. Iako su kod svih ispitanika osim kontrolne grupe koja je imala jedino implantate u ustima nađene povećane koncentracije metalnih iona, ni kod jednog ispitanika nisu pronađena genotoksična oštećenja.

S druge strane, nekoliko je studija dokazalo genotoksičan i citotoksičan potencijal čestica TiO<sub>2</sub> (veličine 1-100 nm) oslobođenih kao posljedica biotribokorozije (70-72). Slične spoznaje dobili su i Medeiros i sur. (73) jer su uvidjeli da površina implantata bez završne obrade ima tanji sloj TiO<sub>2</sub> te je time podložnija koroziji, a otpuštene čestice i ioni utječu na nastanak slobodnih radikala, oksidativnog stresa i oksidacije DNA što rezultira genotoksičnim događajima. Nadalje, Wang i sur. (74) su na temelju svog istraživanja i rezultata dobivenih iz nekoliko različitih testova citotoksičnosti, među kojima i Cytokinesis block micronucleus (CBMN) testa, zaključili da su ultra fine, tj. nano čestice TiO<sub>2</sub> (< 100 nm u promjeru) uzrokovale genotoksična i citotoksična oštećenja u ljudskim limfoblastoidnim stanicama. Maloney i sur. (75) te Kumazawa i sur. (76) ustanovili su da su vanadij (V), aluminij (Al),



kobalt (Co), krom (Cr) i nikal (Ni) citotoksični pri većim koncentracijama, dok kobalt (Co) uzrokuje staničnu smrt.

Određena istraživanja dokazala su da neuspjeh implantološke terapije može biti uzrokovan upalnom reakcijom u okolnom tkivu kao odgovorom na koroziju titanove legure (77, 78). Postoji i jedna sistemska bolest povezana s titanom. Berglund i Carlmark (79) su titanu pripisali uzrokovanje sindroma žutog nokta kada su u noktima 30 ispitanika dokazali visok sadržaj titana. Kao glavni izvor iona titana naveli su koroziju uzrokovanu galvanizmom između titanskih implantata i zlatne i/ili amalgamske restauracije u ustima te koroziju uzrokovanu oksidacijom fluora. Osim na noktima, ovaj se sindrom očituje i bronhijalnom opstrukcijom i limfedemom, a prema Berglundu i Carlmarku najčešći simptomi su sinusitis povezan s kašljem i sekret u grlu. Uz Berglunda i Carlmarka, postoje i druga istraživanja koja su identificirala titan kako uzročnik ovog sindroma (80-82).

Zaključno, iako se titanski dentalni implantati smatraju bioinertima, dokazano je da podliježu koroziji i trošenju materijala uslijed trenja, odnosno biotribokoroziji. Iako su naši rezultati pokazali blaga citogenetska oštećenja, smatramo da je porast određenih parametara, gledajući apsolutne vrijednosti, prenizak da bi ga smatrali biološki relevantnim te na osnovu njih ne možemo reći da su titanski dentalni implantati, odnosno implantološki sustavi korišteni u našem istraživanju bili citotoksični ni genotoksični. Ipak, s obzirom da su dentalni implantati širom svijeta korištena terapija i trenutačno nezamjenjiva u nadomjestku krune i korijena zuba te je njihova uporaba u porastu, smatramo da je opravdana zabrinutost znanstvene zajednice u vezi potencijalnog zdravstvenog rizika koji svaki materijal korišten u usnoj šupljini predstavlja za pojedinca, pa stoga podupiremo sva daljnja istraživanja procjene i eliminacije tog rizika.

Ovo istraživanje ima i određen broj ograničavajućih čimbenika. Potrebno je povećati uzorak ispitivanih proizvođača implantata, proširiti istraživanje na veći broj ispitanika i uspostaviti dugoročno praćenje promjena nakon postavljanja suprastrukture i završetka cijele terapije. Kao prijedlog budućih istraživanja navodimo utjecaj biotribokorozije i posljedične degradacije materijala implantata na periimplantantna tkiva, ali i procjenu sistemnoga učinka oslobođenih čestica na cjelokupan organizam, navodeći primjer sindroma žutog nokta kao posljedice taloženja tih čestica.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju rezultata dobivenih istraživanjem možemo izvesti sljedeće zaključke:

