

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Magda Trinajstić Zrinski

**ISPITIVANJE STUPNJA KONVERZIJE I
GENOTOKSIČNOSTI
KONVENCIONALNIH I BIOAKTIVNIH
ORTODONTSKIH ADHEZIVNIH
SUSTAVA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Magda Trinajstić Zrinski

**ISPITIVANJE STUPNJA KONVERZIJE I
GENOTOKSIČNOSTI
KONVENCIONALNIH I BIOAKTIVNIH
ORTODONTSKIH ADHEZIVNIH
SUSTAVA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Stjepan Špalj

Komentor: Prof. dr. sc. Davor Želježić

Rijeka, 2018.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Magda Trinajstić Zrinski

**ASSESSMENT OF THE DEGREE OF
CONVERSION AND GENOTOXICITY OF
CONVENTIONAL AND BIOACTIVE
ORTHODONTIC ADHESIVE SYSTEMS**

DOCTORAL THESIS

Mentor: Associate Professor Stjepan Špalj, PhD

Co-mentor: Professor Davor Želježić, PhD

Rijeka, 2018

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Stjepan Špalj

Komentor rada: Prof. dr. sc. Davor Želježić

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Alen Braut
2. Izv. prof. dr. sc. Vesna Benković
3. Prof. dr. sc. Srećko Valić
4. Izv. prof. dr. sc. Stjepan Špalj
5. Prof. dr. sc. Davor Želježić

Rad ima 160 listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Ovo istraživanje provedeno je u suradnji s Institutom za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zavodom za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i Stomatološkim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu te Odjelom za medicinu, kirurgiju i zdravstvene studije Sveučilišta u Trstu.

Financijska pomoć istraživanju osigurana je projektom Sveučilišta u Rijeci „Bioaktivni dentalni materijali – modulacija aktivne matrice radi unapređenja kliničke učinkovitosti i redukcije oštećenja DNK“ (18.07.2.2.03.) voditeljice Višnje Katić te projektom Hrvatske zaklade za znanost „Prosudba novih bioaktivnih materijala i postupaka u restaurativnoj dentalnoj medicini“ voditeljice Zrinke Tarle.

Iskreno zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Snežani Miljanić, doc. dr. sc. Danijeli Marović, prof. dr. sc. Zrinki Tarle, dr. sc. Dragi Škrtiću, doc. dr. sc. Kristini Peroš, dr. sc. Gianluki Turcu, prof. dr. sc. Luki Contardu, prof. dr. sc. Stipanu Jonjiću i prof. dr. sc. Jeleni Tomac što su mi svojim znanjem, savjetima i resursima omogućili ostvarenje ovog istraživanja.

Komentoru prof. dr. sc. Davoru Želježiću zahvaljujem na susretljivosti, pomoći i beskonačnome strpljenju koje je pokazao podučavajući me laboratorijskome radu.

Mentoru izv. prof. dr. sc. Stjepanu Špalju hvala što je vjerovao u mene, motivirao me i uvijek mi bio uzor u posvećenosti, radišnosti i znanstvenoj radoznalosti.

Najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji, suprugu Kristijanu i kćeri Petri na strpljenju i humoru kojima su me pratili, kao i roditeljima Marinu i Marini te bratu Andriji na moralnoj podršci.

Petri

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati fizikalna svojstva i biološki učinak komercijalnih i eksperimentalnih ortodontskih adhezivnih sustava u ovisnosti o trajanju osvjetljavanja polimerizacijskim svjetlom.

Uzorci adheziva, kompozita i njihovih kombinacija pripremljeni su u simulaciji kliničkog postupka. Stupanj konverzije dvostrukih u jednostruke veze između ugljikovih atoma određen je FTIR spektroskopijom neposredno nakon polimerizacije. Mikrotvrdoća uzoraka određena je metodom po Vickersu odmah po polimerizaciji te nakon mjesec dana uranjanja u umjetnu slinu pH 4,8. Za procjenu genotoksičnog učinka na humanim limfocitima periferne krvi korišteni su citohalazinom B blokirani mikronukleus test te komet test.

Svi su adhezivni sustavi pokazali veći stupanj konverzije nakon 20 sekundi osvjetljavanja. Materijali s većim udjelom Bis-GMA imali su niži stupanj konverzije od onih s većim udjelom Bis-EMA, TEGDMA i UDMA. Generalno, mikrotvrdoća se smanjila nakon uranjanja u umjetnu slinu te je slabo linearno pozitivno korelirala sa stupnjem konverzije ($r=0,254$; $p=0,002$). Eksperimentalni kompoziti sa sadržajem amorfnog kalcijevog fosfata (ACP40) i fluorida pokazali su izuzetno malu mikrotvrdoću.

Ispitivani materijali nisu uzrokovali značajno povećanje broja mikronukleusa. Uz kontrolu vremena osvjetljavanja, stupnja konverzije, prisutnosti fluorida, zastupljenosti komponenti adhezivnog sustava (samo kompozit, samo adheziv ili kombinacija), jedina značajna odrednica prisustva jezgrinih pupova u logističkoj regresiji bio je bioaktivni ACP40 koji povećava izgled za nastanak pupova za 1,4x (CI 1,1-1,8; $p=0,005$). Vrijeme osvjetljavanja, stupanj konverzije, prisutnost fluorida te sadržaj amorfnog kalcijevog fosfata nisu bili značajne odrednice pojave mikronukleusa. Komet test je pokazao nasumične varijacije u parametrima primarnog oštećenja DNK, ali one nisu bile statistički značajne.

Osvjetljavanje od 20 sekundi povoljnije je za postizanje većeg stupnja konverzije, ali ne utječe na genotoksičnost ortodontskih adhezivnih sustava. Ispitivani materijali nisu pokazali biološki relevantnu genotoksičnost.

Ključne riječi: Amorfní kalcijev fosfat; Fluoridi; Kompozitne smole; Ortodoncija; Polimerizacija; Testovi genotoksičnosti.

SUMMARY

Title: Assessment of the degree of conversion and genotoxicity of conventional and bioactive orthodontic adhesive systems

Objectives: To investigate the physical properties and biological effect of commercial and experimental orthodontic adhesive systems in relation to the duration of illumination by polymerisation light.

Material and methods: Samples of adhesives, composites and their combinations were prepared in a simulation of the clinical procedure. The DC of double into single bonds between carbon atoms was analysed by FTIR spectroscopy immediately after polymerisation. The Vickers method was used to determine the microhardness of samples after polymerisation and after one month of immersion in artificial saliva of pH 4.8. The cytokinesis-block micronucleus assay and comet assay were used in the assessment of genotoxicity.

Results: All adhesive systems showed a higher DC after 20 seconds of illumination. Materials with a higher content of Bis-GMA showed a lower DC than those with a higher content of Bis-EMA, TEGDMA and UDMA. Microhardness decreased after immersion in artificial saliva and showed a weak linear positive correlation with the degree of conversion ($r=0.254$; $p=0.002$). Experimental composites containing amorphous calcium phosphate (ACP40) and fluorides had very low microhardness. The tested materials did not induce increased formation of micronuclei. Controlling for illumination time, DC, presence of fluorides, presence of adhesive system component, the only significant predictor of nuclear buds (NB) in regression analysis was the bioactive composite ACP. It increased the odds for NB formation by 1.4x (CI 1.1-1.8; $p=0.005$). Illumination time, DC, content of fluoride or amorphous calcium phosphate were not significant predictors of micronuclei formation. The comet assay showed random variations in parameters of primary DNA damage that were not significant.

Conclusion: Illuminating for 20 seconds allows for higher DC while not affecting the genotoxicity of orthodontic adhesive systems. The tested materials did not show biologically relevant genotoxicity.

Key words: Amorphous calcium phosphate; Composite Resin; Fluorides; Genotoxicity Tests; Orthodontics; Polymerization.

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1.	Povijesni pregled	1
1.2.	Inicijalni karijes kao nuspojava terapije edgewise napravom	3
1.3.	Sastav konvencionalnih ortodontskih adhezivnih sustava	7
1.4.	Bioaktivni i biointeraktivni kompoziti	10
1.5.	Polimerizacija i stupanj konverzije ortodontskih adezivnih sustava	13
1.6.	Ispitivanje biokompatibilnosti dentalnih materijala	15
1.6.1.	Komet test	18
1.6.2.	Citohalazinom B blokirani mikronukleus test	20
1.7.	Degradacija kompozita i toksičnost monomera	22
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3.	MATERIJALI I METODE	26
3.1.	Materijal	26
3.1.1.	Formulacija eksperimentalnih kompozita	26
3.1.2.	Kompoziti, adhezivi i njihove kombinacije	26
3.2.	Metode	30
3.2.1.	Izrada uzoraka	30
3.2.2.	Određivanje stupnja konverzije ortodontskih adhezivnih sustava	31
3.2.3.	Mjerenje mikrotvrdoće kombinacija adheziva i kompozita	33
3.2.4.	Citohalazinom B blokirani mikronukleus test	34
3.2.5.	Komet test na limfocitima periferne krvi čovjeka	35
3.3.	Statistička obrada podataka	36
4.	REZULTATI	38
4.1.	Analiza stupnja konverzije kompozita, adheziva i njihovih kombinacija	38
4.2.	Analiza mikrotvrdoće kombinacija adheziva i kompozita	57
4.3.	Korelacije stupnja konverzije i mikrotvrdoće kombinacija kompozita i adheziva	64
4.4.	Citotoksični i genotoksični učinci kompozita, adheziva i njihovih kombinacija <i>in vitro</i>	70
4.4.1.	Citotoksičnost kompozita, adheziva i njihovih kombinacija	70
4.4.2.	Razlike u rezultatima citohalazinom B blokiranog mikronukleus testa obzirom na vrijeme osvjetljavanja	73

4.4.3.	Razlike u rezultatima citohalazinom B blokiranog mikronukleus testa obzirom na vrstu materijala	82
4.4.4.	Korelacije stupnja konverzije i rezultata citohalazinom B blokiranog mikronukleus testa	94
4.4.5.	Regresijski modeli za predikciju pojave mikronukleusa i pupova	98
4.4.6.	Rezultati komet testa	100
5.	RASPRAVA	101
5.1.	Stupanj konverzije ortodontskih adhezivnih sustava i njihovih komponenti	101
5.2.	Mikrotvrdoća kombinacija kompozita i adheziva	104
5.3.	Korelacije stupnja konverzije i mikrotvrdoće ortodontskih adhezivnih sustava	106
5.4.	Genotoksičnost ortodontskih adhezivnih sustava i njihovih komponenti	107
5.5.	Korelacija stupnja konverzije i genotoksičnosti ortodontskih adhezivnih sustava	111
6.	ZAKLJUČCI	112
7.	LITERATURA	113
	ILUSTRACIJE	130
	Popis slika	130
	Popis tablica	133
	POPIS POKRATA	136
	ŽIVOTOPIS	138
	POPIS RADOVA	145

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Povijesni pregled

Osnovni cilj ortodonske terapije sadržan je u njezinu nazivu (grč. *orthos*, pravilan; *odous*, zub) – postizanje pravilnoga položaja zuba. Terapija se provodi iz triju glavnih razloga: poboljšanja estetike zuba i lica, ispravljanja okluzije te uklanjanja nepravilnih okluzijskih odnosa koji bi dugoročno mogli kompromitirati zdravlje zuba i njihovih potpornih tkiva [138]. Korekcija estetike (slika 1) može imati dalekosežne posljedice na psihosocijalnu kvalitetu života, što je posebno izraženo u adolescentnoj dobi [150]. Sve veća potražnja za ortodontskom terapijom u odraslih pacijenata [182] zahtijeva posebnu pažnju posvećenu parodontnome zdravlju [23, 75]. Zbog navedenoga, sveobuhvatni pristup u ortodontici teži ostvarivanju sklada između okluzije, funkcije žvakanja, govora i disanja, estetike lica i pacijentove kvalitete života [171], što se ostvaruje samostalnom ortodontskom terapijom ili interdisciplinarnim pristupom u koji su uključene druge specijalnosti medicine i dentalne medicine.

Od brojnih mobilnih i fiksnih ortodontskih naprava dizajniranih tijekom stoljeća, najveću kontrolu nad pomacima zuba omogućava fiksna naprava tipa *edgewise*, nazvana tako po svojstvenome postraničnom (engl. *edgewise*) umetanju žičanoga luka. Njezini se retencijski elementi bravice, prstenovi i cjevčice lijepe za zube adhezivnim sustavima i međusobno se povezuju žičanim lukom.



Slika 1. Estetika zubi prije i poslije ortodonske terapije.

Iako je prevalencija malokluzija (lat. *male*, loš; *occlusio*, zagriz) u današnje vrijeme, u rasponu od 35 do 75% [129, 177] značajno veća nego u Srednjemu vijeku te je posebice porasla nakon industrijske revolucije [50], problem nepravilno postavljenih zuba pratio je čovjeka još od paleolitika [142]. U antičkim etrušćanskim arheološkim nalazištima iz 7. stoljeća pr. Kr. otkrivene su zlatne prstenovane naprave

postavljene na zubima [39, 130]. Vjerojatnije je ipak da je njihova namjena bila isključivo estetska [58]. Brojni tekstovi koji su tijekom povijesti spominjali liječenje zuba, nisu govorili o ispravljanju njihovoga položaja. Tek je 1728. godine pionir dentalne medicine Pierre Fauchard izdao priručnik za dentalnu terapiju u kome je cijelo poglavlje posvetio malokluzijama [99], a ujedno je dizajnirao prvu napravu za širenje zubnoga luka.

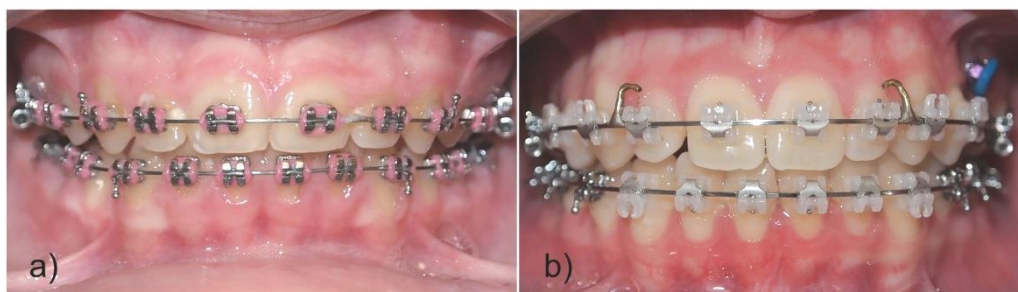
Amerikanac, Norman W. Kingsley, prvi je sustavno opisao ortodonciju i terapiju rascjepa nepca u svojoj knjizi „A Treatise on Oral Deformities“ izdanoj 1880. godine [83]. Međutim, najutjecajnija ličnost u njezinu razvoju i odvajanju u prvu samostalnu specijalističku disciplinu dentalne medicine nesporno je bio Kingsleyjev sunarodnjak Edward H. Angle [187], smatran i „ocem moderne ortodoncije“ [27]. Osim što je klasificirao malokluzije i definirao dijagnostičke postupke, Angle je osmislio i razvio različite fiksne ortodonske naprave. Sve su se sastojale od retencijskih elemenata postavljenih na pojedinačne zube i žičanoga luka vezanoga za retencijske elemente koji je producirao silu za pomak zuba. Kod trakastoga luka, retencijski su elementi bili prstenovi stegnuti oko svakoga zuba te su na prednjoj površini sadržavali bravicu u koju se s gornje strane postavljao luk. Modifikaciju trakastoga luka kod koje se žica u horizontalni utor bravice postavlja s bočne strane, Angle je predstavio 1928. godine, pod imenom *edgewise* naprava [171].

Fiksna ortodonska naprava *edgewise* tipa i danas je „zlatni standard“ u sveobuhvatnoj ortodonskoj terapiji, u nešto izmijenjenom obliku (slika 2). Do osamdesetih godina 20. stoljeća, jedini način za postavljanje metalne bravice na zub bio je posredstvom cirkumferentnoga zlatnog ili čeličnoga prstena na koji je bila zalemljena. Prstenovi su prekrivali veliki dio zuba, zadržavali su dentalni plak i bili su estetski teško prihvatljivi. Osim toga, pacijentu je nelagodu činilo postavljanje separatora nužnih za otvaranje interdentalnih prostora. Istraživanja novih, kompozitnih materijala, temeljenih na epoksidnim smolama ili metakrilatima, koji bi se koristili za lijepljenje bravica za caklinu zuba, započela su šezdesetih godina 20. stoljeća [61]. Zahtjevi su bili veliki: takvi su materijali trebali biti postojani u dinamičnim uvjetima usne šupljine i pokazati dovoljnu čvrstoću veze (odnosno, otpor posmičnome naprezanju) pred silama koje stvara žičani luk i žvačnim silama, i to tijekom dvije do tri godine, koliko je prosječno trajanje ortodonske terapije. Ujedno su se trebali lako uklanjati s cakline prilikom skidanja naprave. Tijekom sedamdesetih godina stvoreni su prvi

komercijalni adhezivni sustavi. Prva skupina polimerizirala se kemijski, miješanjem dviju komponenti, dok se druga polimerizirala osvjetljavanjem, najprije ultraljubičastim, a potom vidljivim svjetlom. Osim kompozitnih smola, razvijani su i staklenoionomerni cementi koji su pokazali značajno višu stopu neuspjeha [117] zbog lošijih mehaničkih svojstava te nisu ušli u široku kliničku primjenu.

U potrazi za boljim estetskim rješenjem, usporedno su razvijane bravice bijele boje, od polikarbonata i keramike. Iako su polikarbonatne bravice financijski značajno povoljnije od keramičkih, imaju slaba mehanička svojstva, što dovodi do deformacije utora i češćeg pucanja [112]. Klinički zadovoljavajuća čvrstoća veze između cakline i metalne brave posredovana adhezivom konačno je ostvarena nakon što je 1979. godine uveden mrežasti dizajn baze metalne brave kojim je retencijska površina višestruko povećana [61].

Istovremeno, razvoj novih legura omogućio je izradu žičanih lukova koji su proizvodili blage kontinuirane sile idealne za pomak zuba.



Slika 2. Fiksna naprava *edgewise* tipa s a) metalnim i b) keramičkim bravicama.

1.2. Inicijalni karijes kao nuspojava terapije *edgewise* napravom

Više od 700 različitih bakterijskih vrsta čini oralnu mikrofloru [108], a samo je manji dio patogen za tvrda zubna tkiva [70]. Bakterije su na tvrdim neljuštećim površinama u usnoj šupljini organizirane u biofilm čije formiranje započinje neposredno nakon čišćenja zuba. Tijekom sati i dana biofilm naseljavaju različite vrste te se promjenom sastava plaka mijenja i njegovo djelovanje na minerale cakline i dentina. Marsh je 1994. godine postavio danas općeprihvaćenu ekološku hipotezu plaka [106]

koja patološke procese pripisuje promijenjenoj ravnoteži relativnoga broja bakterija pod utjecajem čimbenika iz okoliša poput nutrijenata i pH. Broj aciduričnih bakterijskih vrsta raste pri dugotrajno niskome pH prisutnome zbog fermentacije šećera iz prehrane. Osim toga, same bakterije mijenjaju svoj mikrookoliš te su neke vrste posebno acidogene, čime posredno uzrokuju smanjenje broja blagotvornih bakterijskih vrsta osjetljivih na kiselu okolinu. Primjerice, *Streptococcus mutans* modulira stvaranje kariogenog biofilma [107] te je njegov udio u plaku povećan u pacijenata s karijesom [70].

U zrelome plaku prisutni su anaerobni uvjeti u kojima glikoliza ne rezultira potpunom razgradnjom piruvata, nego produkcijom mliječne i drugih organskih kiselina. Vodikovi ioni prodiru u caklinu i dovode do otpuštanja Ca^{2+} i $(\text{PO}_4)^{3-}$ iz kristala hidroksilapatita u sastavu caklinskih prizmi. Istovremeno se na površini cakline odvijaju procesi reparacije koji njezin vanjski sloj održavaju dobro mineraliziranim, dok u središtu caklinske lezije gubitak minerala može napredovati i do 38% prije njezinog urušavanja i stvaranja kavitacije [172]. Obzirom na izravnu povezanost mineralizacije i prozirnosti cakline [167], klinički se takav inicijalni karijes prikazuje kao mutna bijela mrlja na površini zuba. Ona se može djelomično remineralizirati ionima kalcija i fosfata iz sline i tada ostaje estetski problem, međutim, ako dođe do pojave kavitacije i širenja karijesa na dentin, potrebno je odstraniti patološki promijenjeno tkivo i gubitak restaurirati ispunom. Iako se kritičnim za početak demineralizacije cakline smatra pH od 5,5, taj proces uvelike ovisi o sastavu sline te je vjerojatnije da pH manje utječe na opseg, a više na brzinu demineralizacije. Ioni fluora djeluju dvojako: inhibiraju demineralizaciju adsorpcijom na površinu kristala za vrijeme niskoga pH [22] te remineraliziraju caklinu tako da precizno popune mjesto odstranjenih OH^- iona u kristalnoj rešetki, stvarajući fluorapatit, koji će biti otporniji na djelovanje kiselina [172]. Fluoridi se desetljećima koriste topikalno u niskim koncentracijama u prevenciji karijesa. U novije vrijeme uvedena su sredstva bazirana na kalcijevome fosfatu u kristalnom ili amorfnom obliku [33].

Još 1908. godine G. V. Black je pokazao kako se na caklini neprekinuto izloženoj plaku, nakon samo dva tjedna, razviju vidljive bijele mrljaste lezije [15]. Jedna je studija pokazala kako je plak na caklini s bijelim mrljastim lezijama, koje su se razvijale tijekom sedam tjedana, drugačijega sastava od plaka na zdravoj caklini, a neki od rodova povezanih s karijesom bili su *Streptococcus* i *Lactobacillus* [179].

Navedeno istraživanje također ide u prilog ekološkoj hipotezi plaka obzirom da je njezin eksperimentalni dizajn, u kome su na premolare predviđene za ekstrakciju iz ortodontskih razloga postavljeni prstenovi za retenciju plaka, narušio ravnotežu između plaka i domaćina, uzrokujući proliferaciju kariogenih vrsta.

Ne iznenađuje, stoga, kako su bijele mrljaste lezije jedna od najčešćih nuspojava ortodontske terapije fiksnim napravama (slika 3). Svojim nepravilnim oblikom bravice i žice *edgewise* naprave pogoduju zadržavanju plaka, ograničavaju djelovanje sline i miškulature obraza i usana u samočišćenju zuba te otežavaju održavanje oralne higijene četkanjem. U terapiji se često pridruženo koriste i razni drugi elementi u obliku lukova, opruga ili miniimplantata koji povećavaju složenost morfologije naprave. Nakon postavljanja fiksne naprave, mijenja se sastav plaka te se povećava udio *S. mutans* [14, 98] stoga karijes u takvih pacijenata brže napreduje [97]. Procjene prevalencije bijelih mrljastih lezija kreću se do čak 97% pacijenata koji su u terapiji *edgewise* napravom bili prosječno dvije godine [16]. Druga istraživanja pokazala su prevalenciju od 24 do 36% nakon 6 mjeseci te 28 do 46% nakon 12 mjeseci terapije, dok je u kontrolnih skupina ona bila značajno niža, 11 do 13% [28, 97]. Lezije se mogu javiti na svim dijelovima krune zuba, a najčešće između bravice i gingivnog ruba [80] te prosječno prekrivaju oko 10% labijalne površine zuba [28], perzistirajući godinama nakon završetka ortodontske terapije i uzrokujući značajne estetske probleme [122]. Najviša je incidencija na gornjim centralnim incizivima, što je vjerojatno posljedica slaboga toka sline u toj regiji [68], zbog čega je ograničeno i djelovanje topikalnih remineralizacijskih sredstava [124].



Slika 3. Bijele mrljaste lezije zuba.

Iako se strogim režimom četkanja zuba i korištenjem remineralizacijskih otopina može spriječiti pojava bijelih mrljastih lezija, uspjeh tih metoda uvjetovan je suradnjom koja je umjerena ili loša u tri četvrtine pacijenata [68]. U jednome prospektivnom istraživanju upravo je razina vidljivoga plaka netom po lijepljenju bravica bila najbolja odrednica prisutnosti bijelih mrljastih lezija prilikom skidanja naprave [123]. Vjerojatno je da oni pacijenti koji ne slijede upute o oralnoj higijeni neće savjesno svakodnevno koristiti niti remineralizacijske otopine [62]. Profesionalna aplikacija lakova visoke koncentracija fluorida prilikom ortodontskih kontrolnih pregleda mogla bi reducirati demineralizaciju, ali takvi su postupci skupi i nedovoljno učestali [14]. Obzirom da nesprestano raste broj pacijenata koji se odlučuju za ortodontsku terapiju fiksnim napravama, neki autori smatraju kako će bijele mrljaste lezije prerasti u javnozdravstveni problem [136].

Jedan od nedostataka kompozitnih materijala općenito, pa tako i onih koji se koriste za lijepljenje bravica, jest polimerizacijsko skupljanje koje može dovesti do pojave pukotine na spoju s caklinom, niše u kojoj su bakterije zaštićene od mehaničkoga čišćenja i djelovanja antiseptika [166]. Hrapava površina kompozita omogućuje jače bakterijske adhezijske veze nego caklina ili nehrđajući čelik, što može dodatno otežati njihovo uklanjanje iz područja oko brave [116]. U nastojanju da se djeluje na bijele mrljaste lezije, razvijeni su ortodontski kompoziti s fluoridima koji bi zaštitno djelovali na caklinu. Takvi kompoziti pokazuju jakost veze usporedivu s konvencionalnim kompozitima bez fluorida [131], no njihova učinkovitost u remineralizaciji cakline još nije dokazana [139], iako novija istraživanja ukazuju na moguću zaštitnu ulogu [134]. Problem je takvih materijala brzi pad koncentracije fluorida nakon postavljanja u usnu šupljinu, kao i slab potencijal ponovnoga punjenja iz sline [14]. S druge strane, fluoridi pokazuju citotoksično djelovanje indukcijom oksidacijskoga stresa, oštećenjem vanjske mitohondrijske membrane i poremećajem staničnoga metabolizma [11].

Osim fluorida, remineralizacijska svojstva pokazuje i amorfni kalcijev fosfat (ACP) koji se istražuje u sastavu eksperimentalnih kompozita [102, 104, 160].

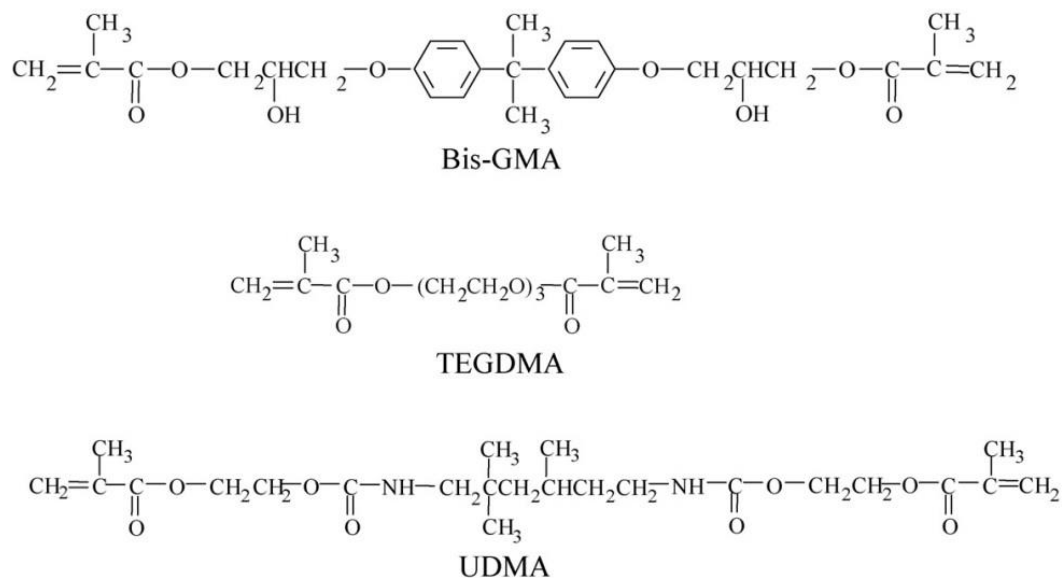
1.3. Sastav konvencionalnih ortodontskih adhezivnih sustava

Sile kohezije djeluju na vrlo malim udaljenostima između dvaju materijala u međusobnome kontaktu. Obzirom da je na mikroskopskoj razini površina većine krutina hrapava i nepravilna, kohezijske sile mogu djelovati samo u malom udjelu ukupne površine, u kome uistinu postoji molekularni kontakt. Adheziv je, u širokom smislu, tekuće sredstvo primjerene viskoznosti koje djeluje kao posrednik, prodire u porozitete na površini obaju materijala i suprotstavlja se malim vlačnim silama. Kako bi postao otporan i na posmične sile, adheziv se mora pretvoriti u krutinu [20].

Ortodontski adhezivni sustavi sastoje se od krute komponente (kompozita u užemu smislu) i tekuće komponente (adheziva u užemu smislu). Općenito govoreći, kompozit je svaki sintetski materijal koji se sastoji od više od jedne sastavnice čija su zajednička svojstva bolja nego zbroj svojstava svake pojedine komponente [20].

Ortodontski kompoziti proizvedeni su na osnovi dentalnih kompozita, korištenih za restauraciju tvrdih zubnih tkiva. Sastoje se od organske smolaste matrice u volumnom udjelu 35-50%, anorganskoga punila u udjelu 50-75%, svezujućega posrednika (silana) te inicijatora polimerizacije. Formulacije organske matrice koje sadrže monomere bisfenol-A-glicidil-dimetakrilata (Bis-GMA) kao bazni monomer pokazuju brzu polimerizaciju i malo polimerizacijsko skupljanje [40, 128]. Istovremeno, visoka viskoznost ove molekule onemogućava inkorporiranje velikog udjela punila, potrebnoga za postizanje dobrih mehaničkih svojstava [93]. Stoga se osim Bis-GMA koriste i uretan-dimetakrilat (UDMA) ili etoksilirani bisfenol-A-glicidil-dimetakrilat (Bis-EMA) koji imaju gotovo jednake molekulске težine, ali su manje viskozni. Baznom se monomeru dodaje trieten-glikol-dimetakrilat (TEGDMA) kao diluent koji će smanjiti viskoznost i omogućiti veću konverziju u polimer [40]. Nedostatak TEGDMA je veće polimerizacijsko skupljanje i apsorpcija vode [76], što kompozit čini manje postojanim u usnoj šupljini. Polimerizacijsko skupljanje dijelom je posljedica konverzije međumolekulskih udaljenosti od 0,3-0,4 nm u kovalentne veze dugačke oko 0,15 nm, a dijelom posljedica promjena u konformaciji lanaca polimera prilikom vezivanja. Razlike u polimerizacijskome skupljanju između baznih monomera ovise o molekularnoj masi te je skupljanje veće kod manjih molekula (slika 4) [128]. Adhezivni sloj između bravice i zuba vrlo je tanak, promjene njegovih dimenzija su malene i nisu kritične za čvrstoću veze, međutim, lateralno polimerizacijsko skupljanje može dovesti

do dovoljnoga naprezanja materijala i uzrokovati otpadanje bravice sa zuba. S druge strane, vremenom može doći do postupne ekspanzije materijala zbog apsorpcije vode iz sline, čime se djelomično kompenzira skupljanje [20].



Slika 4. Kemijska struktura monomera Bis-GMA, TEGDMA i UDMA. Preuzeto iz reference [12].

Sama organska matrica nema dovoljno dobre mehaničke karakteristike da bi ispunjavala ulogu adhezivnoga sredstva. U nju se dodaje anorgansko punilo koje smanjuje polimerizacijsko skupljanje, termalnu ekspanziju i apsorpciju vode te povećava snagu i modul elastičnosti [36]. Punilo su sastavom silikati poput litij-aluminijevoga silikata, a koriste se i radioopakna stakla koja sadrže barij, stroncij i cink. Čestice punila nepravilnoga su oblika, što osigurava njihovu bolju retenciju unutar matrice. Velike čestice omogućavaju bolju čvrstoću i krutost, ali uzrokuju i veliku površinsku hrapavost. U ortodonciji je površinska hrapavost problem prilikom skidanja *edgewise* naprave, kada je potrebno ispolirati površinu cakline. U modernim hibridnim kompozitima punilo se promjerom kreće u velikom rasponu od 0,04 do 5 μm [20], čime se postiže ravnoteža između poželjnih i nepoželjnih svojstava čestica pojedinih dimenzija. Otpornost na abraziju i druga mehanička svojstva ovise o prostornome rasporedu čestica. Veliki volumni udio punila u kompozitu omogućen je tehnikom proizvodnje koja inkorporira silikat u monomer, polimerizira ga i samelje te takvo punilo

dodaje u novu monomernu matricu [20]. Dok je silikatno staklo hidrofilno, smolasta matrica je hidrofobna, stoga se za njihovo kemijsko povezivanje koriste svezujuća sredstva silani [111].

U tehnici potpunoga jetkanja koja se koristi za lijepljenje bravica, na dio cakline na koji će se postaviti bravica nanosi se 37% ortofosforna kiselina koja demineralizira njezin površinski dio. Površinska hrapavost cakline se na taj način nakon 30 sekundi jetkanja udvostruči [180] i povećava se retencijska površina potrebna za mikromehaničku vezu između adhezivnoga sustava i cakline. Tekuća komponenta sustava, adheziv u užemu smislu, koristi se kao sveza između cakline i kompozita jer zbog svoje niske viskoznosti može bolje prodrijeti u mikroporoznosti između caklinskih prizmi. Adheziv je mješavina monomera u čijem se sastavu osim Bis-GMA, TEGDMA i UDMA, ponekad koristi i hidroksietil-metakrilat (HEMA) [169]. Obzirom da adhezivi ne sadržavaju punilo, skloniji su apsorpciji vode i polimerizacijskom skupljanju, iako utjecaj tih svojstava na snagu veze između bravice i zuba nije potpuno razjašnjen [20].

Staklenoionomerni cementi pokazali su nedovoljnu čvrstoću veze u odnosu na kompozitne adhezivne sustave [117]. Međutim, ti materijali imaju neke poželjne karakteristike, poput kemijskoga vezivanja za caklinu, mogućnosti polimerizacije u vlažnom okruženju i otpuštanja fluorida. Stoga su formulirani hibridni materijali koji bi kombinirali pozitivne strane jednih i drugih. Staklenoionomerni cementi polimeriziraju kemijski, neutralizacijom bazičnoga kalcij-alumosilikatnog stakla (prah) i poliakrilne kiseline (tekućina), a dodatak Bis-GMA, UDMA ili HEMA u tekuću komponentu omogućava i svjetlosnu polimerizaciju. Takvi smolom modificirani stakloionomerni cementi pokazuju visok stupanj otpuštanja fluorida i povećanu čvrstoću u odnosu na same cemente [115]. Kemijski se vezuju za tvrda zubna tkiva i nisu osjetljivi na vlažnu sredinu prilikom polimerizacije kao što su to adhezivni sustavi [51] te su pokazali s njima usporedivu kliničku uspješnost i značajno manje *S. mutans* u plaku oko bravica 7 dana nakon postave [196].

1.4. Bioaktivni i biointeraktivni kompoziti

Bioaktivnost dentalnih materijala različito se definira. Dok neki autori sve materijale koje promoviraju remineralizaciju nazivaju bioaktivnima [29], drugi bioaktivnošću nazivaju sposobnost stvaranja hidroksilapatita na površini materijala koji je uronjen u simuliranu tjelesnu tekućinu [60, 94] te je razvijen i standardizirani test Međunarodne organizacije za standardizaciju kojim se takvo svojstvo može dokazati (ISO 23317:2007). Pritom se materijale koji otpuštaju ione, a ne pokazuju spontano formiranje hidroksilapatita, naziva biointeraktivnima [60].

Biointeraktivni kompoziti mogu sadržavati fluore u obliku soli topivih u vodi, u organskom obliku u sastavu matrice ili u anorganskom obliku, u punilima [191]. Soli topive u vodi su najčešće NaF i SnF₂ [6], dok se fluore u organskoj matrici nalaze u organskome obliku Lewisove soli akril-amino-BF₃ ili soli akril-amino-HF [159, 191]. Punila mogu biti blago topiva, poput SrF₂ i YbF₃ ili topiva fluoridna silikatna punila [191]. Difuzijom vode u strukturu kompozita dolazi do otpuštanja fluorida koje se nastavlja dok god je gradijent dovoljno velik. Obzirom da su fluoridna silikatna stakla koja čine punilo u stakloionomerima i smolom modificiranim stakloionomerima bolje topiva u vodi, otpuštanje iz takvih materijala je veće u odnosu na kompozite. Jedna je studija pokazala pet puta niže razine otpuštenih fluorida iz kompozita nego iz smolom modificiranih stakloionomera. I kod jednih i kod drugih otpuštanje je bilo najveće u prva 24 sata, a već tijekom prvoga tjedna dnevno se otpuštanje smanji 15 puta. Kompoziti su nakon ponovnoga punjenja fluoridima iz remineralizacijskoga gela otpuštali nešto niže količine fluorida nego inicijalno te im je i ukupni remineralizacijski potencijal bio značajno niži nego kod smolom modificiranih stakloionomera [8]. Međutim, mehanizam koji uključuje topive oblike fluorida može oslabiti strukturu [159] te su takvi materijali pokazali značajno više neuspjeha veze bravice i zuba [25, 114]. Ortodontski kompoziti s fluoridima u organskoj matrici imaju snagu veze usporedivu s konvencionalnim ortodontskim kompozitima [159].

Kalcijev fosfat nalazi se u sastavu svih tvrdih tkiva u ljudskome organizmu osim malenog segmenta unutarnjeg uha [160]. Iako je identificiran u različitim kristalnim oblicima te jednom amorfnom, tijekom kalcifikacije *in vivo* upravo ACP prelazi u hidroksilapatit [160], stoga pokazuje bioaktivna svojstva [94, 160]. Klinička primjena kalcijevoga fosfata u obliku paste uvelike je otežana činjenicom da je on slabo topiv, a

najuspješnijom se pokazala njegova stabilizacija kazein-fosfopeptidom, derivatom proteina iz mlijeka [199]. Eksperimentalni bioaktivni kompoziti koji sadrže 40% masenog udjela ACP otpuštaju značajnu količinu kalcijevih i fosfatnih iona [160], ali još uvijek nemaju dovoljno dobre mehaničke karakteristike za kliničku upotrebu [94]. Formulacija matrice koju su istraživali Škrtić *et al.* je sljedeća: 62,8% Bis-EMA, 23,2% TEGDMA, 10,4 % HEMA, 2,6 % metakriloksietil ftalat (MEP), 0,2% kamforkinon (CQ) i 0,8% etil-4- (dimetilamino) benzoat (4E) [102, 104, 160, 161]. ACP kao punilo ne ojačava kompozit poput staklenih punila, njegova hidrofilnost uzrokuje povećanu apsorpciju vode, a ujedno dolazi do njegove nekontrolirane agregacije unutar matrice, što može uzrokovati pucanje materijala [69]. Konvencionalni kompoziti s nesilaniziranim punilima pokazuju nedostatnu čvrstoću na savijanje zato što u njima nema snažne veze između punila i matrice [72]. Međutim, silanizacija ACP negativno djeluje na otpuštanje iona, a ne poboljšava mehanička svojstva kompozita [160]. Ni pokušaji promjene sastava matrice nisu značajno poboljšali mehaničku stabilnost prilikom uranjanja u vodu, koja je za ovaj materijal posebno problematična [5]. Novija istraživanja usmjerena su prema dodavanju staklenoga punila u eksperimentalne kompozite s ACP [103, 104]. Dodatak stroncijevog ili barijevog stakla u 10% masenom udjelu poboljšao je modul savijanja do razine stakloionomera koji je služio kao kontrola, a nije došlo do značajnoga smanjenja otpuštanja kalcijevih i fosfatnih iona. Stroncijevo staklo sadrži stroncijev, borov i aluminijev oksid te 2% fluora i nije pokazalo mikroskopski vidljivu aglomeraciju [104]. Dodavanjem stroncija u 70% masenom udjelu u matricu dobio bi se eksperimentalni biointeraktivni kompozit istog omjera punila i matrice kakav imaju konvencionalni ortodontski kompoziti.

Kompoziti s bioaktivnim staklenim punilima su također predmet istraživanja. Bioglass® 45S5 je materijal sastava 45% SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,5% CaO i 6% P₂O₅ koji može ostvariti kemijsku vezu s kosti i pokazuje osteokonduktivna svojstva te se prvenstveno koristio u oralnoj kirurgiji u terapiji postekstrakcijskih defekata alveolarne kosti. Obzirom da ima bioaktivno djelovanje, pokazao je remineralizacijski učinak na bijele mrljaste lezije *in vitro*, ali njegova učinkovitost još nije klinički dokazana [175]. Kompozit s 61,3% masenim udjelom biostakla pokazao je klinički zadovoljavajuću snagu veze s bravicom [197]. Unošenje srebra i cinka u strukturu biostakla u sastavu ekperimentalnog ortodontskog kompozita dovodi do značajno veće antibakterijske

aktivnosti nad *S. mutans* te boljih remineralizacijskih svojstava u odnosu na konvencionalne kompozite [82].

1.5. Polimerizacija i stupanj konverzije ortodontskih adezivnih sustava

Dva su načina polimerizacije kompozita: osvjetljavanje smola koje sadrže fotoinicijator (svjetlosna polimerizacija) i miješanje dvofaznih sustava (kemijska polimerizacija). Potonje je tehnički zahtjevnije i pokazuje veću poroznost materijala te se sve rjeđe primjenjuje u kliničkoj praksi [48]. Svjetlosno polimerizirajući kompoziti sadrže inicijatore slobodnih radikala poput CQ ili N, N-dimetil-amino-etil-metakrilata u koncentracijama do 1,4%, što je dovoljno za uspješnu inicijaciju polimerizacije. Adhezivni sustavi s dvojom polimerizacijom aktiviraju se osvjetljavanjem, a reakcija se nastavlja kemijski i nakon osvjetljavanja te općenito pokazuju višu snagu veze od svjetlosno polimerizirajućih kompozita, ali ta razlika nije klinički značajna [20]. Za svjetlosnu polimerizaciju koriste se razni uređaji za stvaranje svjetla - halogeni, plazma, laserski i visoko sjajne svjetleće diode (engl. light emitting diode, LED), a emitiraju spektar plave i ljubičaste boje valne duljine 400-500 nm [40].

Klinički, nakon jetkanja, ispiranja i sušenja, na caklinu se u tankome sloju nanosi adheziv, a na bazu bravice kompozit. Bravica se zatim postavlja na caklinu, viškovi adhezivnoga sustava oko bravice se uklanjaju te se adheziv i kompozit zajedno osvjetljavaju. Transmisija svjetla do kompozita je slabija kada se osvjetljava kroz bravicu, što je velik problem kod metalnih, a nešto manje značajan kod keramičkih bravica [46]. Uputa proizvođača kompozita stoga je da se bravica osvijetli indirektno, jednako vrijeme s mezijalne i distalne, ili cervikalne i okluzalne strane.

Stupanj konverzije (engl. degree of conversion, DC) jest stupanj prijelaza dvostrukih veza između atoma ugljika ($C=C$) u molekulama monomera u jednostruke veze ($C-C$) u polimeru i izražava se u postotnom udjelu. DC utječe na mehaničke karakteristike kompozita te njihovu degradaciju i topivost [46], a sam ovisi o intenzitetu svjetla i blizini izvora, o trajanju osvjetljavanja [61], ali i o kemijskim svojstvima monomera [59, 128]. Za potpunu polimerizaciju kompozita potrebno je 10 000 mJ energije, što se u teoriji može postići sljedećim izrazom: intenzitet svjetla (mW/cm^2) x vrijeme osvjetljavanja (sekunde) = 10 000 (mJ/cm^2) [61]. Međutim, dimetakrilatni monomeri stvaraju trodimenzionalnu mrežu te se napredovanjem polimerizacije značajno smanjuje difuzija slobodnih radikala i monomera koji još nisu ušli u reakciju, što onemogućava potpunu konverziju [128]. Dvostruke veze u materijalu ostaju u mreži kao zaostatni monomer ili, ako je jedan kraj molekule prošao reakciju polimerizacije,

kao bočni lanci koji kompozit čine plastičnijim i manje postojanim [20]. Osim toga, prisutnost hidroksilnih skupina i interakcija aromatskih prstenova povećava viskoznost Bis-GMA i time onemogućuje visoki DC [46]. DC se povećava sljedećim redoslijedom: Bis-GMA < Bis-EMA < UDMA < TEGDMA [153]. *In vitro* istraživanja su pokazala DC ortodontskih kompozita od 67 do 88% prilikom izravnog osvjetljavanja [37] i od samo 47% prilikom osvjetljavanja ispod metalne bravice [63]. Što je veći sadržaj punila, svjetlost teže prodire kroz matricu [200].

Interakcija između svih navedenih faktora je složena. DC se značajno smanjuje povećanjem udaljenosti lampe od bravice s 0 do 5 mm [168]. Duže vrijeme osvjetljavanja je vezano uz veći DC [31, 120]. Čini se da izvor svjetla ima značajnu ulogu obzirom da je osvjetljavanje svjetlošću dvostrukog intenziteta iz LED lampe u dvostruko kraćemu trajanju dovelo do značajno većega DC-a nego osvjetljavanje halogenom lampom, iako je efektivna energija bila jednaka [42]. Vjerojatno je razlog tome uski spektar emisije LED lampi u odnosu na halogene koji ih čini učinkovitijima i pri kraćemu vremenu osvjetljavanja. DC je u dosadašnjim istraživanjima određivan na uzorcima samih kompozita bez adheziva. Obzirom da je za ortodontske adhezivne sustave karakteristično da se dvije komponente osvjetljavaju zajedno, pri čemu nastaje mješavina adheziva i kompozita koja sadrži veći udio dimetakrilata nego sam kompozit, potrebno je ispitati takvu kombinaciju koja vjernije simulira kliničku situaciju.