1. Za oba implantološka sustava Ankylos i Dentium uočeno je statistički značajno povećanje broja binuklearnih stanica tri mjeseca nakon njihova postavljanja u odnosu na kontrolni bris prije implantacije (T0 naspram T1;  $4,75 \pm 1,71$  naspram  $5,53 \pm 1,24$ ,  $p = 0,011$  i  $4,05 \pm 1,22$  naspram  $5,18 \pm 1,39$ ,  $p \leq 0,001$ );).
2. Gingiva former Ankylos implantološkog sustava doveo je do povećanja broja stanica s mikronukleusom, kariolizom i binuklearnih stanica u odnosu na kontrolni bris prije postavljanja implantata (T0 naspram T2;  $2,08 \pm 1,20$  naspram  $2,93 \pm 1,16$ ,  $p = 0,007$ ;  $2,03 \pm 1,06$  naspram  $2,53 \pm 0,67$ ,  $p = 0,027$ ; te  $4,75 \pm 1,71$  naspram  $5,58 \pm 1,13$ ,  $p = 0,006$ );).
3. Gingiva former Dentium implantološkog sustava doveo je do povećanja broja stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica u odnosu na kontrolni bris prije postavljanja implantata (T0 naspram T2;  $1,92 \pm 0,91$  naspram  $2,68 \pm 0,98$ ,  $p = 0,022$ ; te  $4,05 \pm 1,22$  naspram  $5,26 \pm 1,38$ ,  $p \leq 0,001$ );).
4. Ni za jedno ispitivano vrijeme te ni za jedan ispitivani citogenetski parameter nije uočena statistički značajna razlika između dvaju implantoloških sustava.
5. Možemo zaključiti da su učinci koje izazivaju dentalni implantološki sustavi klinički minimalni te reći kako nisu uočeni citotoksični ni genotoksični učinci u gingivnim epitelnim stanicama na mjestu primjene.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Abraham C. A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments. *Open Dent J.* 2014;8(1):50-55.
2. Becker M. Spurious "Examples" of Ancient Dental Implants or Appliances: Part Two of a Series. *Dental Anthropology Journal.* 2018;9(1):5-10.
3. Brånemark P.I., Hansson B.O., Adell R., Breine U., Lindström J., Hallén O., Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 1977;16:1–132.
4. The Glossary of Prosthodontic Terms: Ninth Edition. *J Prosthet Dent.* 2017;117(5):e1-e105.
5. Anusavice KJ, Shen C, Rawls R. Phillips' Science of Dental Materials [Internet]. Phillips' Science of Dental Materials - 12th Edition. Elsevier; 2012 [citirano 20.6. 2020.]. Dostupno na : <https://www.elsevier.com/books/phillips-science-of-dental-materials/anusavice/978-1-4377-2418-9>.
6. Singh A. Clinical Implantology. Chennai: Elsevier Health Sciences APAC; 2014.
7. Shen J, Kosmac T. Advanced ceramics for dentistry. Waltham, MA: Elsevier/BH; 2014.
8. Knežević G i sur. Osnove dentalne implantologije. Zagreb: Školska knjiga; 2002.
9. Osman R, Swain M. A Critical Review of Dental Implant Materials with an Emphasis on Titanium versus Zirconia. *Materials.* 2015;8(3):932-958.
10. Čatović A, Jerolimov V, Živko-Babić J, Carek V, Dulčić N, Lazić B. Titan u stomatologiji. *Acta Stomatol Croat.* 1998;32(2):351-365.
11. Heydecke G, Kohal R, Glaser R: Optimal esthetics in single-tooth replacement with the Re-Implant system: a case report. *Int J Prosthodont.* 1999;12:184-189.
12. Schliephake H, Neukam FW, Urban R: Titanbelastung parenchymatöser Organe nach Insertion von Titanschraubenimplantaten. Erste Ergebnisse. *Z Zahnärztl Implantol.* 1989;5:180-184.

13. Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol.* 2009; 29:330–337.
14. Frisken K, Dandie G, Lugowski S, Jordan G. A Study of Titanium Release into Body Organs Following the Insertion of Single Threaded Screw Implants into the Mandibles of Sheep. *Aus Dent J.* 2002;47(3):214-217.
15. Pjetursson B, Zarauz C, Strasding M, Sailer I, Zwahlen M, Zembic A. A systematic review of the influence of the implant-abutment connection on the clinical outcomes of ceramic and metal implant abutments supporting fixed implant reconstructions. *Clin. Oral Implants Res.* 2018;29:160-183.
16. Amarnath G, Muddugangadhar B, Tripathi S, Dikshit S, Divya M.S. Biomaterials for Dental Implants: An Overview. *IJOICR.* 2011;2(1):13-24.
17. Williams DF. *The Williams Dictionnary of Biomaterials* Liverpool University Press, Liverpool; 1999.
18. Mousavinasab SM. Biocompatibility of composite resins. *Dent Res J.* 2011;8(Suppl 1):S21-9.
19. Reeve L, Baldrick P. Biocompatibility assessments for medical devices – evolving regulatory considerations. *Expert Review of Medical Devices.* 2017;14(2):161-167.
20. Gociu M, Patroi D, Prejmerean C, Pastrav O, Boboia S, Prodan D, et al. Biology and cytotoxicity of dental materials: an in vitro study. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie.* 2013;54(2):261-265.
21. De Moraes Porto ICC. *Polymer Biocompatibility* [Internet knjiga]. InTech, 2012. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/polymerization>.
22. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports.* 2015;3(5):617-620.
23. Ribeiro D, Quispe Yujra V. Genotoxicity Induced by Dental Materials: A Comprehensive Review. *Anticancer Res.* 2017;37(8):4017-4024.
24. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of dental materials:* Springer; 2009.

25. Oshida Y, Tuna EB, Aktören O, Gençay K. Dental Implant Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11(4):1580-1678.
26. Davarpanah M, Martinez H, Kebir M, Tecucianu JF. Priručnik dentalne implantologije. Zagreb: In.Tri d.o.o.; 2006. pp. 209-213.
27. Bosco R, Van Den Beucken J, Leeuwenburgh S, Jansen J. Surface modification of metal implants with plasma sprayed layers. *Coatings.* 2012;2(3):95-119.
28. Olmedo D.G, Paparella M.L, Brandizzi D, Cabrini R. L. Reactive lesions of peri-implant mucosa associated with titanium dental implants: A report of 2 cases. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2010;39:503–507.
29. Egusa H, Ko N, Shimazu T, Yatani H. Suspected association of an allergic reaction with titanium dental implants: A clinical report. *J. Prosthet. Dent.* 2008; 100:344–347.
30. Hallab N, Merritt K, Jacobs J. J, Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2001;83:428–436.
31. Tamai K, Mitsumori M, Fujishiro S, Kokubo M, Ooya N, Nagata Y, et al. A case of allergic reaction to surgical metal clips inserted for postoperative boost irradiation in a patient undergoing breast conserving therapy. *Breast Cancer* 2001;8:90–92.
32. Thomas P, Bandl W.D, Maier S, Summer B, Przybilla B. Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing, eczema, and T-cell hyper responsiveness in vitro: Case report and review of the literature. *Contact Dermat.* 2006;55:199–202.
33. Haug R.H. Retention of asymptomatic bone plates used for orthognathic surgery and facial fractures. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1996;54:611–617.
34. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cyto assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res.* 2013;753(2):100-113.
35. Visalli G, Baluce B, La Maestra S, Micale RT, Cingano L, De Flora S, et al. Genotoxic damage in the oral mucosa cells of subjects carrying restorative dental fillings. *Arch Toxicol.* 2013;87(1):179-187.

36. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol.* 2011;682:235-248.
37. Kashyap B, Reddy PS. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J cancer res ther.* 2012;8(2):184-191.
38. Yadav A.S JS. Buccal Micronucleus Cytome Assay-A Biomarker of Genotoxicity. *J Mol Biomark Diagn.* 2015;6(3):6.
39. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659(1-2):93-108.
40. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69-77.
41. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols.* 2009;4(6):825–837.
42. Torres-Bugarin O, Zavala-Cerna MG, Nava A, Flores-Garcia A, Ramos-Ibarra ML. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis Markers.* 2014;2014:956835.
43. Ankylos | Dentsply Sirona [Internet]. *Dentsplysirona.com.* 2020 [citirano 21.6.2020]. Dostupno na: <https://www.dentsplysirona.com/en-us/categories/implantology/ankylos.html>
44. Superline | Products | Dentium [Internet]. *Dentiumusa.com.* 2020 [citirano 21.6.2020.]. Dostupno na: <http://dentiumusa.com/products/dental-implant/superline.htm>
45. Cacaci C, Ackermann KL, Barth T, Kistler S, Stiller M, Schlee M. A non-interventional multicenter study to document the implants success and survival rates in daily dental practices of the CONELOG screw-line implant. *Clin Oral Investig.* 2019;23(6):2609–2616.
46. M. Kirsch-Volder, I. Decordier, A. Elhajouji1, G. Plas, M.J. Aardema, M. Fenech. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis.* 2011;26:177–184.



47. Souza JCM, Henriques M, Teughels W, Ponthiaux P, Celis JP, Rocha LA. Wear and corrosion interactions on titanium in oral environment: literature review. *J Bio Tribo Corros*. 2015;1:1-13.
48. Landolt D. Electrochemical and materials aspects of tribocorrosion systems. *J Phys D*. 2006;39:3121-3127.
49. Cruz HJ, Souza JCM, Henriques M, Rocha LA. Tribocorrosion and BioTribocorrosion in the Oral Environment: the Case of Dental Implants. In: Paulo Davim J, ed. *Biomedical Tribology*. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2011;1-33.
50. Brogini N, McManus LM, Hermann JS, et al. Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. *J Dent Res*. 2006;85:473-478.
51. Celis JP, Ponthiaux P, Wenger F. Tribo-corrosion of materials: interplay between chemical, electrochemical, and mechanical reactivity of surfaces. *Wear*. 2006;261:939-946.
52. Triplett RG, Froberg U, Sykaras N, Woody RD. Implant materials, design, and surface topographies: their influence on Osseointegration of dental implants. *J Long Term Eff Med Implants*. 2003;13:485-501.
53. Smith DC. Dental implants: materials and design considerations. *Int J Prosthodont*. 1993;6(2):106-117.
54. Anusavice JK, Shen C, Rawls HR. Dental implants. In: Anusavice JK, Shen C, Rawls HR, eds. *Phillips' Science of Dental Materials (12 edn)*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2013;715-736.
55. Allsobrook O.F.L, Leichter J, Holborow D, Swain M. Descriptive study of the longevity of dental implant surgery drills. *Clin. Implant Dent. Relat. Res*. 2011;13:244-254.
56. Carvalho A.C, Queiroz T.P, Okamoto R, Margonar R.L, Garcia I.R., Filho O.M. Evaluation of bone heating, immediate bone cell viability, and wear of high-

resistance drills after the creation of implant osteotomies in rabbit tibias. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2011;26:1193–1201.

57. Cooley R.L, Marshall T.D, Young J.M, Huddleston A.M. Effect of sterilization on the strength and cutting efficiency of twist drills. *Quintessence Int.* 1990; 21:919–923.

58. Harris B.H, Kohles S.S. Effects of mechanical and thermal fatigue on dental drill performance. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2001;16:819–826.

59. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology.* 2007;25(1):9-18.

60. Wachi T, Shuto T, Shinohara Y, Matono Y, Makihira S. Release of titanium ions from an implant surface and their effect on cytokine production related to alveolar bone resorption. *Toxicology.* 2015;327:1-9.

61. Makihira S, Mine Y, Nikawa H, et al. Titanium ion induces necrosis and sensitivity to lipopolysaccharide in gingival epithelial-like cell. *Toxicology.* 2010;24:1905-1910.

62. McLoed A, Sherrill T, Cheng D, Han W, Saxon J, Gleaves L et al. Neutrophil-Derived IL-1 $\beta$  Impairs the Efficacy of NF- $\kappa$ B Inhibitors against Lung Cancer. *Cell Reports.* 2016;16(1):120-132.

63. Tateyama F, Yamabe H, Osawa H, Kaizuka M, Shirato K, Okumura K. Interleukin-1 $\beta$  is an autocrine growth factor of rat glomerular epithelial cells in culture. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2001;16(6):1149-1155.

64. Lucena G, de Molon R, Moretti A, Shibli J, Rêgo D. Evaluation of Microbial Contamination in the Inner Surface of Titanium Implants Before Healing Abutment Connection: A Prospective Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018;33(4):853-862.