Metoda koja se najčešće koristi u analizi DC-a je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. Fourier transform infrared, FTIR spectroscopy). Infracrveno zračenje valnoga broja 4000 do 400 cm^{-1} u organskim molekulama dovodi do vibracija rastezanja (ritmično rastezanje kovalentne veze) ili svijanja (promjena kuta između kovalentnih veza na zajedničkom atomu). Kako bi došlo do apsorpcije, frekvencija infracrvenoga zračenja iz uređaja i frekvencija vibracije veze moraju biti identične, a uređaj može detektirati samo one koje mijenjanju dipol molekule [157]. Infracrveni spektar na x osi sadrži valne brojeve (cm^{-1}), a na y osi apsorbanciju (%) te prikazuje vrpce istezanja pojedinih kovalentnih veza pri karakterističnim valnim brojevima. Intenzitet vrpce C=C veze pri 1637 cm^{-1} se prilikom konverzije metakrilata smanjuje, dok se vrpca istezanja benzena pri 1608 cm^{-1} ne mijenja te se može koristiti kao referentna [37, 46, 63, 154]. DC nije istovjetan stupnju polimerizacije koji je definiran kao broj ponavljajućih jedinica u polimernom lancu i određuje se mjerenjem molekularne mase [188]. Ipak, stupanj polimerizacije prati DC obzirom da je kod

kompozitnih smola prisutna reakcija poliadicije uvjetovana slobodnim radikalima u kojoj je početni DC nizak, a nastaju polimeri velike molekularne mase [42].

Tvrdoća je otpor materijala na plastičnu deformaciju te se generalno ispituje mjerenjem veličine otiska nastalog utiskivanjem dijamantne piramide u površinu materijala tijekom određenoga vremena. Za tanke materijale obično se koriste sile utiskivanja ispod 10 N te se tako ispitano svojstvo definira kao mikrotvrdoća. Ona je važno fizikalno svojstvo kompozita [155, 186], koje pozitivno korelira s masenim udjelom punila [69]. Iako je zabilježena snažna linearna veza između DC i mikrotvrdoće [141], druga istraživanja nisu ukazala na značajnu povezanost [78, 176]. Istraživanje mikrotvrdoće zanimljivo je i stoga što njezina promjena može ukazivati na kemijsku degradaciju materijala [198] te je vjerojatno da bi biointeraktivni kompoziti s topivim solima fluorida pokazali veću strukturnu nestabilnost od konvencionalnih kompozita.

Nije jasno može li mikrotvrdoća ukazivati i na posmičnu čvrstoću veze (engl. shear bond strength, SBS) koja se najčešće koristi kao mjera jakosti veze između zuba i bravice, unatoč brojnim nedostacima eksperimentalnoga protokola [47]. Obzirom da je veći udio punila povezan s jačom vezom [52], mikrotvrdoća bi mogla biti sekundarni pokazatelj čvrstoće veze [2], iako je recentno istraživanje pokazalo da nema korelacije između mikrotvrdoće i mikrovlačne čvrstoće veze [18], koja se ponekad ispituje kao alternativa SBS.

1.6. Ispitivanje biokompatibilnosti dentalnih materijala

Ortodontska terapija *edgewise* napravom traje prosječno dvije do tri godine te je zbog dugotrajnoga kontakta s oralnom sluznicom iznimno važno da naprava ne uzrokuje štetne biološke učinke [49]. Implantati prve generacije u ljudskome tijelu počeli su se koristiti četrdesetih godina 20. stoljeća te se smatralo da se najbolji biološki odgovor može dobiti kemijski najmanje aktivnim materijalima. Vremenom je postalo jasno da se biološki odgovor na isti materijal razlikuje od tkiva do tkiva i ovisno o mjestu ugradnje. Osim toga, neke su primjene tražile reakciju materijala s tkivima, a ne potpunu inerciju [193]. Stoga je formulirana definicija biokompatibilnosti kao sposobnosti materijala da, u specifičnoj situaciji, djeluje uz primjereni odgovor domaćina [192]. Ujedno, biokompatibilnost podrazumijeva neškodljivu interakciju

materijala i biološkog okruženja i to u oba smjera - materijala prema okruženju te okruženja prema materijalu [7]. Williams inzistira kako se sam materijal ne može opisati pridjevom „biokompatibilan“ obzirom da je biokompatibilnost svojstvo sustava, a ne materijala [195]. U prilog tome ide i činjenica da proizvođači sirovine za sintezu materijala deklariraju kao „biokompatibilne“, no, one se mogu promijeniti prilikom pripreme ili obrade te ih stoga treba ispitivati u stadiju u kojem se nalaze u doticaju s okolnim tkivom [127]. Biomaterijalom se smatra bilo koji strukturni neživi materijal koji se koristi u interakciji s biološkim sustavima ljudskoga tijela [147], iako, napretkom biotehnologije i medicinskih znanosti, danas definicija obuhvaća i sintetizirane viruse, stanice, tkiva i organe [194].

U Europskoj uniji, najvažnije regulacije pod koje spadaju biomaterijali koji se koriste u dentalnoj medicini su Direktiva 93/42/EEZ o medicinskim proizvodima i Uredba 1907/2006 o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) [147]. Prema Direktivi 93/42/EEZ, proizvođač je odgovoran za sigurnost i kvalitetu proizvoda, a REACH traži da podaci o sigurnosti priloženi proizvodu sadrže sve informacije o mogućim opasnostima i rizicima od korištenja materijala. Osim toga, doktori dentalne medicine odgovorni su za primjenu materijala sukladno indikacijama koje donosi proizvođač, a sami potpadaju pod definiciju proizvođača kada se radi o protetskim nadomjescima. Dok proizvodi klasificirani u kategoriju IIa prema Direktivi 93/42/EEZ (u koju spadaju kompoziti za restauraciju zuba) moraju proći „kliničko ispitivanje“, ono ne mora nužno slijediti standard ISO 14155-1:2003 za klinička ispitivanja medicinskih proizvoda za ljudsku upotrebu. Proizvodi koji su na tržište stavljeni suglasno Direktivi nose oznaku „CE“, iako su i kod takvih materijala za ispune zabilježeni problemi poput frakture zuba i boli [147]. Nužno je stoga da praktičar kritično procijeni materijale s kojima radi. Neophodno je i uključivanje znanstvenika u javne rasprave o štetnosti određenih materijala obzirom da je laicima teško na realističan način povezati rezultate testova toksičnosti s rizicima za populaciju [146]. Nužne metode ispitivanja toksičnosti materijala izabiru se prema procjeni rizika koju donosi stručnjak na temelju podataka dostupnih o materijalu iz literature. Ako se na tržište donosi materijal koji je značajno drugačiji od postojećih, započinje se *in vitro* ispitivanjima, nakon čega se, ovisno o rezultatima, provode *in vivo* testiranja na životinjama i eventualno kliničke studije na ljudima. Između svake faze ponovno se

provodi procjena rizika. Ako se rizik procijeni malenim i prihvatljivim, daljnja ispitivanja nisu potrebna [147].

Toksičan učinak materijala je oštećenje biološkoga sustava (narušavanje homeostaze), u ovom slučaju, kemijskim putem. Ovisno o udaljenosti od mjesta aplikacije materijala razlikujemo lokalnu i sustavnu toksičnost. Sustavna toksičnost istražuje se na laboratorijskim životinjama, akutno ili kronično, tijekom nekoliko mjeseci. Generalno, dentalni materijali pokazuju nisku akutnu sustavnu toksičnost [144] dok su saznanja o kroničnoj toksičnosti još uvijek nedostatna.

Nisu sve lokalne reakcije toksične, obzirom da se upala može javiti i zbog prisutnosti bakterija ili mehaničke iritacije [147]. Citotoksičan učinak manifestira se kao smrt stanice koja može biti u obliku nekroze ili apoptoze. Nekrozu karakterizira funkcionalno i morfološko oštećenje organela, bubrenje stanice i mitohondrija te njihovo raspadanje i oslobađanje čimbenika upale (histamini, citokini, TNF i dr.) [13]. U apoptozi dolazi do kondenzacije kromatina, fragmentacije jezgre, smežuranosti stanice i, konačno, do organiziranoga raspadanja na apoptotička tjelešca [125]. Obzirom da nema nekoordiniranog istjecanja citoplazme, apoptoza načelno ne uzrokuje upalni odgovor, kao što to čini nekroza. No, primjerice, kod ishemijsko-reperfuzijske ozljede prisutna je apoptoza, ali i jaka upala koju se eksperimentalno ublažilo inhibicijom apoptoze [41]. Iako su morfološke razlike između nekroze i apoptoze jasne i dobro očuvane između najrazličitijih vrsta stanica, na molekularnoj razini postoje različiti putevi za koje su ključne kaspaze, mitohondriji i slobodni radikali [56]. *In vivo*, unutar iste lezije dio stanica može umirati apoptozom, a drugi nekrozom. Usto, ponekad je postapoptotička ili sekundarna nekroza konačan ishod programirane stanične smrti [125, 156]. *In vitro*, utvrđivanjem aktivnosti kaspaza 3 i 7, odnosno mjerenjem prisutnosti citokina i drugih faktora upale, te na kraju istovremenim vitalnim bojanjem etidijevim bromidom i narančasto-akridinom može se utvrditi umire li stanica apoptozom ili nekrozom [10, 13, 44, 165]. Kulture stanica za ispitivanje citotoksičnosti mogu biti trajne ili primarne. Prednost trajnih kultura je predvidljivost rasta i ponašanja stanica te se u tu svrhu najčešće koriste mišji fibroblasti ili stanice ljudskog epitela. Primarne kulture uzgajaju se iz uzorka donora, ali takve su stanice vrlo osjetljive, brzo stare i tada se sve sporije dijele. Moguće je immortalizirati ih onkogenima, što omogućuje njihov dugotrajni rast u kulturi, teoretski beskonačan [145]. No, genetska manipulacija kojoj su podložene može rezultirati promjenom u fenotipu i stjecanjem obilježja kojima

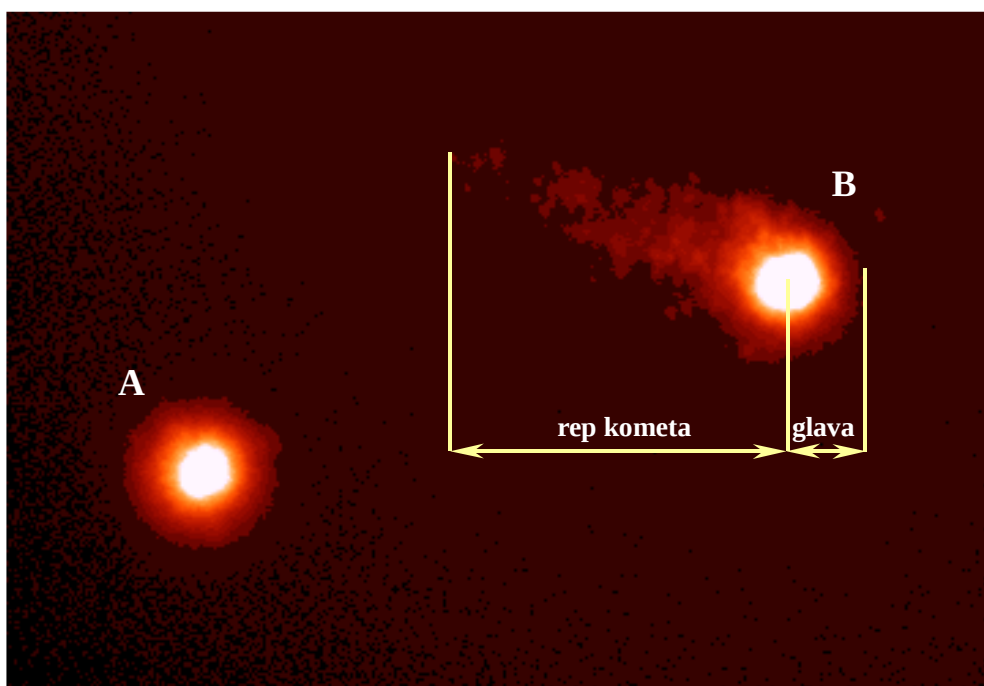
se značajno razlikuju od primarnih stanica [79]. To je, ujedno, slučaj u ispitivanjima genotoksičnosti korištenjem trajnih kultura kojima je genetički materijal izmijenjen ne bi li mogle opstati u uvjetima izvan organizma i kontinuirano se dijeliti. U takvim kulturama česte su i promjene u broju kromosoma što utječe na veličinu interfazne jezgre, time nukleoida i rezultate komet tehnike. Relativna toksikološka analiza provodi se usporedbom ispitivanog materijala sa sličnim materijalom poznatoga kliničkog učinka [143].

Ostali oblici toksičnih učinaka su mutageni, kancerogeni i teratogeni efekti. Genotoksičnost je definirana kao promjena u genomskoj deoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) nastala djelovanjem kemijske tvari. Mehanizmi popravka DNK ili apoptoza takve stanice načini su na koji organizam prevenira prenošenje oštećenja na novu generaciju stanica. Ako takav mehanizam izostane ili dođe do aktivacije „*error prone*“ (engl. error prone, sklon grešci) mehanizama popravaka koji dodatno induciraju promjene u građi kromosoma na mjestu popravka, učinak će biti mutagen. Kancerogenost podrazumijeva djelovanje koje potiče nastanak malignoga tumora i za nju je najčešće potrebno više mutacija [147].

1.6.1. Komet test

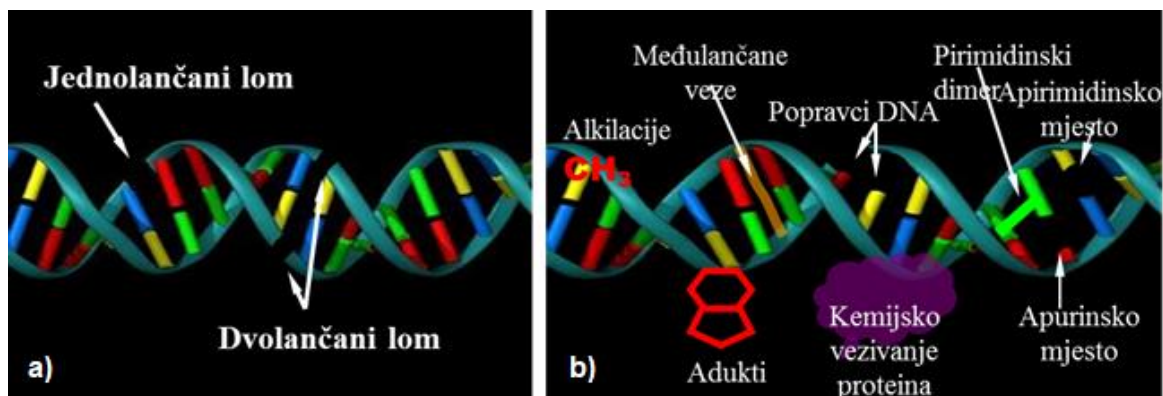
Jedna od metoda kojom se može procijeniti genotoksični učinak supstance u eukariotskim stanicama je komet test (elektroforeza pojedinačne stanice). Na razini pojedine stanice, ukoliko su prisutna oštećenja genetičkog materijala nakon elektroforeze, pod fluorescentnim mikroskopom ona ima izgled kometa [158]. Komet test je osjetljiv, jednostavan za izvođenje, ekonomičan i brz [35]. Metodi je prethodilo otkriće tehnike izolacije nukleoida pomoću deterdženta i superzasićene otopine natrijevoga klorida koji uzrokuju raspadanje membrana, dezintegraciju makromolekulskih kompleksa i odvajanje histona od DNK nakon čega ostaje izoliran nukleoid. Zbog proteina matriksa koji se ne uklanjaju i energetske stabilnosti, DNK u nukleoidu zadržava oblik negativne superuzvojnice koji je imala prije izolacije, što onemogućava njezinu slobodnu rotaciju [202]. Unatoč negativnome naboju fosfatnih skupina u DNK, ona zbog takve rigidne strukture ne može putovati kroz agarozni gel u električnom polju. Međutim, kod lomova lanaca DNK gubi se njezina visoko-organizirana struktura, dolazi do „opuštanja“ dijelova DNK koji su bili negativno

superzavijeni u obliku fleksibilnih omči, formiranja slobodnih krajeva na mjestima indukcije lomova i fragmentacije. Sve nabrojene strukture posjeduju mogućnost kretanja kroz gel u električnom polju prema anodi, obzirom na negativnu nabijenost molekule DNK uslijed fosfatnih skupina [35]. U području nukleoida ostaje DNK koju nazivamo glavom. Sav dio DNK koji je otputovao u električnom polju nazivamo repom kometa (slika 5) [202].



Slika 5. Prikaz dvaju nukleoida limfocita. (A) stanica bez genomskih oštećenja, (B) stanica s oštećenjima DNA, uz prikaz dužine glave i repa.

Ustanovljeno je da izlaganje DNK lužnatom pH iznad 13 dovodi do pojave lomova na mjestima kemijskih oštećenja koja sama po sebi nisu promjena strukture [34]. Alkalna inačica komet-testa omogućava utvrđivanje jednolančanih lomova te oštećenja osjetljivih na alkalnu sredinu kao što su adukti na DNK, alkilacije, kovalentno vezanje proteina te kovalentne međulančane veze i apurinska i apiridiminska mjesta (slika 6) [202].



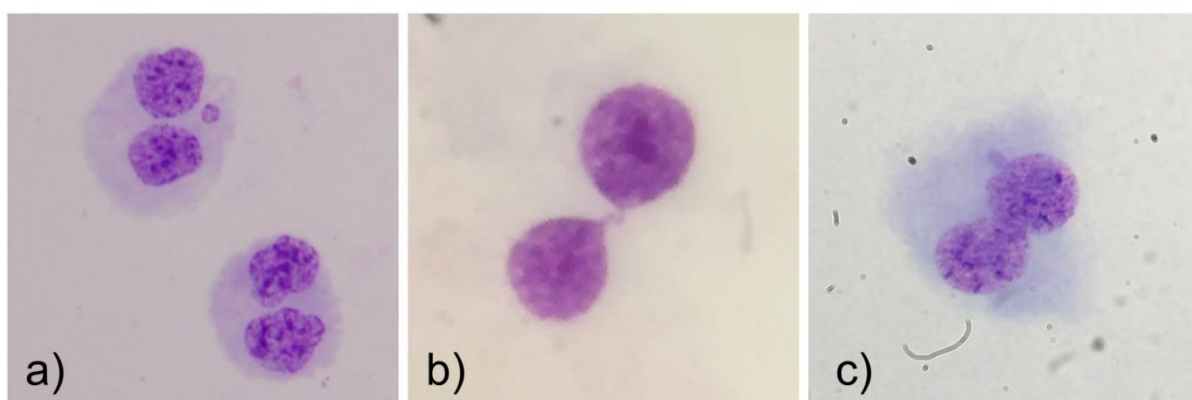
Slika 6. Oštećenja DNA koja se mogu otkriti komet testom: a) jednolančani i dvolančani lom, b) mjesta osjetljiva na lužnate uvjete koja se pri pH>13 prevode u lomove DNK.

Obzirom da je najveći dio primarnih oštećenja genoma koja komet test detektira popravljiv [34], uputno je ovu metodu koristiti u kombinaciji s drugim metodama utvrđivanja genotoksičnosti [174].

1.6.2. Citohalazinom B blokirani mikronukleus test

Mikronukleus je kromatinska struktura smještena u citoplazmi, potpuno odvojena i manja od jezgre, ali je morfološki jednaka jezgri. Mikronukleus nastaje oštećenjem DNK koje rezultira morfološkim i numeričkim oštećenjima kromosoma. U slučaju numeričkih oštećenja govorimo da se ne radi o genotoksičnom, već aneugenom djelovanju koje je rezultat oštećenja proteina mikrotubula zaduženih za razdvajanje nasljednoga materijala u anafazi. Citohalazinom B blokiranim mikronukleus testom (engl. cytokinesis-block micronucleus, CBMN assay) se stoga mogu otkriti i kvantificirati klastogeni (strukturna oštećenja kromosoma) i aneogeni učinci (oštećenja diobenog vretena) [53, 85]. Podrijetlo mikronukleusa može biti kromosomski fragment ili cijeli kromosom. Dodatno oštećenje koje se prati CBMN-testom su nukleoplazmatski mostovi koji nastaju tijekom anafaze, kada diobeno vreteno povlači centromere dicentričnih kromosoma na suprotne polove stanice i pokazatelji su jakoga genetičkog oštećenja [55]. Ujedno, zaostadni monomeri iz dentalnih kompozitnih smola putem dvostruke formacije epoksida mogu kovalentno povezati komplementarne DNK [149] i time onemogućiti njihovo razdvajanje i dovesti do pojave mikronukleusa. Još jedna anomalija povezana s kromosomskom

nestabilnošću je pojava jezgrinih pupova. Pupanjem jezgra nastoji ukloniti dio genetičkog materijala koji na malom segmentu sadrži veći broj oštećenja DNK i na kojem su započeti njihovi popravci, ili, rjeđe, amplificiranu DNK uz ovojnicu kako bi spriječila dodatno nakupljanje mutacija uslijed velikog broja popravaka ili očuvala cjelovitost genoma. Takva ekstruzija završava formiranjem mikronukleusa [151]. U rijetkim slučajevima pupovi mogu potjecati od fragmenata slomljenoga mosta koji se povlače prema jezgrama. Tada su oni vidljivi na obje novonastale jezgre, jedan nasuprot drugome [185]. U CBMN-testu koristi se mikotoksin citohalazin B koji ne utječe na kariokinezu, ali snažno inhibira citokinezu. Na taj način se u kulturi pojavljuju prepoznatljive binuklearne stanice u kojima se mogu brojati mikronukleusi, mostovi i pupovi (slika 7). U citogenetičkome nadzoru populacija profesionalno izloženih mutagenima, CBMN-test se provodi na limfocitima periferne krvi koji zbog cirkulacije kroz sva tkiva imaju svojstvo surogatnih ciljnih stanica [85]. Zbog svojih karakteristika kao dobrih surogatnih stanica za somatske stanice, limfociti donora se ujedno mogu koristiti u *in vitro* ispitivanjima genotoksičnog učinka biomaterijala [10, 173]. Kriteriji za identifikaciju jezgrinih anomalija standardizirani su HUMN (engl. HUMAN MicroNucleus) projektom [54]. Uobičajeno je pregledati 1000 binuklearnih stanica po ispitivanome materijalu. Bojanjem Giemsa bojom nije moguće razlikovati potječu li mikronukleusi kromosomskih fragmenata ili cijelih kromosoma. U tu svrhu danas se CBMN-test kombinira s fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom (FISH) sa specifičnim centromernim ili telomernim sondama [32, 91].



Slika 7. Citohalazinom B blokirani mikronukleus test, izgled stanica pod optičkim mikroskopom. Jezgrine anomalije u binuklearnim limfocitima: a) mikronukleus (gornja stanica), b) most, c) pup

1.7. Degradacija kompozita i toksičnost monomera

Prema smjernicama ISO 10993-1:2009, kontakt materijala s domaćinom duži od 30 dana smatra se trajnim [73]. Bravice, cjevčice, prstenovi i žice *edgewise* naprave stoga su u trajnome, površinskom kontaktu s oralnom sluznicom i tvrdim tkivima [189]. Isto se odnosi i na ortodonske adhezivne sustave koji su s caklinom u dodiru cijelom svojom površinom, a s oralnom sluznicom rubno ispod bravice, na 20 do 28 zuba. Prema smjernicama, za utvrđivanje njihove neškodljivosti potrebno je, između ostalog, provesti *in vitro* testove citotoksičnosti i genotoksičnosti [189]. Metalni elementi izrađuju se od plemenitoga čelika te legura koje sadrže željezo, molibden, krom, nikal i titan. Estetske bravice izrađene su od polimera, kompozitnih smola i keramike. Istraživanja biokompatibilnosti u ortodonciji uglavnom su pratila koroziju metalnih dijelova *edgewise* naprave kao i citotoksičnost [49, 86, 127] i genotoksičnost [21] *in vitro*.

Usna šupljina je dinamično okruženje. Prisutnost sline varijabilnog pH, žvačnih i ortodontskih sila, mikroorganizama i promjene temperature utječu na strukturnu i kemijsku stabilnost ortodontskih adhezivnih sustava i, posljedično, na biokompatibilnost sustava biomaterijal – domaćin. Voda iz sline prodire u polimernu mrežu matrice [20], omogućujući difuziju neizreagiranih monomera [67] i drugih tvari poput fluorida [191]. Esteraze iz sline kataliziraju daljnju hidrolizu monomera, primjerice, Bis-GMA i TEGDMA razgrađuju se do metakrilne kiseline (MAA) [57]. Oralne bakterije mogu svojim metabolizmom uzrokovati degradaciju kompozitnih materijala [67], što bi kod *edgewise* naprave mogao biti značajan problem, obzirom da je biofilm u mikroporozitetima oko ruba bravica vrlo teško ukloniti [116, 166].

Niži DC također može uzrokovati povišeno ispiranje monomera ili produkata njihove razgradnje iz kompozita [88, 168]. Ono se najbrže odvija prilikom polimerizacije kompozita, ali je vezano uz DC i dugoročno [65, 133]. Zbog niže molekularne mase, veće fleksibilnosti lanca i topivosti, HEMA i TEGDMA se otpuštaju lakše nego UDMA i Bis-GMA [57]. Kompozit osvijetljava ispod metalne bravice otpustio je značajno više TEGDMA od istog materijala osvijetljavanog ispod keramičke bravice [46].

Bis-GMA, TEGDMA, UDMA i HEMA su toksični *in vitro* [66]. TEGDMA uzrokuje mutacije i pojavu mikronukleusa, kao i apoptozu inhibicijom fosfatidilinozitol 3-kinaznog signalnog puta u stanicama pulpe [149] te oštećenje mitohondrija u gingivnim fibroblastima [87]. UDMA uzrokuje stvaranje slobodnih radikala, poremećaj staničnog ciklusa te apoptozu i nekrozu [26]. Osim toga, inducira pojavu mikronukleusa u staničnoj kulturi V79 [148]. Svi monomeri u živom organizmu dovode do nastanka epoksida koji otvara tročlani alifatski prsten s kisikom pri čemu nastaje radikal koji se veže uz DNK. Monomeri uglavnom sadrže dva atoma kisika na suprotnim krajevima molekule. Time su sposobni tvoriti dva epoksidna prstena čijim otvaranjem mogu vezati susjedne baze u istom lancu DNK ili kovalentno povezati komplementarne lance [149]. Citotoksičnost Bis-GMA očituje se oštećenjem DNK i aktivacijom kaspaza što dovodi do apoptoze i, kod većih koncentracija, nekroze bez sudjelovanja kaspaza [89]. Obzirom da Bis-GMA utječe na migraciju keratinocita, mogla bi utjecati na cijeljenje oštećene oralne sluznice [178]. HEMA djeluje klastogeno povećavajući broj mikronukleusa [151] te, zajedno s MAA koja se pojavljuje kao raspadni produkt HEMA, inducira dvostruke lomove DNK i apoptozu kod humanih gingivnih fibroblasta [170]. Vjerojatno je da bi ovi monomeri mogli mijenjati signalne puteve i u koncentracijama mnogo nižima od onih koje uzrokuju akutnu toksičnost, inducirajući time promjene u regulaciji homeostaze ili cijeljenja tkiva [149].

U literaturi su opisani citotoksični i genotoksični [84] te mutageni [9] učinci dentalnih kompozitnih materijala na humanim limfocitima *in vitro*. I studije citotoksičnosti ortodontskih kompozita pokazala su neželjene učinke nekih komercijalnih materijala. Gioka *et al.* pokazali su blagi citostatski učinak ortodontskih kompozita na humane gingivne fibroblaste [63], dok su u ostalim istraživanjima neki kompoziti djelovali citotoksično na stanice bubrega majmuna (Vero stanice) [74] i mišje fibroblaste L929 [100]. Međutim, uzorci su pripremani bez tekuće adhezivne komponente, što bi moglo značajno utjecati na DC i eventualnu toksičnost, obzirom da adhezivi povećavaju udio monomera u adhezivnome sustavu u odnosu na sami kompozit. Istraživanja genotoksičnosti provedena su za metalne komponente *edgewise* naprave [109, 190] kao i za cemente kojima se učvršćuju prstenovi [3]. Jedna je *in vivo* studija pokazala povećani citotoksični učinak na epitel sluznice obraza kod ispitanika s fiksnom napravom, a genotoksični učinci nisu zabilježeni [181]. Međutim,

u takvoj je studiji nemoguće utvrditi je li citotoksičan efekt posljedica djelovanja metalnih iona ili monomera iz adezivnih sustava.

Ortodontski adhezivni sustavi dugotrajno su prisutni u usnoj šupljini, sadrže dimetakrilatne monomere poznate toksičnosti i otežano se osvjetljavaju ispod metalne bravice. Osim toga, biointeraktivni i eksperimentalni bioaktivni kompoziti otpuštaju remineralizacijske tvari, a fluoridi pokazuju citotoksično djelovanje [11]. Ispitivanje genotoksičnosti neizostavno je u procjeni sigurnosti materijala za pacijenta [137], stoga je potrebno istražiti i ortodonske adhezivne sustave.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA.

Temeljni je cilj ovog istraživanja bio utvrditi sastav ortodontskog adhezivnoga sustava primjerenog stupnja konverzije i, sukladno istome, sigurnosti za pacijenta.

Standardna je preporuka proizvođača osvjetljavanje od 10 sekundi, a cilj je bio ustanoviti hoće li produženo osvjetljavanje imati značajni utjecaj na povećanje stupnja konverzije i smanjenje genotoksičnosti. Kako bi se to postiglo, kvalificirao se i kvantificirao utjecaj sastava organskog i anorganskoga dijela ortodontskih adhezivnih sustava na stupanj konverzije (određen FTIR spektroskopijom) i mikrotvrdoću (određenu Vickersovim testom). Usto, genotoksičnim testovima (mikronukleus i komet) određeno je koje razine genetičkih oštećenja i promjena u organizaciji kromatina uzrokuju ortodontski kompozitni sustavi te je kvantificirano u kojoj je mjeri genotoksičnost ovisna o trajanju osvjetljavanja i stupnju konverzije, a u kojoj mjeri o sastavu materijala. Ispitano je na koji način dodatak biointeraktivnih i bioaktivnih tvari mijenja stupanj konverzije i genotoksičnost.

Radne hipoteze istraživanja bile su sljedeće:

Kompoziti s većim udjelom UDMA i TEGDMA postižu veći stupanj konverzije od onih s Bis-GMA. Kompozitni sustav s dodatkom ACP vjerojatno postiže niži stupanj konverzije, a eksperimentalni kompozit s inertnim staklenim punilom, pokazuje bolju konverziju te ujedno ima veću tvrdoću.

Ortodontski adhezivni sustavi uzrokuju lomove lanaca DNK i formiranje mikronukleusa.

Genotoksičnost vjerojatno ne ovisi primarno o trajanju osvjetljavanja i stupnju konverzije monomera u polimer, već o sastavu materijala: o organskoj i anorganskoj komponenti te o dodatku i vrsti remineralizacijskih tvari. Genotoksičnost je najveća kod materijala s najvećim udjelom UDMA, a smanjuje se kod materijala baziranih na TEGDMA te onih na Bis-GMA.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Formulacija eksperimentalnih kompozita

Smolasta matrica eksperimentalnih kompozita zamiješana je iz komercijalno dostupnih monomera Bis-EMA, TEGDMA, HEMA i MEP (Esstech, Essington, SAD) te foto-oksianta CQ i foto reduktanta 4E (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) prema Škrtiću *et al.* [102, 104, 160].

ACP i stroncijevu staklo zamiješani su u smolastu matricu u posudicama nepropusnima za svjetlost u centrifugalnoj mješalici Speed Mixer TM DAX 150 FVZ (Hauschild & Co KG, Hamm, Njemačka) na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkoga fakulteta u Zagrebu.

3.1.2. Kompoziti, adhezivi i njihove kombinacije

Uzorak za ispitivanje DC-a i genotoksičnosti činili su kompoziti, adhezivi i njihove kombinacije (adhezivni sustavi).

Kompoziti:

- 1) eksperimentalni kompozit s 40% masenim udjelom ACP (ACP40)
- 2) eksperimentalni kompozit sa 70% masenim udjelom stroncijevoga stakla G018-163 (Schott, Mainz, Njemačka) (Sr70)
- 3) Transbond XT (3M Unitek, Monrovia, SAD) (TBXT)
- 4) Transbond Plus (3M Unitek, Monrovia, SAD) (TB+)
- 5) Light Bond Paste (Reliance Orthodontic Products Inc., Itasca, SAD) (LB)
UDMA, TEGDMA
- 6) Light Bond Paste With Fluoride (Reliance Orthodontic Products Inc., Itasca, SAD) (LB+)
- 7) Geristore (DenMat, Lompoc, SAD) (GS)

Adhezivi:

- 8) Transbond XT Primer (3M Unitek, Monrovia, SAD) (TBXT bond)

- 9) Light Bond Sealant (Reliance Orthodontic Products Inc., Itasca, SAD) (LB bond)
- 10) Light Bond Sealant With Fluoride (Reliance Orthodontic Products Inc., Itasca, SAD) (LBF bond)
- 11) Tenure (DenMat, Lompoc, SAD)

Kombinacije (adhezivni sustavi):

- 12) ACP40 + TBXT bond (ACP40 komb)
- 13) Sr70 + TBXT bond (Sr70 komb)
- 14) TBXT + TBXT bond (TBXT komb)
- 15) TB+ + TBXT bond (TB+ komb)
- 16) LB + LB bond (LB komb)
- 17) LBF + LBF bond (LBF komb)
- 18) GS + Tenure (GS komb)

Sastav materijala prema deklaraciji proizvođača prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Kompoziti i adhezivi korišteni u istraživanju (prema deklaraciji proizvođača)

	Proizvođač (LOT broj)	matrica (maseni %)	punilo (maseni %)
TBXT	3M Unitek, Monrovia, SAD (N740303)	10-20% Bis-GMA	70-80% silikatno staklo, CAS* 100402-78-6
TB+	3M Unitek, Monrovia, SAD (N869111)	5-15% PEGDMA*, ≤10% CA-DMA***, <1% Bis-GMA	70-90% silikatno staklo CAS 100402-78-6 sa sadržajem fluorida
LB	Reliance Orthodontic Products Inc., Itasca, SAD (171926)	>5% UDMA, >5% TEGDMA	>50% silikatno staklo CAS 60675-86-0
LBF	Reliance Orthodontic Products Inc., Itasca, SAD (172767)	>5% UDMA, >5% TEGDMA	>50% silikatno staklo CAS 60675-86-0, <1% NaF
GS	DenMat, Lompoc, SAD (2436199A)	15-25% Bis-EMA, 2-10% HEMA, ≤5% MEP, - ≤5% PMDM ^a , ≤5% NTG-GMA ^b -natrijeva sol; 5% poliakrilna kiselina	≤5% silikatno staklo CAS 68611-44-9
ACP40	-	38% Bis-EMA, 14% TEGDMA, 6% HEMA, 2% MEP	40% ACP
Sr70	-	19% Bis-EMA, 7% TEGDMA, 3% HEMA, 1% MEP	70% stakleno punilo: 60%SiO ₂ , 15%SrO, 15% B ₂ O ₃ , 15% Al ₂ O ₃ , 2% F

*jedinstveni broj iz Registra *Chemical Abstracts Service*, Columbus, SAD; **polietilenglikol-dimetakrilat; ***dimetakrilat s limunskom kiselinom; ^apiromelitični dimetakrilat; ^bN-toliglicin glicidil metakrilat

Tablica 1. (nastavak) Kompoziti i adhezivi korišteni u istraživanju (prema deklaraciji proizvođača)

	Proizvođač (LOT broj)	matrica (maseni %)	punilo (maseni %)
TBXT bond	3M Unitek, Monrovia, SAD (712-034)	45-55% Bis-GMA, 45-55% TEGDMA	-
LB bond	Reliance Orthodontic Products Inc., Itasca, SAD (172776)	>20% Bis-GMA, >20% UDMA	-
LBF bond	Reliance Orthodontic Products Inc., Itasca, SAD (16557)	>20% Bis-GMA, >20% UDMA, >5% TEGDMA, 1-3% hidrofluorid metakrilat	-
Tenure komponenta A	DenMat, Lompoc, SAD (1727900014)	85-95% aceton, 3-% NTG-GMA ^b - natrijeva sol	-
Tenure komponenta B	DenMat, Lompoc, SAD (1727900014)	80-90% aceton, 10-15% Bis[2-[(2-metil-1-oksoalil)oksi]etil]divodikov benzen-1,2,4,5-tetrakarboksilat	-
Tenure komponenta S	DenMat, Lompoc, SAD (1727900014)	45-55% Bis-EMA, 30-40% HEMA, 10-15% TEGDMA	-

^b N-toliglicin glicidil metakrilat

3.2. Metode

3.2.1. Izrada uzoraka

U simulaciji kliničkoga postupka, na metal-keramičku pločicu boje A2 prema Vita ključu boja (Vita Zahnfabrik H. Rauter GmbH & Co. KG, Bad Säckingen, Njemačka) dimenzija 30x20 mm, koja je imitirala površinu zuba, stavljena je folija Hawe Striproll (Kerr, Bioggio, Švicarska), izrađena od polietilen tereftalata. Na nju je nanesen kompozit (za uzorke 1-7), adheziv (za uzorke 8-11) ili adheziv pa kompozit (za uzorke 12-18). Materijali GS i Tenure sastoje se od više komponenti koje su ručno zamiješane špatulom, odnosno kistićem te potom nanijele na foliju. Zatim je na uzorak ponovno stavljena folija izrezana prema obliku gornje premolarne metalne brave i pritisnuta bravicom nošenom pincetom ujednačenom masom. Viškovi materijala pažljivo su odstranjeni dentalnom sondom. Uzorak je osvjetľjavan 10 sekundi (po 5 sekundi s mezijalne i distalne strane), odnosno 20 sekundi (po 10 sekundi s mezijalne i distalne strane) lampom Bluephase Syle (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) pri intenzitetu svjetlosti 1100 mW/cm² (slika 8) koji je provjeravan radiometrom Bluephase Meter (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Uzorci kompozita i kombinacija zatim su odstranjeni između folija, dok su uzorci adheziva, obzirom na lomljivost, ostavljeni na donjoj foliji koja je služila kao nosač.



Slika 8. Položaj lampe neposredno prije osvjetľjavanja uzoraka.

3.2.2. Određivanje stupnja konverzije ortodontskih adhezivnih sustava

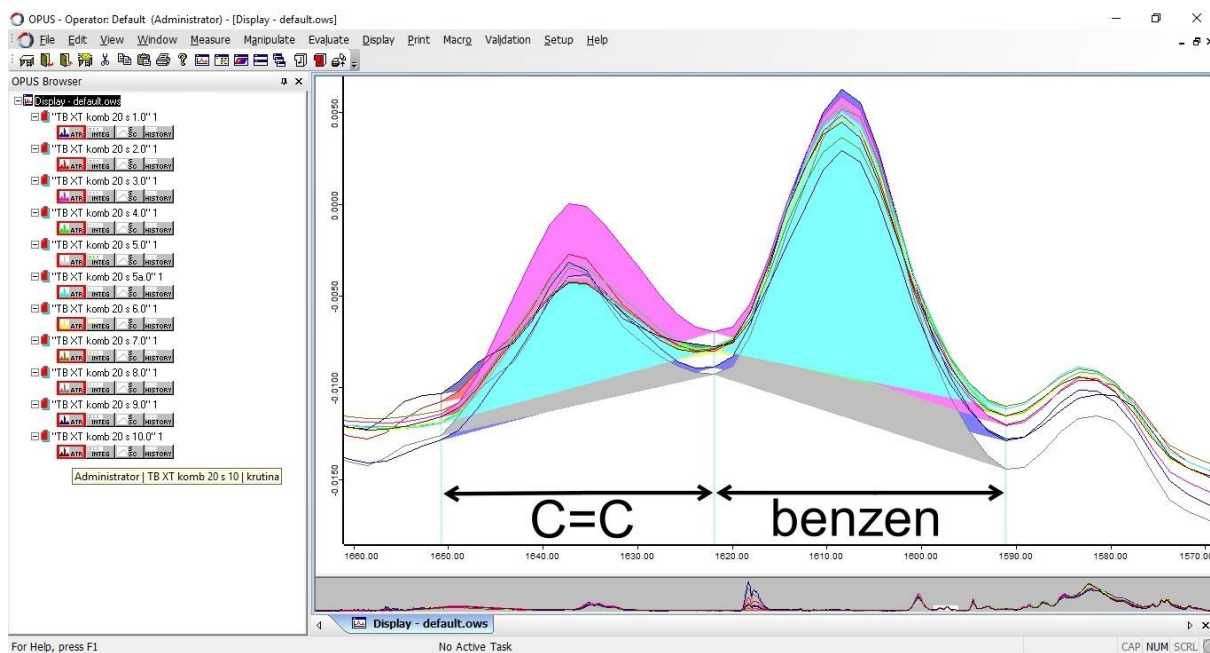
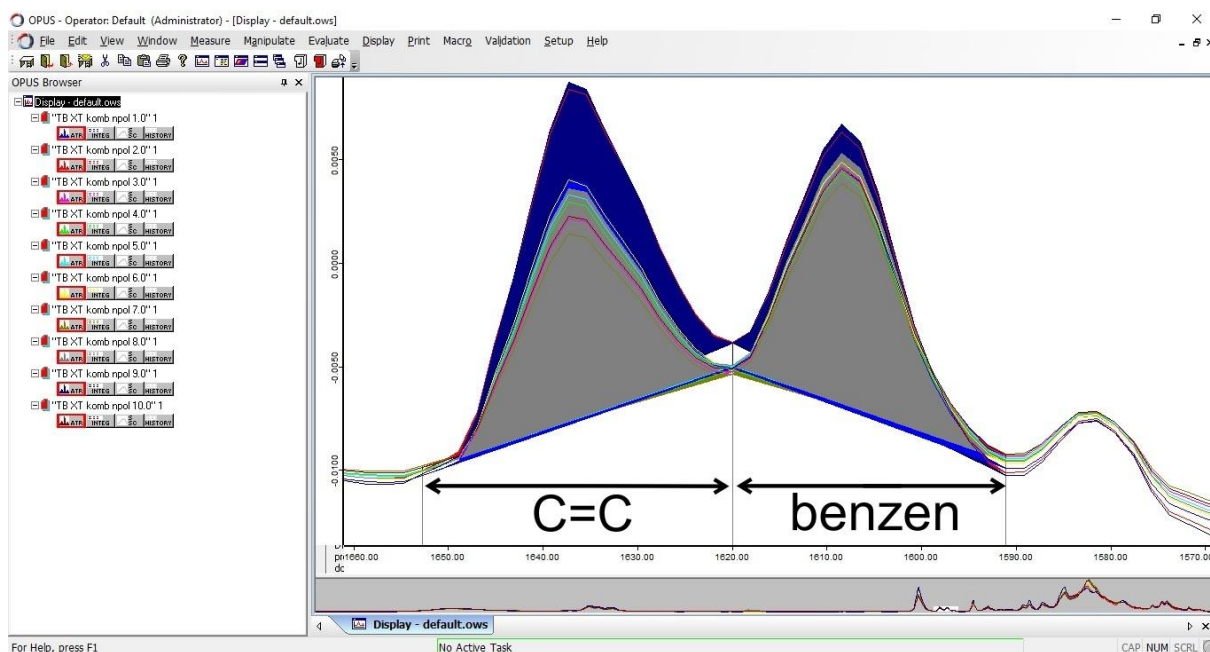
FTIR spektroskopija provedena interferometrom EQUINOX 55 (Bruker Corporation, Billerica, SAD) tehnikom prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) pomoću MIRacle ATR nosača s refleksijskim elementom od kristala dijamanta i cinkova selenida (Pike Technologies, Fitchburg, SAD). Spektri su očitani i obrađeni u programu OPUS (Bruker Corporation, Billerica, SAD). Svaki od uzoraka za određivanje stupnja konverzije pripremljen je u 10 primjeraka. Ukupno je izrađeno 360 uzoraka polimeriziranih materijala (18 materijala u dva vremena osvjetljavanja s 10 primjeraka po materijalu). Uzorci nepolimeriziranih materijala nanoseni su izravno na refleksijski kristal, također u 10 primjeraka po materijalu (ukupno 180 uzoraka).

Spektar svakoga primjerka snimljen je u području infracrvenoga zračenja 4000 do 600 cm^{-1} pri razlučivanju od 4 cm^{-1} i kao rezultat uprosječivanja 32 snimke. Između svakoga snimanja i postavljanja novog uzorka površina je kristala očišćena 96% etanolom. Svi snimljeni ATR spektri korigirani su algoritmom "extended ATR correction" i normalizirani. Prilikom konverzije metakrilata smanjuje se intenzitet vrpce koja odgovara istezanju dvostruke C=C veze monomera na 1637 cm^{-1} , dok se vrpca istezanja benzena pri 1608 cm^{-1} ne mijenja, stoga je ona uzeta kao referentna (slika 9). Udio dvostrukih veza preostalih u uzorku nakon konverzije (engl. residual double bonds, RDB) izračunat je prema izrazu:

$$\text{RDB} = A_p(\text{C}=\text{C}) * A_m(\text{benz}) / A_m(\text{C}=\text{C}) * A_p(\text{benz}) \quad (1)$$

pri čemu je $A(\text{C}=\text{C})$ površina vrpce istezanja dvostruke C=C veze, a $A(\text{benz})$ površina vrpce istezanja benzena. Subskripti p i m u izrazu označavaju polimer odnosno monomer. DC je izračunat prema izrazu:

$$\% \text{ DC} = 100 * (1 - \text{RDB}). \quad (2)$$



Slika 9. Analiza površina vrpce C=C veza i benzena na nepolimeriziranim (gore) i polimeriziranim (dolje) uzorcima u programu OPUS (Bruker Corporation, Billerica, SAD). Superponirane su vrpce za deset uzoraka. Vidljivo je smanjenje u površinama vrpca C=C veza kod polimeriziranih uzoraka, dok su površine vrpce benzene ostale jednake.