65. Song B, Zhang Y, Chen L, Zhou T, Huang W, Zhou X et al. The role of Toll-like receptors in periodontitis. *Oral Diseases.* 2016;23(2):168-180.

66. Eskan M, Benakanakere M, Rose B, Zhang P, Zhao J, Stathopoulou P et al. Interleukin-1 $\beta$  Modulates Proinflammatory Cytokine Production in Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 2008;76(5):2080-2089.
67. Karahalil B, Kadioglu E, Tuzuner-Oncul A, Cimen E, Emerce E, Kisinisci R. Micronucleus assay assessment of possible genotoxic effects in patients treated with titanium alloy endosseous implants or miniplates. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2014;760:70-72.
68. Ribeiro D, Matsumoto M, Padovan L, Marques M, Salvadori D. Genotoxicity of Corrosion Eluates Obtained From Endosseous Implants. *Implant Dentistry*. 2007;16(1):101-109.
69. Camacho-Alonso F, Sánchez-Siles M, Gilbel-del Águila O. No Evidence of Genotoxic Damage in a Group of Patients with Titanium Dental Implants and Different Metal Restorations in the Oral Cavity. *Clin implant dent r*. 2013;17(4):811-821.
70. Mano SS, Kanehira K, Taniguchi A. Comparison of cellular uptake and inflammatory response via Toll-Like Receptor 4 to lipopolysaccharide and titanium dioxide nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2013;14:13154-13170.
71. Ribeiro AR, Gemini-Piperni S, Travassos R, et al. Trojan-like internalization of anatase titanium dioxide nanoparticles by human osteoblast cells. *Sci Rep*. 2016;6:23615.
72. Okuda-Shimazaki J, Takaku S, Kanehira K, Sonezaki S, Taniguchi A. Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. *Int J Mol Sci*. 2010;11:2383-2392.
73. J.C. Medeiros, D.A. Cornelio, N. Bezerra, C.E. Bezerra, J.D. Freires, J. Carvalho, C. Alves, S.R. Batistuzzo, Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. *Toxicology*. 2009;262:138–145.
74. Wang JJ, Sanderson BJS, Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res*. 2007;628:99-106.

75. Maloney WJ, Smith RL, Castro F, Schurman DJ. Fibroblast response to metallic debris in vitro. Enzyme induction cell proliferation, and toxicity. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75:835-844.
76. Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M, Totsuka Y. Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. *Biomaterials.* 2002;23:3757-3764.
77. Sidambe AT. Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants - a review. *Materials (Basel).* 2014;7:8168–88.
78. Albrektsson TZG, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1986;1:11–25.
79. Berglund F, Carlmark B. Titanium, sinusitis, and the yellow nail syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2011;143:1–7.
80. Samman PD, White WF. The “yellow nail” syndrome. *Br J Dermatol.* 1964;76:153–157.
81. Varney VA, Cumberworth V, Sudderick R, Durham SR, Mackay IS. Rhinitis, sinusitis and the yellow nail syndrome: a review of symptoms and response to treatment in 17 patients. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1994;19:237–240.
82. Piraccini BM, Urciuoli B, Starace M, Tosti A, Balestri R. Yellow nail syndrome: clinical experience in a series of 21 patients. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014;12:131–137.

## **8. SAŽETAK**

**Naslov diplomskog rada:** Procjena genotoksičnosti i citotoksičnosti dentalnih implantata na gingivnim epitelnim stanicama

**Cilj istraživanja:** Iako se titan (Ti) temeljeni dentalni implantati smatraju bioinertnima, potvrđeno je kao su podložni koroziji i trošenju. Cilj ove in vivo provedene studije bio je procijeniti genotoksičan potencijal dviju vrsta dentalnih implantata u gingivnim epitelnim stanicama.

**Materijali i metode:** U 78 ispitanika uzeti su uzorci oljuštenih gingivnih stanica tri puta. Prije postavljanja dentalnih implantata (T0), 90 dana nakon implantacije - neposredno prije postavljanja gingiva formera (T1) te 21 dan od postavljanja gingiva formera (T2). DNK oštećenje je procjenjivano mikronukleus testom.