3.2.3. Mjerenje mikrotvrdoće kombinacija adheziva i kompozita

Mikrotvrdoća je mjerena za kombinacije adheziva i kompozita, na 10 uzoraka po materijalu, uređajem Leica VMHT MOT (Walter Uhl, Asslar, Njemačka). Korištena je Vickersova metoda, utiskivanjem četverostrane dijamantne piramide vršnoga kuta 136° aplikacijom sile od 1 N (100 g) tijekom 15 sekundi. Tvrdoća po Vickersu (engl. hardness Vickers, HV) izračunata je prema izrazu

$$HV=0,0018544 \times L/d^2 \quad (3)$$

„L“ izražava opterećenje u gramima, a „d“ je prosjek izmjerenih dužina dijagonala piramide u milimetrima. Očitavanja su rađena pri povećanju 10x na dva mjesta na svakom uzorku kako bi se kontrolirala homogenost uzorka te je svako očitavanje rađeno dva puta za kontrolu preciznosti.

Potom je svaki uzorak stavljen u 1 mL umjetne sline (sastav: 1.5g/L KCl, 1.5g/L NaHCO_3 , 0,5g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,5g/L KSCN, 0.9g/L mliječna kiselina, pH 4.8 [90] u epruvetama od 1.5 mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Uranjanje je trajalo 28 dana i slina nije mijenjana. Uzorci su stavljeni u inkubator pri 37°C , a pH 4.8 je bio simulacija acidogenoga pH profila dentobakterijskoga plaka staroga jedan i dva dana [71].

Nakon uranjanja, ponovno je izmjerena mikrotvrdoća istih uzoraka kako je gore opisano.

3.2.4. Citohalazinom B blokirani mikronukleus test

Za CBMN-test pripremljeno je 36 uzoraka polimeriziranih materijala (18 materijala u dvama vremenima osvjetljavanja). Osim toga, pripremljena su dva uzorka prozirne folije kao negativna kontrola za uzorke koji su u kulturu uneseni s folijom, jedan osvjetljavao 10 sekundi, a drugi 20 sekundi. Uzorci su pripremljeni u sterilnim uvjetima u bezprašnoj komori. Masa uzoraka mjerena je na analitičkoj vagi Nimbus® NBL 124i (Adam Equipment Co Ltd, Milton Keynes, UK) te je prosječno iznosila 5,5 mg. Uzorci su imali volumen 0,004 cm³ i površinu 0,27 cm² u 5 mL ekstrakcijskoga volumena.

U pilot-istraživanju korištena je komercijalna kultura imortaliziranih humanih gingivnih fibroblasta HGF-1 (ATCC® CRL-2014™, American Type Culture Collection, Manassas, SAD). Međutim, stanice su vrlo brzo dosegle senescenciju i nisu nastavile rasti. Stoga je odlučeno istraživanje provesti na humanim limfocitima periferne krvi uzetim od zdravoga donora. Na pripremljenu kulturu limfocita stavljen je po 1 uzorak. Kao negativna kontrola korišten je stanični medij Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), a kao pozitivna kontrola etilmetanosulfonat (EMS) u konačnoj koncentraciji 10 µg/mL kulture. Istraživanja su obavljena u duplikatnim kulturama. Kulture su izložene ortodontskim materijalima 24 sata, nakon čega je dodan fitohemaglutinin kao mitogen limfocita, nakon 44. sata dodan je citohalazin B u koncentraciji 6 µg/mL B i 72. sata prekinuta je kultura u svrhu izrade preparata. Svaki je preparat fiksiran, octenom kiselinom i metanolom u v:v= 1:3. Preparati su se sušili 24 sata, a zatim su obojani 5% otopinom Giemse u trajanju 10 minuta.

Analiza preparata provedena je pod svjetlosnim mikroskopom Olympus BM-2 (Olympus, Tokio, Japan). Za svaki preparat, pod povećanjem 400x, određen je indeks diobe jezgara (engl. *cytokinesis block proliferation index*, CBPI) kao kontrola citotoksičnosti, na 1000 stanica [121]. CBPI se računa prema sljedećem izrazu:

$$\text{CBPI} = [(1 \times \text{broj mononuklearnih stanica}) + (2 \times \text{broj binuklearnih stanica}) + (3 \times \text{broj multinuklearnih stanica})] / \text{ukupan broj stanica} \quad (4)$$

Kromatinske anomalije analizirane su pod povećanjem 1000x, prema kriterijima HUMN [53], na 1000 binuklearnih stanica, u duplikatu.

3.2.5. Komet test na limfocitima periferne krvi čovjeka

Nakon 24 sata tretmana 1 mL pune humane krvi u prisustvu 1 mL medija RPMI-1640 uzorcima kompozita, pozitivnom kontrolom (10 µg/ml EMS) i negativnom kontrolom fosfatnim puferom PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) uzorci su centrifugirani 4 minute na 1000 rpm te je odstranjen supernatant. Kultura limfocita je resuspendirana i 6 µL kulture je pomiješano sa 100 µl 0,5% otopine agaroze niskoga tališta (engl. low melting point, LMP) zagrijane na 37°C. Suspenzija je nanescena na predmetna stakla obložena agarozom normalnog tališta (engl. normal melting point, NMP) i ostavljena na ledu 10 minuta da LMP agaroz polimerizira. Stakalca s limfocitima uronjena su u otopinu za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris HCl, 1% Na-lauroilsarkozinat, 1% Triton X-1000 i 10% dimetil sulfoksid, pH 10,0) u hladnjaku u mraku na 4°C kroz 1 dan. Preparati su zatim denaturirani u otopini 300 mM NaOH i 1 mM Na₂EDTA kojoj je pH 13, kroz 20 minuta. Stakalca su postavljena u vodoravni sustav za elektroforezu (kadica) koji se puni puferom jednakoga sastava kao pufer za denaturaciju. Elektroforeza je provedena 20 minuta uz napon 1 V/cm i jakost struje 300 mA. Potom su stakalca isprana u svrhu neutralizacije i renaturizacije DNK. Stakalca su dehidrirana serijom etanola (75% i 100%), sušena na zraku i pohranjena do analize. Prije analize preparati su bojani otopinom etidijevoga bromida 10% (težina/volumen), zatim analizirana epifluorescentnim mikroskopom Olympus BX 51 (Olympus, Tokyo, Japan). Korištenjem programa za analizu preparata komet testa Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd. Suffolk, Halstead, UK) određeni su dužina repa i intenzitet fluorescencije (% DNK) repa kometa za 100 nukleoida po tretmanu. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

3.3. Statistička obrada podataka

Veličina je uzorka za ispitivanje DC-a određena u statističkome softveru MedCalc 14.8.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija) prema objavljenim podacima [59, 63, 74]. Uz pretpostavku da će razlika u DC-u između dva slična materijala biti vrlo mala i iznositi 2 uz nejednaka raspršenja u ispitivanim skupinama - standardne devijacije od 1,7 i 1,3 uz veličinu učinka od 80% i razinu značajnosti 0,05, bilo je potrebno po 10 uzoraka da bi se pronašla detektabilna razlika.

Shapiro-Wilkovljev test korišten je za procjenu normalnosti razdiobe. Kako vrijednosti DC nisu slijedile normalnu razdiobu, podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon, a u statističkoj analizi korišteni su neparametrijski testovi za usporedbu razlika između grupa kompozita, adheziva i kombinacija (Kruskal-Wallisov test s Mann-Whitneyevim post-hoc testovima uz Bonferronijevu korekciju p-vrijednosti za višestruke usporedbe) te između vremena osvjetljavanja u istoga materijala (Mann-Whitneyev test). Veličina učinka je kvantificirana formulom $r = z / \sqrt{N}$ i interpretirana po Cohenovim i Rosenthalovim kriterijima $r = 0,1$ mala, $0,3$ = umjerena, $0,5$ = velika i $0,7$ = vrlo velika [140].

Mikrotvrdoća je za svaki uzorak prikazana je kao medijan i interkvartilni raspon obzirom da podaci nisu slijedili normalnu razdiobu. Razlike u mikrotvrdoći unutar istih materijala jednakog vremena osvjetljavanja prije i poslije uranjanja u umjetnu slinu analizirane su Wilcoxonovim testom parova. Za analizu razlika u mikrotvrdoći između istih materijala osvjetljivanih 10 i 20 sekundi proveden je Mann-Whitneyjev test. Kruskal-Wallisovim testom s Mann-Whitneyjevim testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe analizirane su razlike između različitih materijala jednakog vremena osvjetljavanja. Pearsonova korelacija korištena je za ispitivanje povezanosti između DC i mikrotvrdoće.

Rezultati CBMN-testa analizirani su χ^2 testom. Za ispitivanje korelacije rezultata CBMN-testa s DC-em korištena je Pearsonova korelacija. Za rezultate komet testa, normalizacija parametra dužine repa učinjena je logaritmiranjem mjerenja po bazi 10 [95]. Istovremeno, vrijednosti intenziteta repa prije logaritmizacije dodana je vrijednost 1,0 kako bi se izbjegli negativni rezultati normalizacije razdiobe [96], nakon čega je provedena jednofaktorska analiza varijance (ANOVA) uz Tukeyjevu post hoc analizu u slučaju statističke značajnosti. Multiplom linearnom i logističkom regresijom

procijenjeno je u kojoj su mjeri vrsta materijala (kompozit, bond ili kombinacija), bioaktivnost/biointeraktivost, prisutnost fluorida, vrijeme polimerizacije te stupanj konverzije odrednice genotoksičnosti.

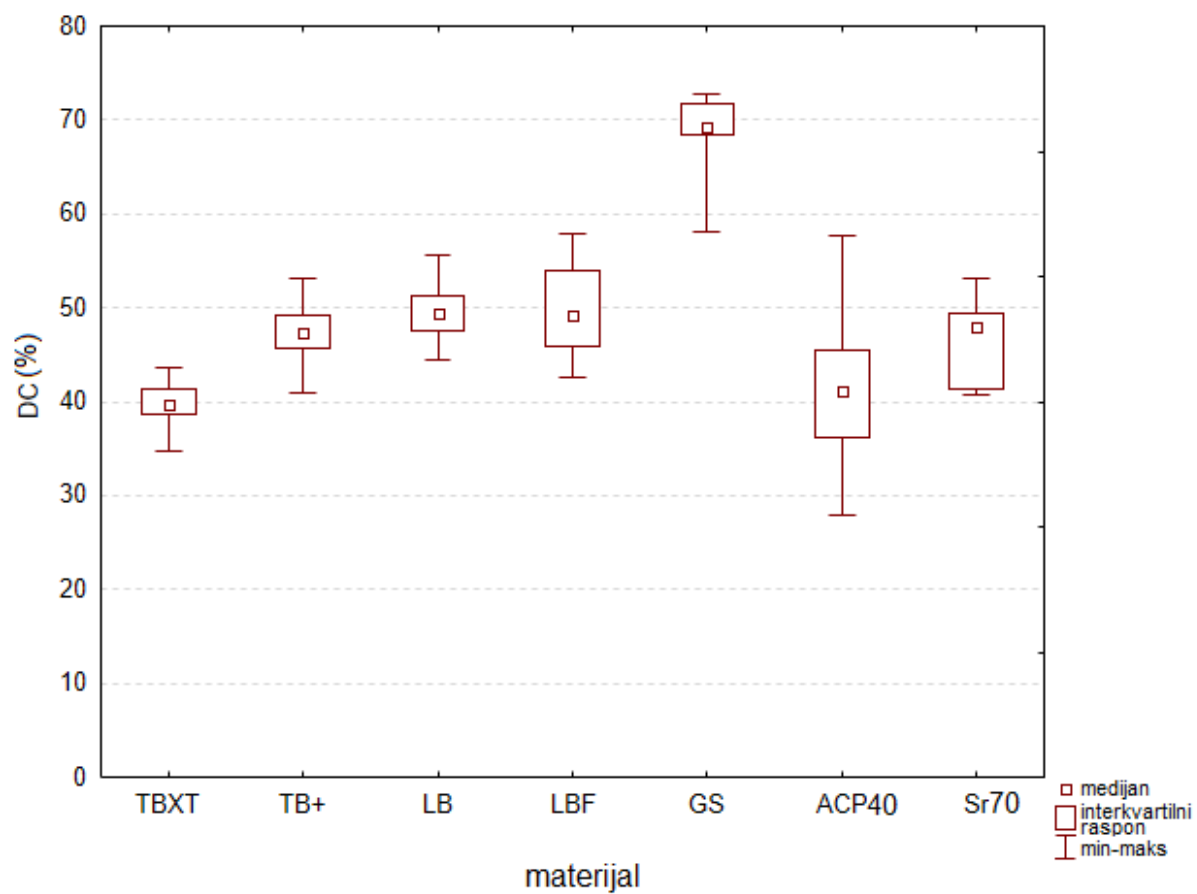
Analiza podataka provedena je u statističkim programima SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, SAD) i Statistica 13.2 (Dell Software, Round Rock, SAD) uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Analiza stupnja konverzije kompozita, adheziva i njihovih kombinacija

Podaci o DC-u kompozita nisu slijedili normalnu razdiobu (Shapiro-Wilkovljev test, $p=0,002$), ni za kompozite osvjetljavane 10 sekundi ($p=0,002$), ni za kompozite osvjetljavane 20 sekundi ($p=0,002$). Za adhezive ukupno podaci su slijedili normalnu razdiobu ($p=0,188$), za adhezive osvjetljavane 10 sekundi nisu slijedili normalnu razdiobu ($p=0,022$), dok su podaci za adhezive osvjetljavane 20 sekundi slijedili normalnu razdiobu ($p=0,419$). Za kombinacije adheziva i kompozita ukupno, podaci nisu slijedili normalnu razdiobu ($p<0,001$), ni za kombinacije osvjetljavane 10 sekundi ($p=0,030$), kao ni za kombinacije osvjetljavane 20 sekundi ($p=0,007$).

Nakon osvjetljavanja 10 sekundi, razlike između kompozita bile su značajne ($p<0,001$) te su se središnje vrijednosti DC-a povećavale sljedećim redom: TBXT<ACP40<TB+<Sr70<LBF<LB<GS (slika 10, tablica 2). TBXT je imao značajno niži DC od svih materijala osim ACP40 uz veliku do vrlo veliku veličinu učinka ($r=-0,693$ do $-0,845$; $p\leq 0,002$). GS je imao najveći DC, značajno veći od svih ostalih uz vrlo veliku veličinu učinka ($r=-0,845$; $p<0,001$). TB+, LB, LBF, Sr70 i ACP40 se nisu znatno razlikovali.



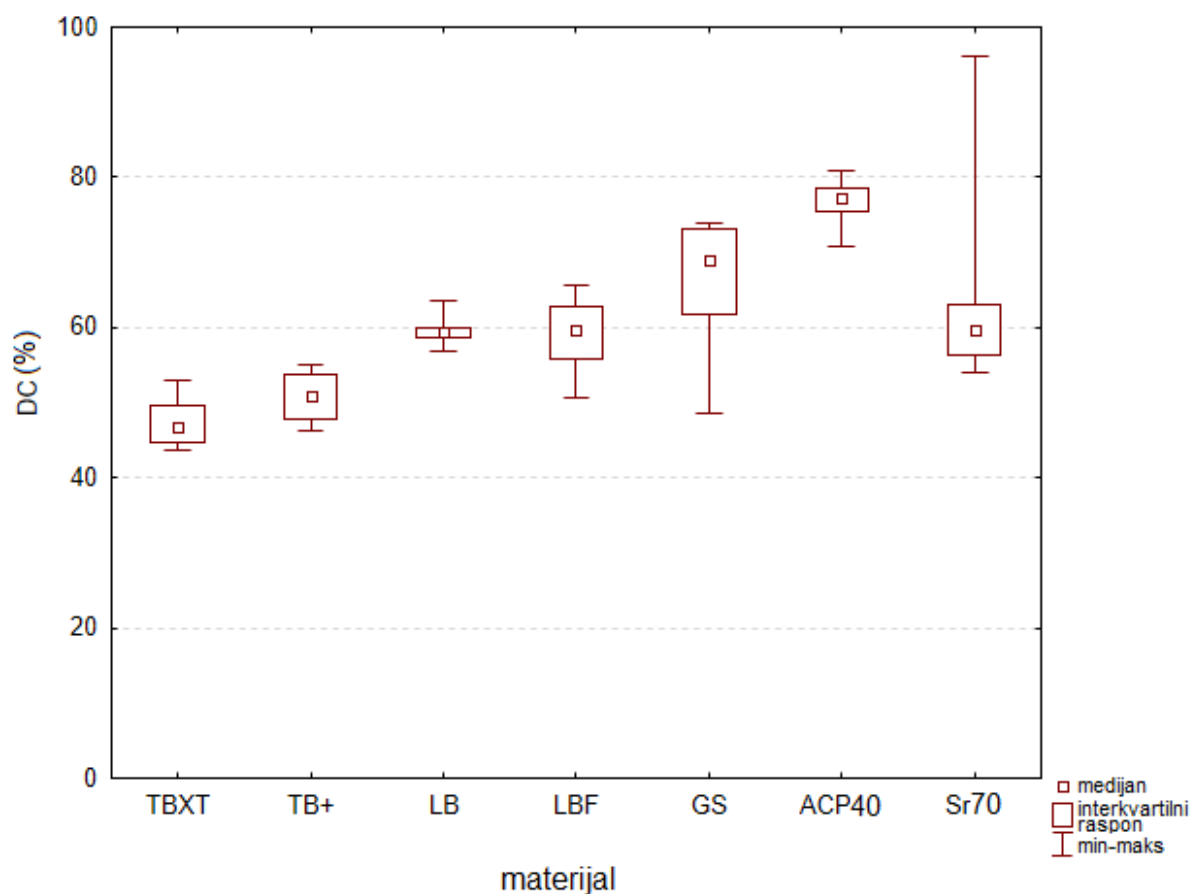
Slika 10. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih kompozita pri 10 sekundi osvjetljavanja.

Tablica 2. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije s naznačenim značajnim razlikama između kompozita pri 10 sekundi osvjetljavanja

kompozit	N	medijan*	25 Q-75 Q	prosjek	SD	95% CI	min	max
TBXT	10	39,69 ^a	38,75-41,41	39,67	2,48	37,90-41,45	34,78	43,69
TB+	10	47,31 ^b	45,75-49,18	47,59	3,67	44,96-50,21	40,98	53,13
LB	10	49,32 ^b	47,49-51,38	49,42	3,47	46,94-51,90	44,40	55,65
LBF	10	49,21 ^b	45,85-54,03	49,64	5,02	46,05-53,23	42,54	57,86
GS	10	69,29 ^c	68,36-71,75	68,96	4,22	65,94-71,98	58,13	72,81
ACP40	10	41,13 ^{ab}	36,22-45,50	41,78	8,66	35,58-47,97	27,98	57,75
Sr70	10	48,05 ^b	41,27-49,42	46,89	4,47	43,69-50,9	40,64	53,15

*Kruskal-Wallisov test s Mann-Whitneyjevim testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno. N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; SD, standardna devijacija; 95% CI, 95% interval pouzdanosti; min, minimum; max, maksimum.

DC se značajno razlikovao između kompozita i nakon osvjetljavanja 20 sekundi ($p < 0,001$). Povećavao se sljedećim redom: TBXT < TB+ < LB < LBF < Sr70 < GS < ACP40 (slika 11, tablica 3). ACP40 je imao značajno veći DC od svih ostalih materijala uz vrlo veliku veličinu učinka ($r = -0,837$; $p < 0,001$). TBXT je imao znatno manji DC od svih ostalih materijala, osim od TB+ uz vrlo veliku veličinu učinka ($r = -0,778$ do $-0,845$; $p \leq 0,001$). Između LB, LBF i GS nije bilo znatnih razlika.



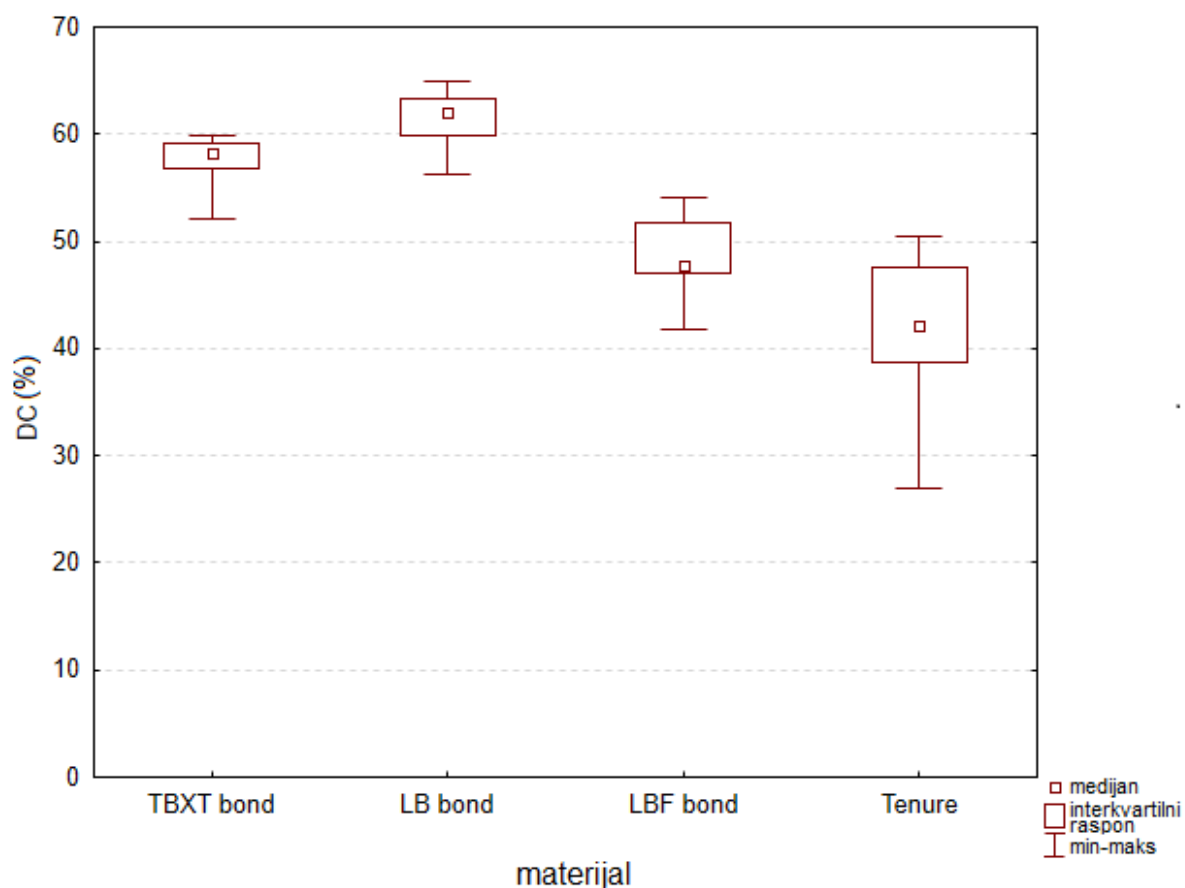
Slika 11. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih kompozita pri 20 sekundi osvjetljavanja

Tablica 3. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije s naznačenim značajnim razlikama između kompozita pri 20 sekundi osvjetljavanja

kompozit	N	medijan*	25 Q-75 Q	prosjek	SD	95% CI	min	max
TBXT	10	46,81 ^a	44,71-49,63	47,50	3,21	45,20-49,79	43,78	53,04
TB+	10	51,00 ^a	47,80-53,73	50,75	3,45	48,28-53,22	46,23	55,08
LB	10	59,45 ^b	58,75-60,05	59,67	1,67	58,47-60,86	56,93	63,45
LBF	10	59,70 ^b	55,75-62,82	59,15	4,57	55,88-62,42	50,65	65,69
GS	10	69,10 ^b	61,84-73,10	66,34	8,40	60,33-72,35	48,55	74,02
ACP40	10	77,24 ^c	75,51-78,46	76,86	2,76	74,89-78,83	70,86	80,84
Sr70	10	59,78 ^b	56,32-63,10	62,94	12,08	54,30-71,58	54,13	96,04

*Kruskal-Wallisov test s Mann-Whitneyevim testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno. N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; SD, standardna devijacija; 95% CI, 95% interval pouzdanosti; min, minimum; max, maksimum.

DC je za adhezive osvjetljavane 10 sekundi rastao sljedećim redoslijedom: Tenure<LBF bond<TBXT bond<LB bond (slika 12, tablica 4). LB je postigao značajno viši DC od ostalih adheziva uz veliku, odnosno vrlo veliku veličinu učinka ($r=-0,600-0,837$; $p<0,001$). Razlika između LB i LBF imala je vrlo veliku veličinu učinka ($r=0,837$; $p<0,001$). Tenure je pokazao najveće raspršenje podataka. Tenure nije imao znatno niži DC od LBF, ali jest od ostalih uz vrlo veliku veličinu učinka ($r=0,837$; $p<0,001$).



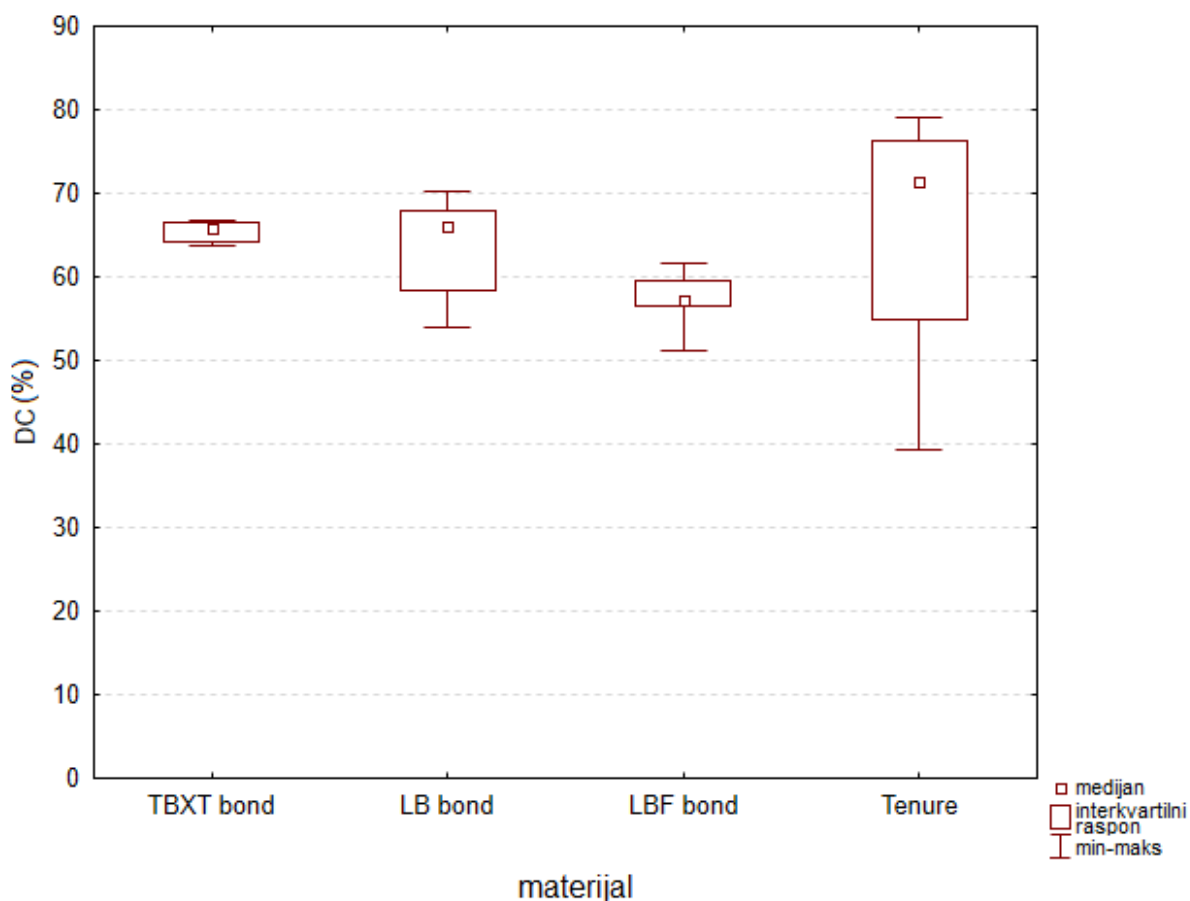
Slika 12. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih adheziva pri 10 sekundi osvjetljavanja.

Tablica 4. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije s naznačenim značajnim razlikama između adheziva pri 10 sekundi osvjetljavanja

Adheziv	N	medijan*	25 Q – 75 Q	prosjek	SD	95% CI	min	max
TBXT bond	10	58,29 ^a	56,87-59,07	57,65	2,27	56,03-59,28	52,05	59,89
LB bond	10	62,12 ^b	59,91-63,36	61,46	2,76	59,49-63,43	56,28	64,90
LBF bond	10	47,70 ^c	46,97-51,69	48,60	3,62	46,01-51,19	41,87	54,01
Tenure	10	42,21 ^c	38,66-47,59	41,55	7,74	36,01-47,08	26,99	50,41

*Kruskal-Wallisov test s Mann-Whitneyevim testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno. N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; SD, standardna devijacija; 95% CI, 95% interval pouzdanosti; min, minimum; max, maksimum.

Središnja je vrijednost DC-a za adhezive osvjetljavane 20 sekundi rasla sljedećim redoslijedom: LBF bond<TBXT bond<LB bond<Tenure (slika 13, tablica 5). LBF bond imao je znatno niži DC samo od TBXT bonda uz vrlo veliku veličinu učinka ($r=0,837$; $p<0,001$). Tenure je ponovno pokazao najveće raspršenje podataka, stoga, iako je imao najveći DC, razlika nije bila značajna.



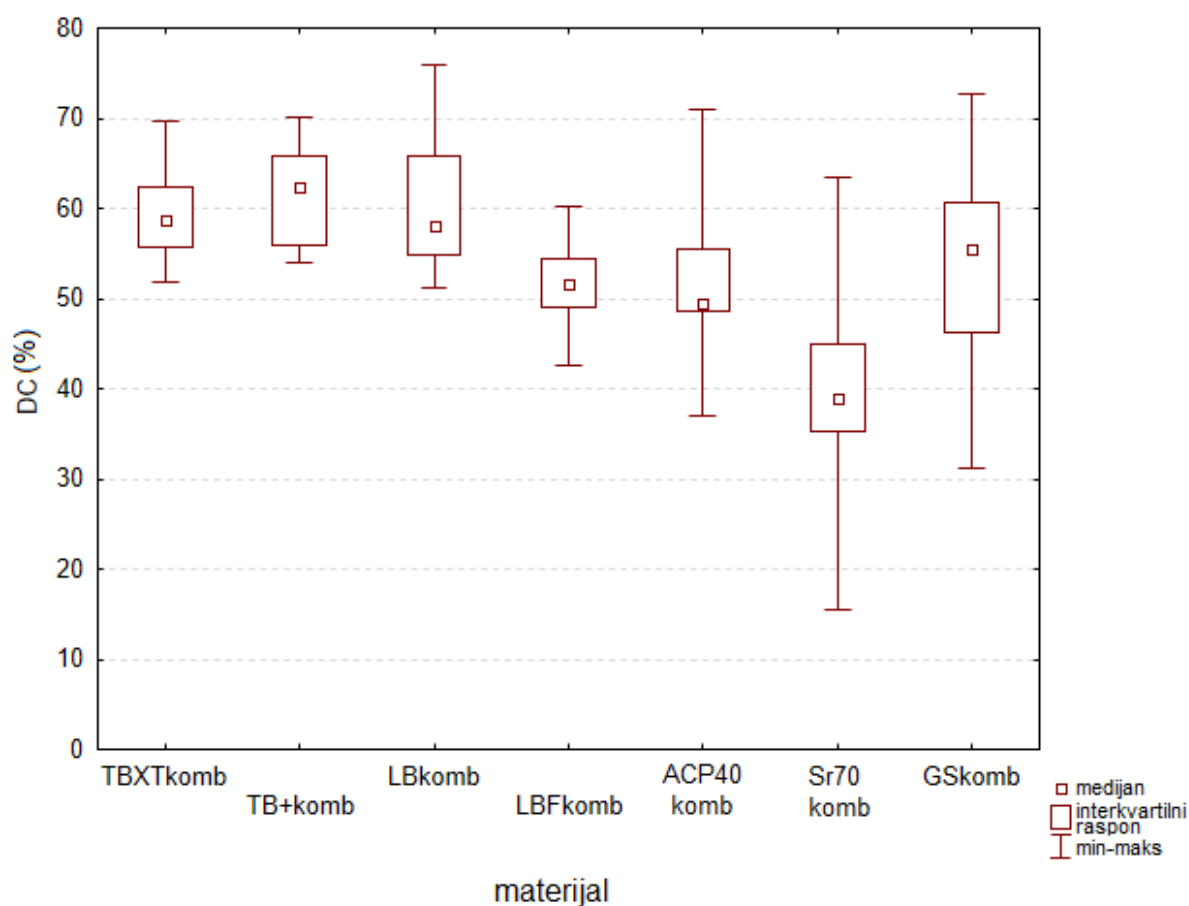
Slika 13. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih skupina adheziva pri 20 sekundi osvjetljavanja.

Tablica 5. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije s naznačenim značajnim razlikama između adheziva pri 20 sekundi osvjetljavanja

adheziv	N	medijan*	25 Q-75 Q	prosjek	SD	95% CI	min	max
TBXT bond	10	65,92 ^a	64,21-66,48	65,53	1,16	64,70-66,36	63,73	66,84
LB bond	10	66,10 ^{ab}	58,45-67,86	63,36	6,38	58,80-67,92	54,03	70,33
LBF bond	10	57,27 ^b	56,50-59,63	57,14	3,23	54,83-59,45	51,16	61,63
Tenure	10	71,45 ^{ab}	54,91-76,29	65,75	13,18	56,32-75,17	39,37	79,07

*Kruskal-Wallisov test s Mann-Whitneyevim testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno. N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; SD, standardna devijacija; 95% CI, 95% interval pouzdanosti; min, minimum; max, maksimum.

Nakon osvjetljavanja 10 sekundi, središnje vrijednosti DC-a su se povećavale sljedećim redom: Sr70komb < ACP40komb < LBFkomb < GSkomb < LBkomb < TBXTkomb < TB+komb (slika 14, tablica 6). TB+komb i TBXTkomb su imale znatno veći DC samo od LBFkomb i Sr70komb, uz veliku do vrlo veliku veličinu učinka ($r=0,685-0,752$; $p\leq 0,002$). Sr70komb je imala znatno manji DC i od LBkomb uz vrlo veliku veličinu učinka ($r=0,718$; $p=0,001$), ali ne od ACP40 komb, GS komb i LBF komb.



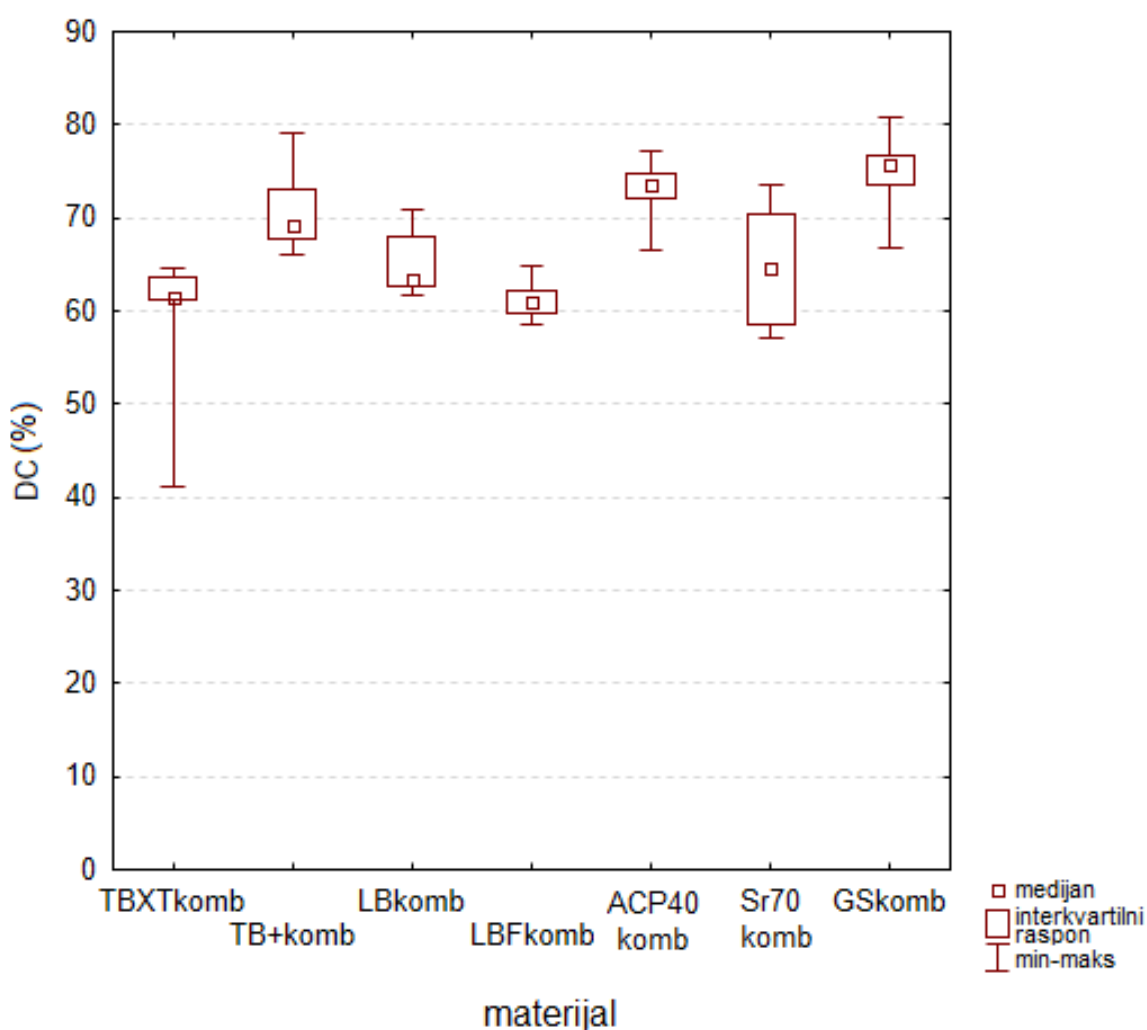
Slika 14. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih kombinacija kompozita i adheziva pri 10 sekundi osvjetljavanja.

Tablica 6. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije s naznačenim značajnim razlikama između kombinacija kompozita i adheziva pri 10 sekundi osvjetljavanja

kombinacija	N	medijan*	25 Q-75 Q	prosjek	SD	95%CI	min	max
TBXTkomb	10	58,69 ^a	55,81-62,43	59,39	4,92	55,87-62,91	51,94	69,66
TB+komb	10	62,48 ^a	56,02-65,79	61,74	5,41	57,87-65,62	53,92	70,03
LBkomb	10	58,00 ^{ab}	54,83-65,82	60,32	7,61	54,87-65,76	51,17	75,85
LBFkomb	10	51,54 ^{bc}	49,04-54,38	51,73	4,71	48,36-55,09	42,69	60,29
GSkomb	10	55,49 ^{abc}	46,29-60,74	54,22	11,63	45,90-62,54	31,21	72,69
ACP40komb	10	49,57 ^{abc}	48,53-55,49	52,21	9,65	45,30-59,11	36,99	70,96
Sr70komb	10	38,93 ^c	35,33-45,03	39,14	12,70	30,05-48,22	15,59	63,36

*Kruskal-Wallisov test s Mann-Whitneyevim testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno. N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; SD, standardna devijacija; 95% CI, 95% interval pouzdanosti; min, minimum; max, maksimum.

Nakon osvjetljavanja 20 sekundi središnje vrijednosti DC su se povećavale sljedećim redom: LBF komb < TBXT komb < LB komb < Sr70 komb < TB+ komb < ACP40 komb < GS komb (slika 15, tablica 7). GS komb i ACP40 komb su imale znatno veći DC od LB komb, LBF komb, TBXT komb i Sr70 komb, uz veliku do vrlo veliku veličinu učinka, ali ne od i TB+ komb ($r=-0,685-0,837$; $p\leq 0,002$). LBF komb je imala najmanji DC, znatno manji od TB+ komb, LB komb, GS komb i ACP40 komb, uz veliku do vrlo veliku veličinu učinka, ali ne od TBXT komb i Sr70 komb ($r=0,685-0,837$; $p\leq 0,002$).



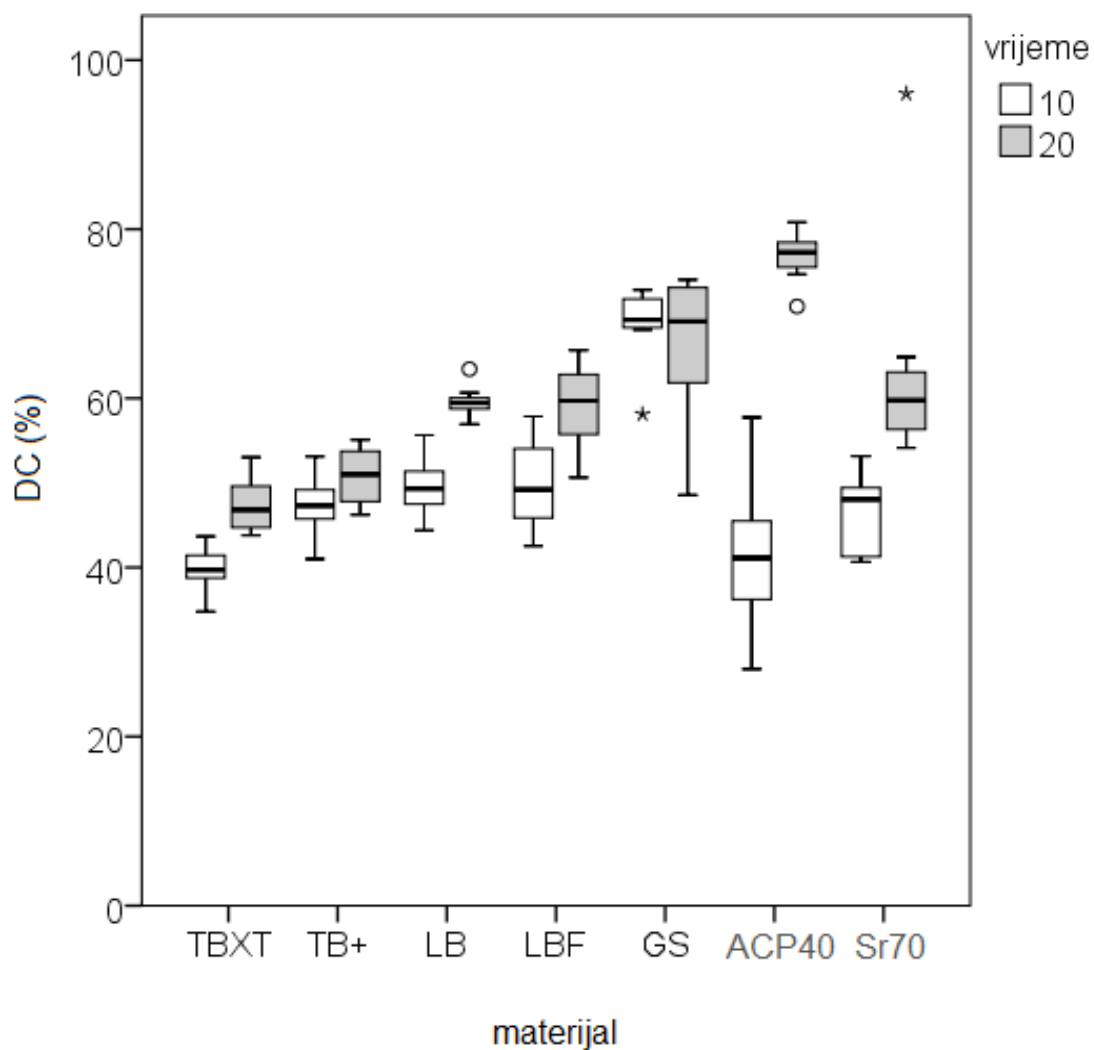
Slika 15. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih skupina kombinacija kompozita i adheziva pri 20 sekundi osvjetljavanja.

Tablica 7. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije s naznačenim značajnim razlikama između kombinacija kompozita i adheziva pri 20 sekundi osvjetljavanja

kombinacija	N	medijan*	25 Q-75 Q	prosjek	SD	95% CI	min	max
TBXT komb	10	61,57 ^{acd}	61,20-63,55	60,06	6,89	55,13-64,99	41,08	64,53
TB+ komb	10	69,26 ^{bce}	67,83-73,12	70,40	4,01	67,54-73,27	66,19	79,08
LB komb	10	63,37 ^c	62,76-67,95	65,24	3,49	62,74-67,74	61,61	70,92
LBF komb	10	61,03 ^d	59,88-62,17	61,09	1,87	59,76-62,43	58,59	64,96
GS komb	10	75,80 ^e	73,64-76,68	74,98	3,80	72,26-77,69	66,78	80,74
ACP40 komb	10	73,50 ^e	72,12-74,78	73,29	2,92	71,20-75,38	66,65	77,31
Sr70 komb	10	64,69 ^{abcd}	58,61-70,44	64,38	6,14	60,00-68,77	57,19	73,52

*Kruskal-Wallisov test s Mann-Whitneyevim testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno. N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; SD, standardna devijacija; 95% CI, 95% interval pouzdanosti; min, minimum; max, maksimum.