**Rezultati:** Dobiveni rezultati pokazuju kako nakon postavljanja obje vrste ispitivanih dentalnih implantata (Ankylos i Dentium) dolazi do značajnog povećanja broja binuklearnih stanica u odnosu na početne vrijednosti (T0 naspram T1;  $p = 0,011$  i  $p \leq 0,001$ ). Također u odnosu na početne vrijednosti, nakon postavljanja gingiva formera (T0 naspram T3) kod ispitanika dolazi do značajnog povećanja broja stanica s mikronukleusom ( $p = 0,007$  i  $p = 0,022$ ) i binuklearnih stanica ( $p = 0,006$  i  $p \leq 0,001$ ).

**Zaključak:** Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti kako titan temeljeni dentalni implantati ne izazivaju citotoksične i genotoksične učinke u gingivnim stanicama nakon postavljanja. Uočeni blagi učinci ne mogu se smatrati biološki relevantnima.

## **9. SUMMARY**

**Title:** Genotoxicity assessment of dental implants in gingival epithelial cells

**Objective:** Although titanium (Ti) based implants are considered bioinert, it has been found that they can undergo corrosion and wear. The aim of this in vivo study was to evaluate genotoxic potential from two different implants in gingival epithelial cells.

**Material and methods:** Exfoliated gingival cells were taken from 78 participants at three time points: before implant insertion (T0), 90 days following dental implant insertion and immediately before gingiva former placement (T1), and 21 days following the placement of gingiva former (T2). DNA damages were analyzed using the micronucleus test.

**Results:** Obtained average cytogenetic damage values in individuals after implementation of both tested dental implants, Ankylos and Dentium showed a significant increase in the number of binuclei (T0 vs T1;  $p=0.011$  and  $p \leq 0.001$ ). Initial values, compared to the values after gingiva former placement (T0 vs T3) showed that frequency of cells with micronuclei ( $p = 0.007$  and  $p = 0.022$ ) and binuclei ( $p= 0.006$  and  $p \leq 0.001$ ) was significantly higher 21 days following gingiva former placement.

**Conclusion:** Based on the results, it can be concluded that there is no Ti based implants dependent cytotoxic or genotoxic effect in gingival epithelial cells. Detection of slightly increased cytogenetic damages cannot be assessed as the biologically relevant.

**Keywords:** dental implants; DNA damage; genotoxicity; gingiva; micronucleus test



## **10. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podatci:**

Ime i prezime: Mirna Radović

E-mail: mirna.radovic95@gmail.com

Datum i mjesto rođenja: 20. kolovoza 1995., Split

Državljanstvo: Republike Hrvatske

Obrazovanje:

- 2010.- 2014. god. III. gimnazija u Splitu
- 2014.- 2020. god. Medicinski fakultet u Splitu – integrirani studij Dentalna medicina

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici:

- C1 razina engleskog jezika
- B2 razina njemačkog jezika

Aktivnosti:

- demonstratorica na Katedri za histologiju i embriologiju u ak. god. 2015./2016.
- demonstratorica na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju u ak. god. 2016./2017.
- potpredsjednica studentske organizacije „Zubolina“
- članica uredništva studentskoga časopisa „DentiST“
- članica Studentskoga zbora Medicinskog fakulteta u Splitu
- članica Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta u Splitu iz predstavnika studenata
- 2019. god. izlaganje rada na 8. Međunarodnom kongresu hrvatskoga društva za implantologiju i objava kongresnoga sažetka

Nagrade:

- 2010. god. dobitnica stipendije Grada Splita za uspješne učenike
- 2013. god. dobitnica nagrade ISABS High School Young Investigator Prize
- 2014. god. dobitnica stipendije Grada Splita za uspješne studente
- dobitnica Dekanove nagrade za uspjeh u ak. god. 2014./2015.
- dobitnica Rektorove nagrade za izvrsnost u ak. god. 2015./2016.
- dobitnica Rektorove nagrade za izniman uspjeh u javnom nastupu, djelovanju, sudjelovanju i uspjehu u ak. god. 2017./2018. za provedbu i realizaciju međunarodnoga skupa „Praktična znanja za studente“

- predavač na Festivalu znanosti Split 2019. godine „Koliko su moji zubi bijeli – mitovi i činjenice o boji zuba“