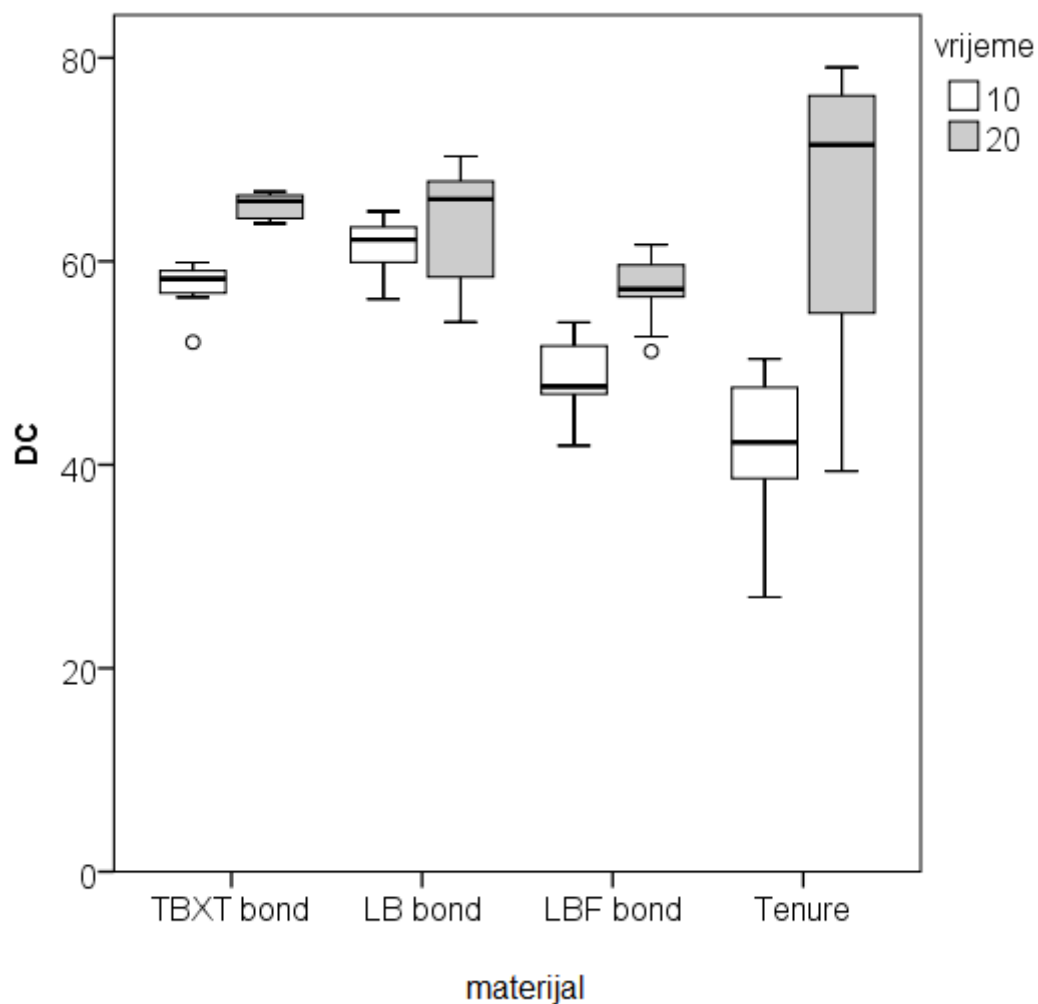
Mann-Whitneyev test pokazao je da porastom vremena osvjetljavanja, značajno raste i DC kod svih kompozita osim GS uz umjerenu do vrlo veliku veličinu učinka (slika 16; $p \leq 0,04$ $r = 0,456-0,845$). Kod GS je prosječan DC kod 20 sekundi bio nešto niži nego nakon 10 sekundi osvjetljavanja.



°outlier, *ekstrem

Slika 16. Usporedba stupnja konverzije (DC) kompozita osvjetljavanih 10 i 20 sekundi.

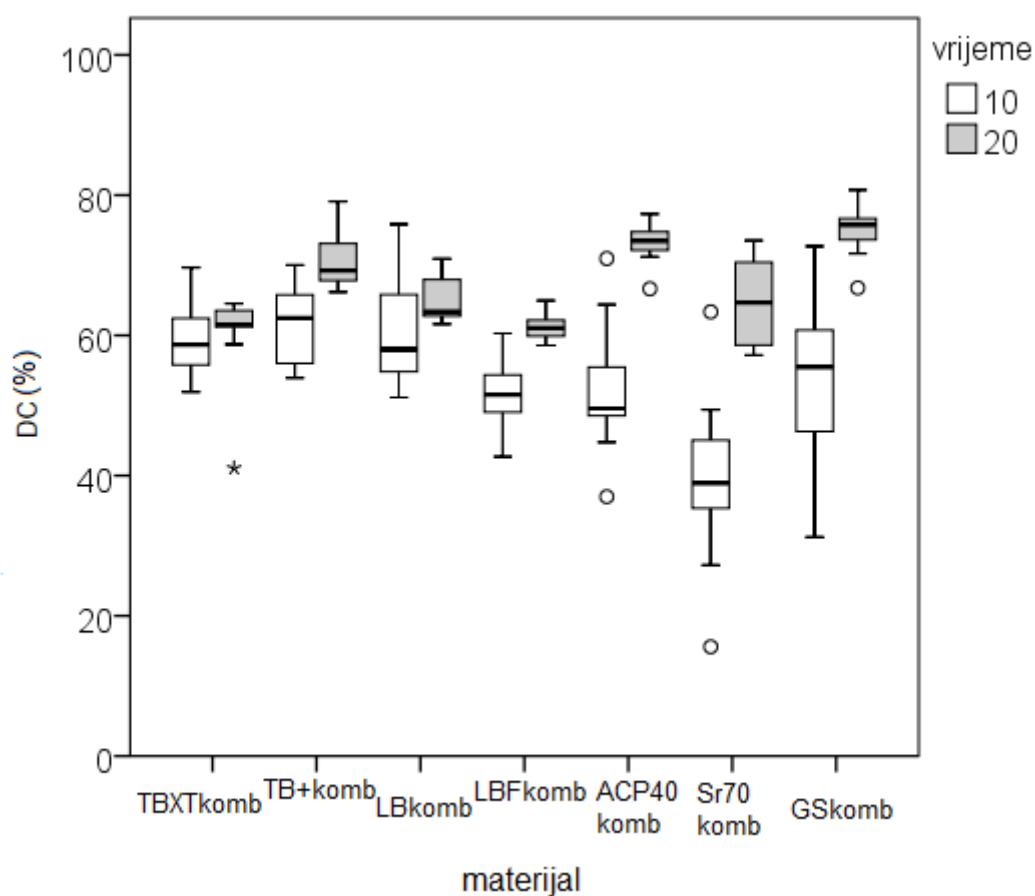
Porastom vremena osvjetljavanja, rastao je i DC kod svih adheziva (Mann-Whitneyjev test; slika 17). Razlike su bile značajne za TBXT bond, LBF bond te Tenure uz vrlo velike veličine učinka ($r=0,727-0,845$; $p\leq 0,001$).



°outlier

Slika 17. Usporedba stupnja konverzije (DC) adheziva osvjetljavanih 10 i 20 sekundi.

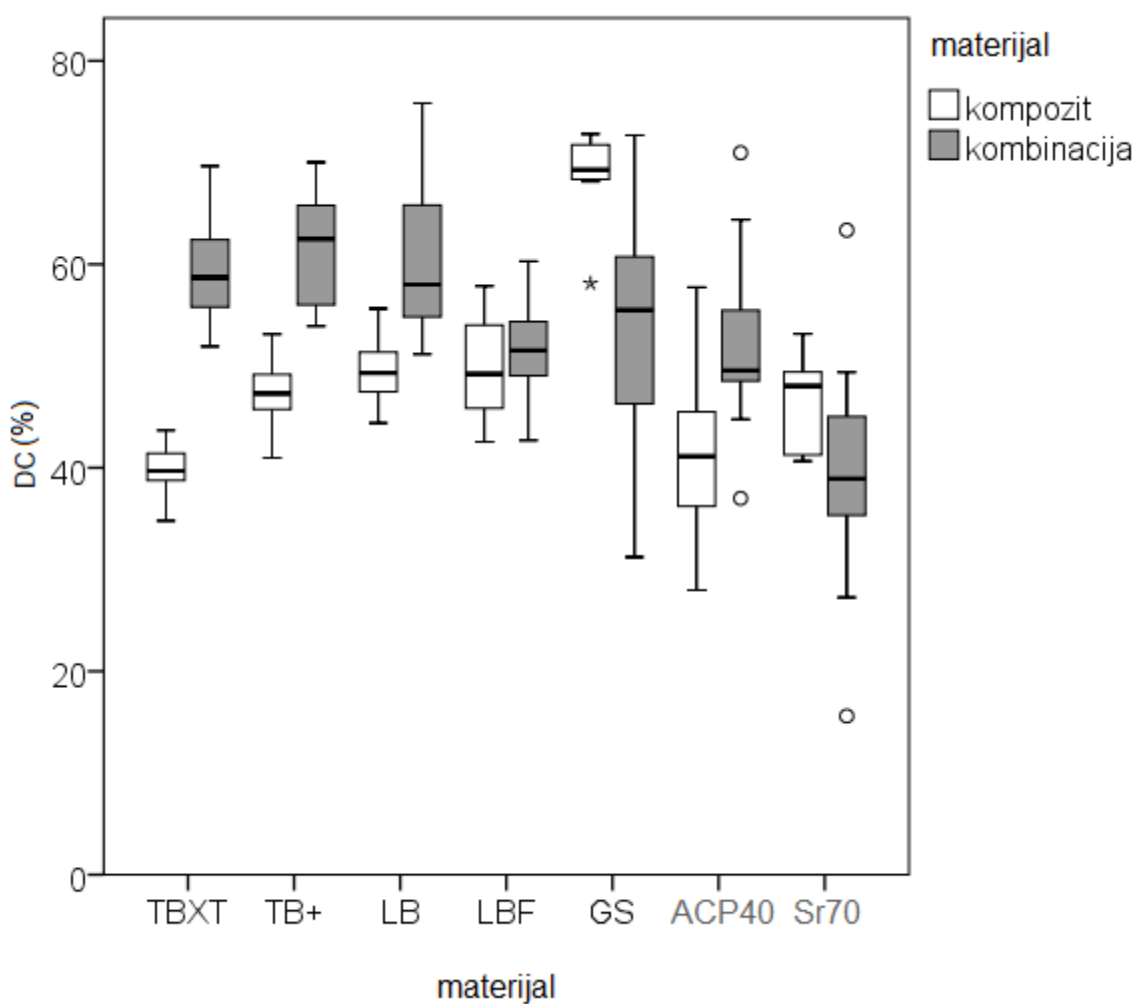
Porastom vremena osvjetljavanja, rastao je i DC kod svih kombinacija kompozita i odgovarajućih adheziva (Mann-Whitneyjev test; slika 18). Za TBXT komb razlika je bila minimalna i nije bila značajna. Za LB komb razlika je bila značajna, ali uz umjerenu veličinu učinka ($r=0,443$; $p=0,049$), dok su kod ostalih kombinacija veličine učinka bile vrlo velike ($r=0,761-0,828$; $p\leq 0,001$).



°outlier, *ekstrem

Slika 18. Usporedba stupnja konverzije (DC) kombinacija kompozita i adheziva osvjetljivanih 10 i 20 sekundi.

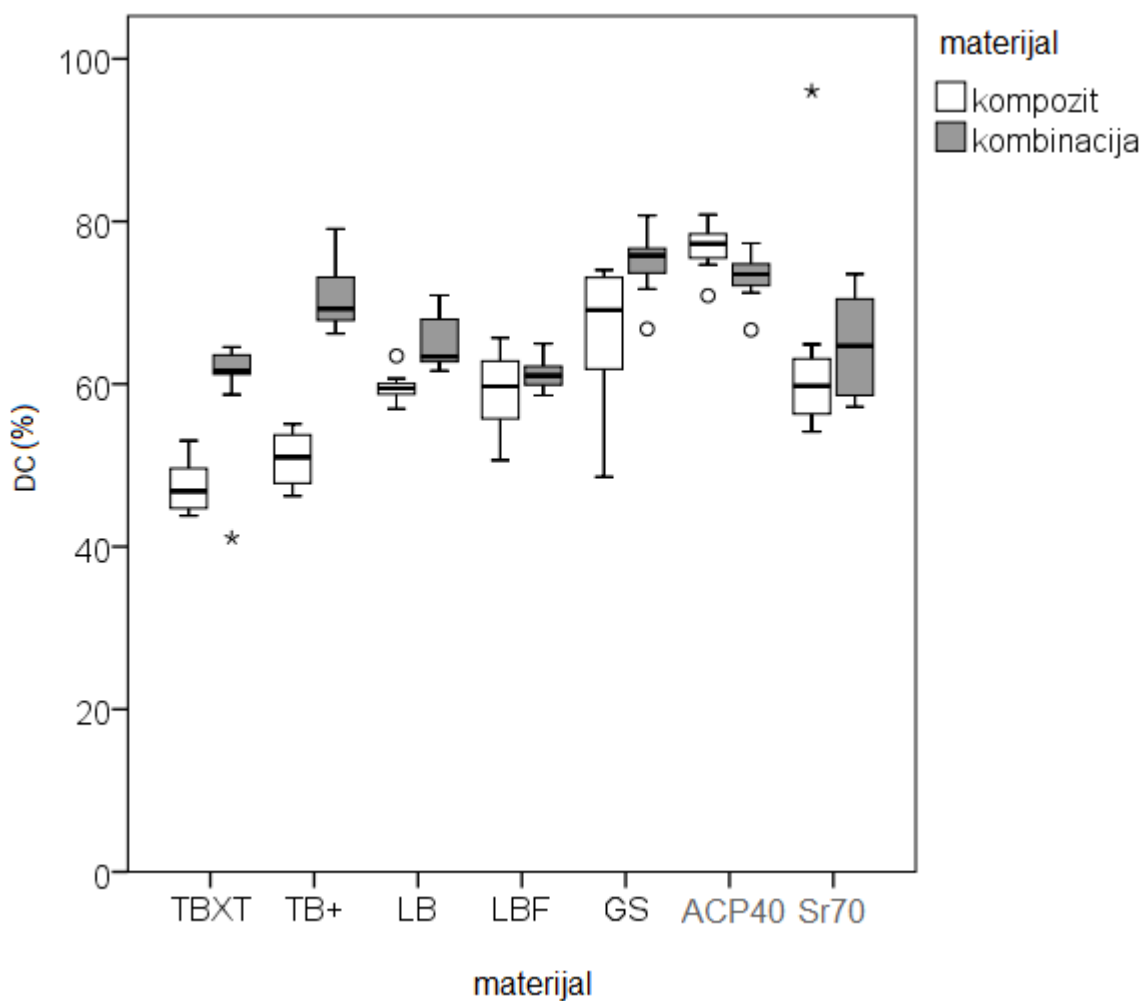
Mann-Whitneyjev test pokazao je kako su kombinacije kompozita i odgovarajućeg adheziva imale značajno veći DC nego sami kompoziti pri 10 sekundi osvjetljavanja za TBXT komb, TB+ komb, LB komb i ACP40 komb uz velike do vrlo velike veličine učinka (slika 19; $r=-0,507$ do $-0,845$; $p\leq 0,02$). Sr70 komb i GS komb pokazale su više vrijednosti DC-a nego ekvivalentni kompoziti uz umjerenu i veliku veličinu učinka ($r=0,456$ i $0,659$; $p\leq 0,04$). TBXT komb i TB+ komb pokazale su vrijednost DC-a sličnu onoj samoga adheziva TBXT bond (57,65%). Između LBF i LBF komb nije bilo znatnih razlika.



°outlier, *ekstrem

Slika 19. Usporedba stupnja konverzije (DC) kompozita i kombinacija osvjetljavanih 10 sekundi.

Mann-Whitneyjev test je pokazao kako su, nakon 20 sekundi osvjetljavanja, kombinacije imale značajno veći DC nego sami kompoziti za TBXT komb, TB+ komb, LBkomb i GSkomb uz velike do vrlo velike veličine učinka (slika 20; $r=-0,659$ do $-0,845$; $p\leq 0,003$). ACP40 komb je pokazala značajno niži DC od samog ACP40, uz veliku veličinu učinka ($r=0,575$; $p=0,01$), dok razlika između Sr70 i Sr70 komb nije bila značajna.



°outlier, *ekstrem

Slika 20. Usporedba stupnja konverzije (DC) kompozita i kombinacija osvjetljavanih 20 sekundi.

Razlika u DC-u između ACP40 i Sr70 nakon 10 sekundi osvjetljavanja nije bila značajna, dok se nakon 20 sekundi pojavila znatna razlika uz veliku veličinu učinka (tablica 8; $r=0,675$; $p=0,003$).

Tablica 8. Razlike stupnja konverzije (DC) između ACP40 i Sr70

kompozit	t (s)	N	medijan*	25 Q-75Q	p	r
ACP40	10	10	41,13*	36,22-45,50	0,082	-0,389
Sr70	10	10	48,05	41,27-49,42		
ACP40	20	10	77,24	75,51-78,46	0,003	0,675
Sr70	20	10	59,78	56,32-63,10		

*Mann-Whitneyjev test; t, vrijeme; N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; p, razina statističke značajnosti; r, veličina učinka

4.2. Analiza mikrotvrdoće (μH) kombinacija adheziva i kompozita

Kod kombinacija TBXT komb, TB+ komb, GS komb, ACP40 komb i Sr70 komb vrijednosti μH značajno su se smanjile nakon uranjanja u umjetnu slinu, uz veliku veličinu učinka (tablica 9; $r=0,626$; $p=0,005$). Za LB komb i LBF komb razlike nisu bile značajne, no vrijednosti su se nešto povećale.

.

Tablica 9. Deskriptivna statistika za μ H kombinacija osvjetljavanih 10 sekundi prije i poslije uranjanja u umjetnu slinu

		N	medijan	25 Q-75 Q	prosjek	SD	95% CI	min	max	p*	r
TBXT komb	t1	10	37,13*	31,00-42,25	36,66	5,92	31,87-41,44	28,30	45,15		
TBXT komb	t2	10	28,75	27,10-29,60	28,24	2,54	24,64-31,83	22,60	32,10	0,005	0,626
TB+ komb	t1	10	50,55	44,40-54,35	49,19	5,92	44,41-53,98	39,15	55,35		
TB+ komb	t2	10	27,65	25,00-28,80	26,54	4,56	22,94-30,13	15,15	31,80	0,005	0,626
LB komb	t1	10	38,70	33,15-47,10	39,79	11,89	35,01-44,58	21,10	60,15		
LB komb	t2	10	40,95	33,80-45,90	40,84	6,15	37,25-44,43	32,40	49,30	0,799	0,195
LBF komb	t1	10	34,45	25,25-40,35	33,99	11,15	29,21-38,78	14,75	54,60		
LBF komb	t2	10	34,55	26,50-46,00	37,05	10,45	33,46-40,64	24,85	52,45	0,386	0,195
GS komb	t1	10	23,53	22,30-26,05	24,80	4,97	20,02-29,59	18,80	34,85		
GS komb	t2	10	9,41	8,84-11,60	10,46	2,13	6,86-14,05	8,26	14,10	0,005	0,626
ACP40 komb	t1	10	0,35	0,28-0,44	0,41	0,19	-4,37-5,20	0,27	0,77		
ACP40 komb	t2	10	0,26	0,26-0,26	0,26	0,00	-3,33-3,85	0,26	0,26	0,005	0,626
Sr70 komb	t1	10	1,00	0,78-1,18	1,04	0,33	-3,74-5,83	0,67	1,83		
Sr70 komb	t2	10	0,26	0,26-0,26	0,26	0,00	-3,33-3,85	0,26	0,26	0,005	0,626

*Wilcoxonov test parova; t1, prije uranjanja, t2, poslije uranjanja; N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; SD, standardna devijacija; 95% CI, 95% interval pouzdanosti; min, minimum; max, maksimum; p, razina statističke značajnosti; r, veličina učinka

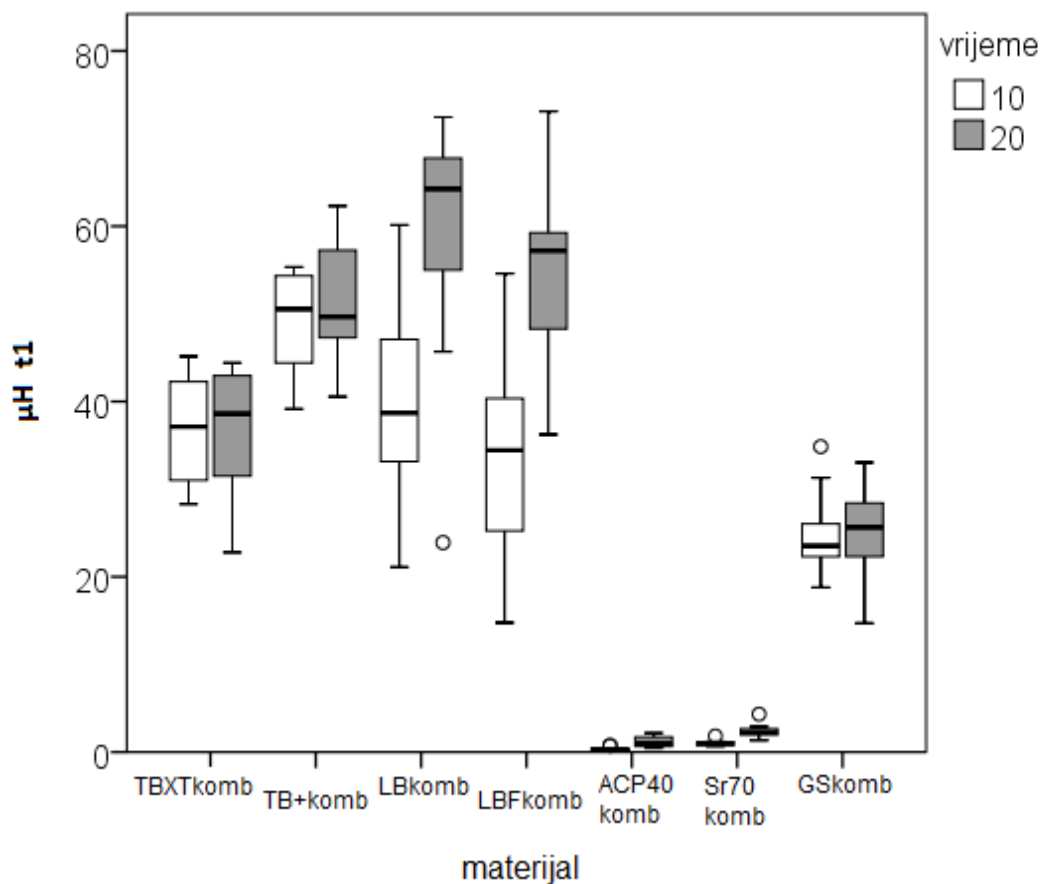
Kod kombinacija TB+ komb, GS komb, ACP40 komb i Sr70 komb vrijednosti μH značajno su se smanjile nakon uranjanja u umjetnu slinu, uz veliku veličinu učinka (tablica 10; $r=0,626$; $p=0,005$). Za TBXT komb, LB komb i LBF komb razlike nisu bile značajne.

Tablica 10. Deskriptivna statistika za mikrotvrdoću (μH) kombinacija osvjetljavanih 20 sekundi prije i poslije uranjanja u umjetnu slinu

		N	medijan	25 Q-75 Q	prosjek	SD	95% CI	min	max	p*	r
TBXT komb	t1	10	38,60	31,50-42,95	36,64	7,72	31,85-41,42	22,80	44,40		
TBXT komb	t2	10	39,90	29,30-44,10	38,32	7,90	34,72-41,91	25,70	47,40	0,139	0,330
TB+ komb	t1	10	49,65	47,30-57,25	51,45	6,57	46,66-56,23	40,55	62,30		
TB+ komb	t2	10	31,10	27,20-36,00	30,75	5,57	27,16-34,34	21,60	38,30	0,005	0,626
LB komb	t1	10	64,25	55,00-67,75	59,14	14,83	54,36-63,93	23,90	72,45		
LB komb	t2	10	46,90	43,10-64,10	51,54	12,63	47,95-55,13	35,50	69,30	0,185	0,297
LBF komb	t1	10	57,20	48,30-59,25	55,46	10,17	50,67-60,24	36,25	73,10		
LBF komb	t2	10	53,45	48,90-55,70	52,60	4,91	49,01-56,19	43,70	59,90	0,169	0,309
GS komb	t1	10	25,65	22,30-28,40	25,25	5,55	20,46-30,03	14,70	33,05		
GS komb	t2	10	12,69	10,20-13,80	12,02	2,39	8,43-15,62	7,31	14,90	0,005	0,626
ACP40 komb	t1	10	0,94	0,65-1,71	1,16	0,63	-3,62-5,95	0,45	2,18		
ACP40 komb	t2	10	0,26	0,26-0,26	0,26	0,00	-3,33-3,85	0,26	0,26	0,005	0,626
Sr70 komb	t1	10	2,22	1,97-2,65	2,42	0,81	-2,37-7,20	1,33	4,33		
Sr70 komb	t2	10	0,26	0,26-0,26	0,26	0,00	-3,33-3,85	0,26	0,26	0,005	0,626

*Wilcoxonov test parova; t1, prije uranjanja, t2, poslije uranjanja; N, veličina uzorka; 25 Q-75 Q, interkvartilni raspon; SD, standardna devijacija; 95% CI, 95% interval pouzdanosti; min, minimum; max, maksimum; p, razina statističke značajnosti; r, veličina učinka

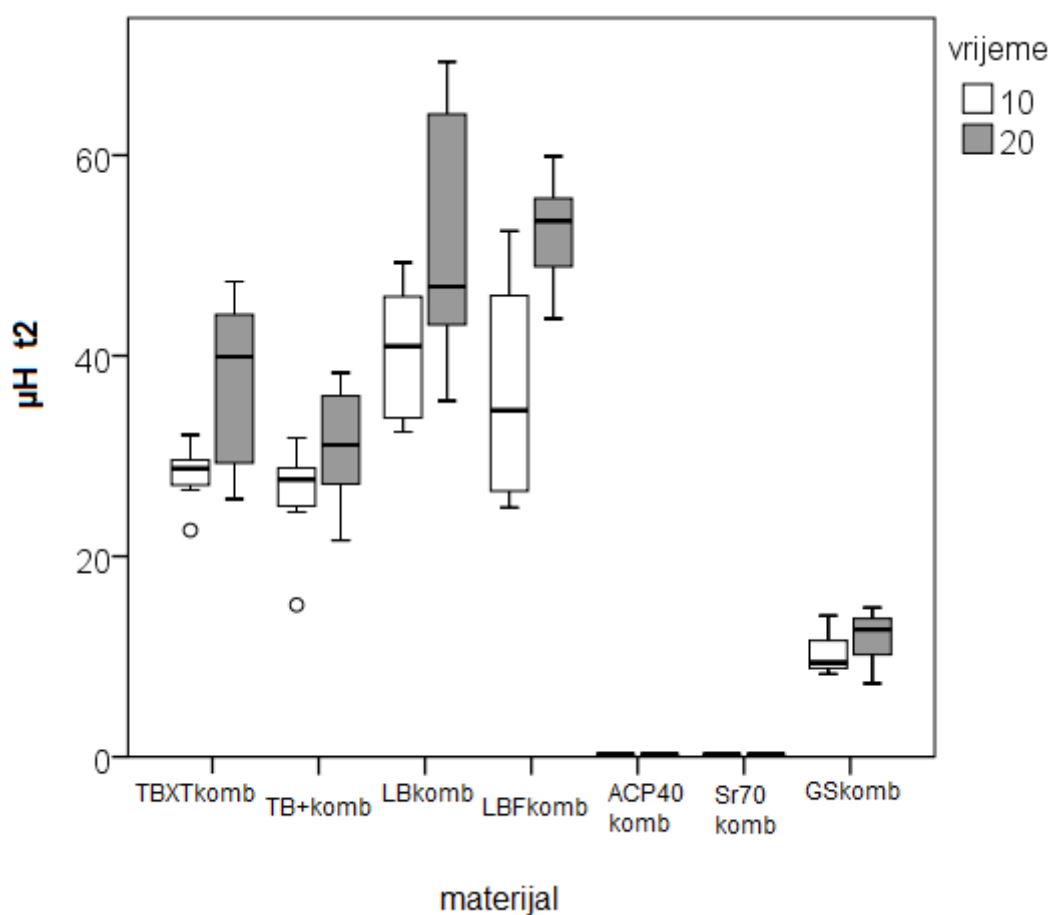
Mann-Whitneyjev test ukazao je na razlike u μH između kombinacija osvjetljavanih 10 i 20 sekundi prije uranjanja u umjetnu slinu. Razlike su kod TBXT komb, TB+ komb i GS komb bile minimalne, dok su LB komb, LBF komb, ACP40 komb te Sr70 komb imali značajno veću μH nakon dužeg osvjetljavanja, uz veliku i vrlo veliku veličinu učinka (slika 21; $r=0,592-0,828$; $p\leq 0,008$)



°outlier

Slika 21. Razdioba mikrotvrdoće (μH) prije uranjanja, unutar istoga materijala, između osvjetljavanja od 10 i 20 sekundi.

Mann-Whitneyjev test ukazao je na razlike između kombinacija osvjetljavanih 10 i 20 sekundi poslije uranjanja u umjetnu slinu. TBXT komb, LB komb i LBF komb osvjetljavani 20 sekundi pokazali su značajno veće vrijednosti μH , uz umjerenu do veliku veličinu učinka (slika 22; $r=-0,439$ do $-0,701$; $p\leq 0,049$). Ista je tendencija bila prisutna i kod TB+ komb i GS komb, ali uz neznatne razlike. ACP40 komb i Sr70 komb su nakon uranjanja pokazali vrlo malu μH , 0,26 i manju, koja se nije mogla izmjeriti.



°outlier

Slika 22. Razdioba mikrotvrdoće (μH) poslije uranjanja, unutar istoga materijala, između osvjetljavanja od 10 i 20 sekundi.

Kruskal-Wallisov test pokazao je značajne razlike u μH prije uranjanja između kombinacija osvjetljavanih 10 sekundi ($p < 0,001$). Mann-Whitneyjevi post hoc testovi ukazali su na razlike između materijala pri Bonferronijevoj korekciji p vrijednosti od $p < 0,0024$. Tvrdća se povećavala sljedećim redoslijedom ACP40 komb < Sr70 komb < GS komb < LBF komb < TBXT komb < LB komb < TB+ komb. ACP40 komb je imala značajno manju mikrotvrdoću od svih ostalih uz vrlo velike veličine učinka ($r = 0,845$; $p > 0,001$), Sr70 komb također znatno nižu od ostalih ($r = 0,845$; $p < 0,001$), a veću jedino od ACP40 komb ($r = 0,845$; $p < 0,001$). TB+ komb je imala znatno veću mikrotvrdoću od svih osim LB komb i LBF komb, uz vrlo veliku veličinu učinka ($r = 0,854$; $p < 0,001$).

Temeljem Kruskal-Wallisovog testa, razlike u μH prije uranjanja između kombinacija osvjetljavanih 20 sekundi bile su značajne ($p < 0,001$). Mann-Whitneyjevi post hoc testovi ukazali su na razlike između materijala pri Bonferronijevoj korekciji p vrijednosti od $p < 0,0024$. Tvrdća se povećavala sljedećim redoslijedom ACP40komb < Sr70komb < GSkomb < TBXTkomb < TB+komb < LBFkomb < LBkomb. ACP40komb i Sr70komb imali su značajno manju mikrotvrdoću od svih ostalih uz vrlo veliku veličina učinka ($r = 0,845$; $p < 0,001$). LB komb, LBF komb i TB+ komb imale su veću mikrotvrdoću od ostalih kombinacija uz vrlo velike veličine učinka ($r = 0,727-0,845$; $p < 0,001$), a međusobno se nisu značajno razlikovale. Razlika između TBXT komb i GS komb nije bila značajna.

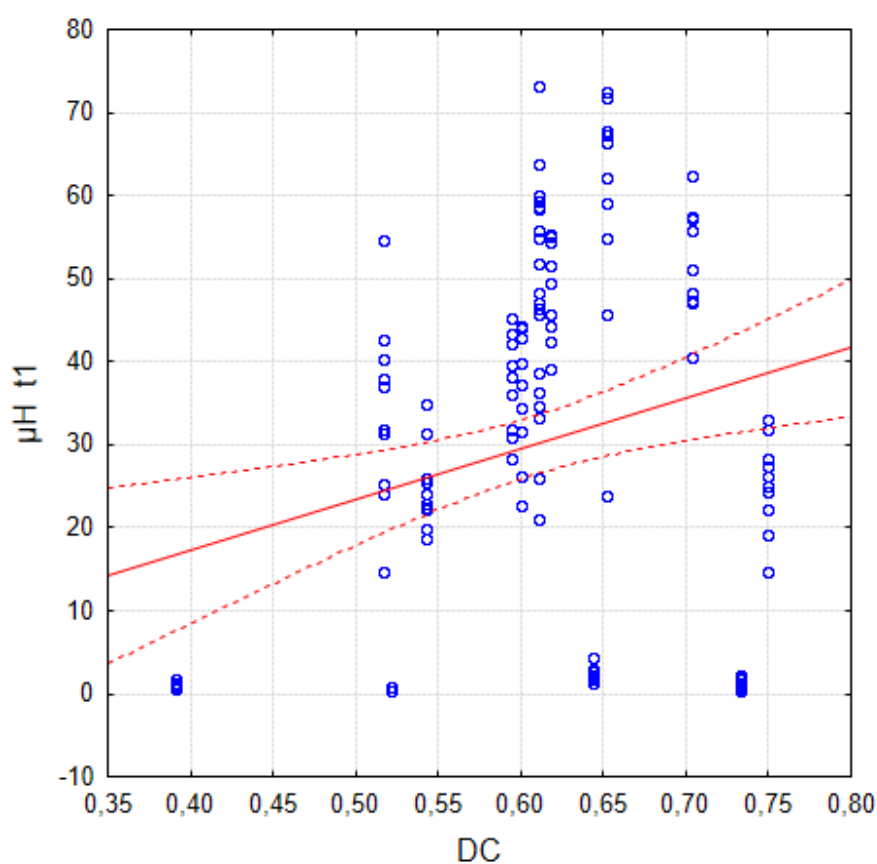
Između kompozita osvjetljavanih 10 sekundi, Kruskal-Wallisov test pokazao je značajne razlike u μH poslije uranjanja ($p < 0,001$). Mann-Whitneyjevi post hoc testovi ukazali su na razlike između materijala pri Bonferronijevoj korekciji p vrijednosti od $p < 0,0024$. Mikrotvrdoća se povećavala sljedećim redoslijedom ACP40 komb=Sr70 komb < GS komb < TB+ komb < TBXT komb < LBF komb < LB komb. ACP40 komb i Sr70 komb imale su značajno manju mikrotvrdoću od svih ostalih ($r = 0,845$; $p < 0,001$). LB je pokazala veću od ostalih kombinacija, osim LBFkomb. GS komb imala je značajno manju mikrotvrdoću od LB komb, LBF komb, TB+ komb i TBXT komb. Razlika između TBXT komb, TB+ komb i LBF komb nije bila značajna. Veličina učinka za sve navedene razlike bila je vrlo velika ($r = 0,845$; $p < 0,001$).

Kruskal-Wallisov test pokazao je značajne razlike u μH poslije uranjanja između kompozita osvjetljavanih 10 sekundi ($p < 0,001$). Mann-Whitneyjevi post hoc testovi ukazali su na razlike između materijala pri Bonferronijevoj korekciji p vrijednosti od $p < 0,0024$. μH se povećavala sljedećim redoslijedom ACP40 komb= Sr70 komb < GS

komb < TB+ komb< TBXT komb< LB komb< LBF komb. ACP40 komb i Sr70 komb imale su značajno manju μH od svih ostalih, uz vrlo veliku veličinu učinka ($r=0,845$; $p<0,001$). LBF komb je imala znatno veću od svih kombinacija, uz vrlo velike veličine učinka ($r=0,761-0,845$; $p<0,001$), osim LB komb.

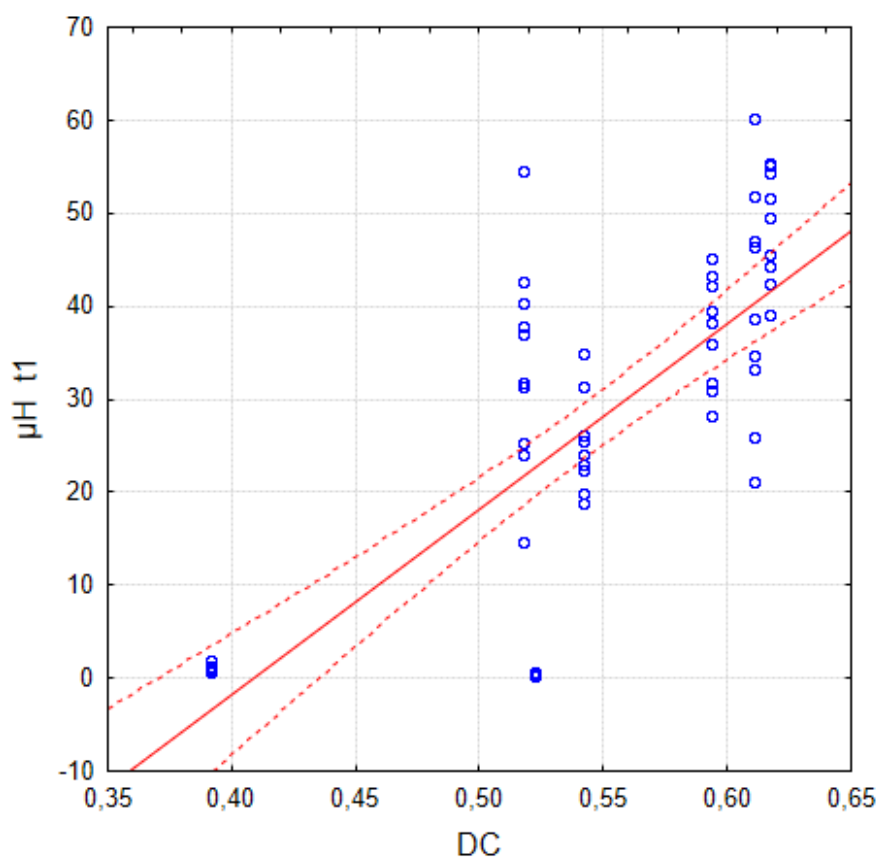
4.3. Korelacije stupnja konverzije i mikrotvrdoće kombinacija kompozita i adheziva

Za sve kombinacije kompozita i adheziva, korelacija μH s prosječnim DC-em kombinacije prije uranjanja bila je pozitivna, linearna, ali slaba (slika 23; $r=0,254$; $p=0,002$). Prema regresijskoj jednadžbi ($\mu H_{t1} = -7,099 + 60,871 \cdot DC$) porastom DC-a za jednu skalarnu jedinicu μH će porasti za 60,87 ako nije važno osvjetljava li se 10 ili 20 sekundi.



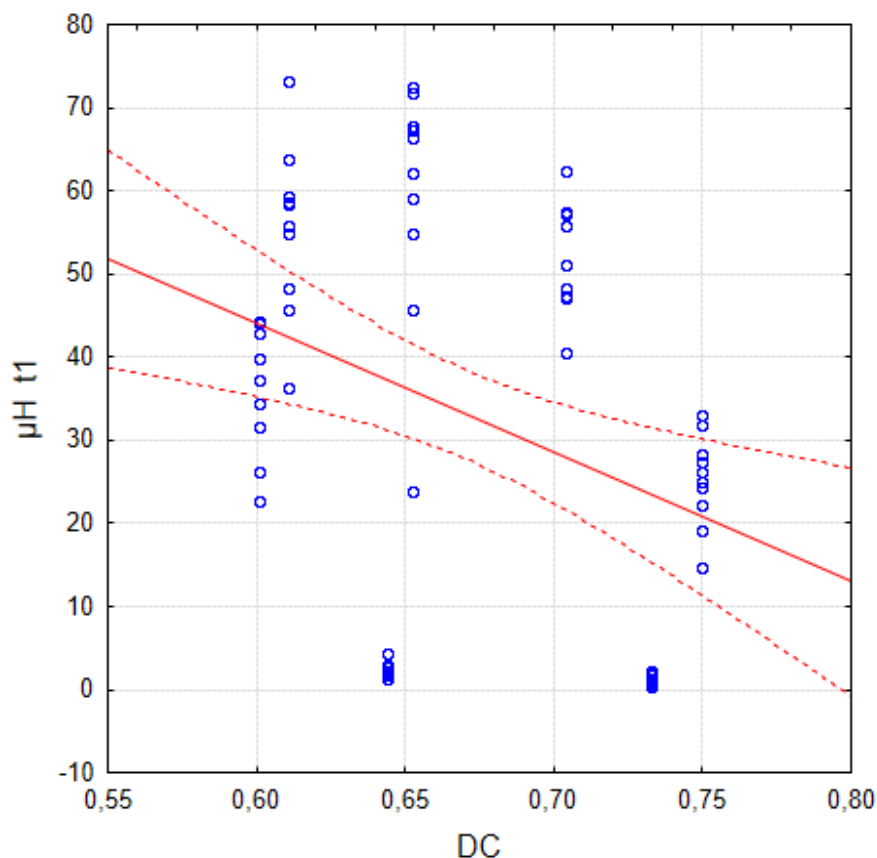
Slika 23. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) prije uranjanja za kombinacije u oba vremena osvjetljavanja.

Za kombinacije kompozita i adheziva osvjetljavane 10 sekundi, korelacija s prosječnim DC-em kombinacije bila je pozitivna, linearna, i vrlo jaka (slika 24; $r=0,762$; $p<0,001$). Prema regresijskoj jednadžbi ($\mu H_{t1} = -81,24 + 198,82 \cdot DC$), porastom DC-a za jednu skalarnu jedinicu, μH prije uranjanja će rasti za 198,82 prilikom osvjetljavanja u trajanju od 10 sekundi.



Slika 24. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) prije uranjanja za kombinacije osvjetljavane 10 sekundi.

Za kombinacije kompozita i adheziva osvjetljavane 20 sekundi, korelacija s prosječnim DC-em kombinacije bila je negativna, linearna i umjerena (slika 25; $r = -0,356$; $p = 0,002$). Prema regresijskoj jednadžbi ($\mu H_{11} = 137,44 - 155,6 * DC$), porastom DC-a za jednu skalarnu jedinicu, μH prije uranjanja će se smanjiti za 155,6 kod kombinacija osvjetljivanih 20 sekundi.

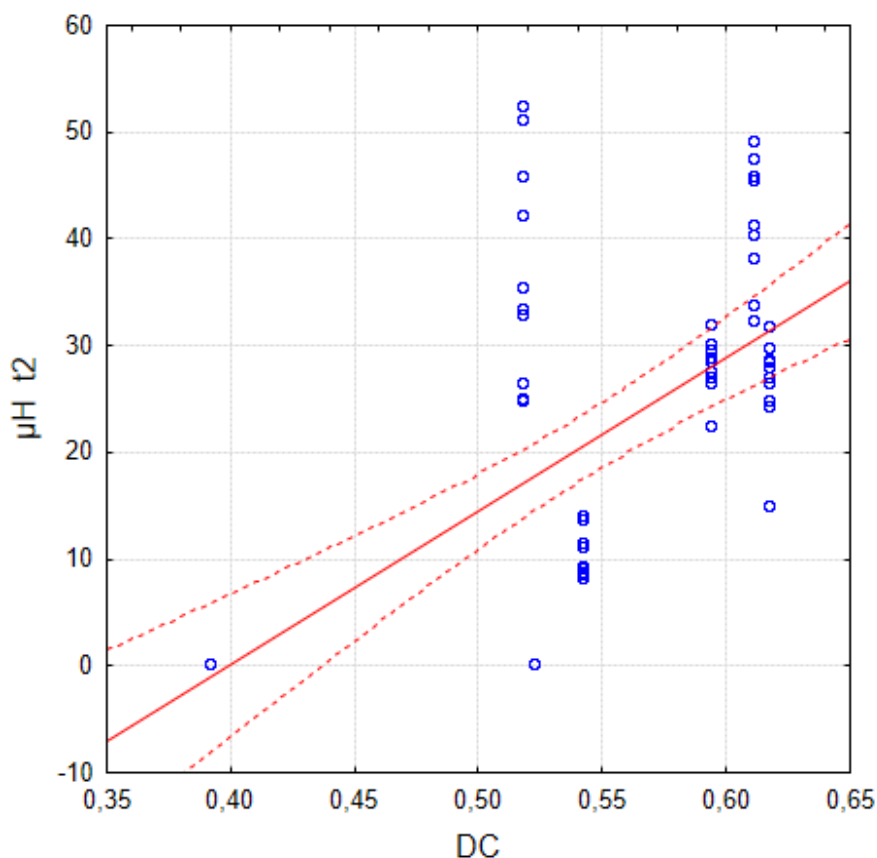


Slika 25. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) prije uranjanja za kombinacije osvjetljavane 20 sekundi.

Korelacija DC-a i μH prije uranjanja za kombinacije osvjetljavane 10 sekundi bila je značajno veća od korelacije prije uranjanja za kombinacije osvjetljavane 20 sekundi ($p < 0,001$).

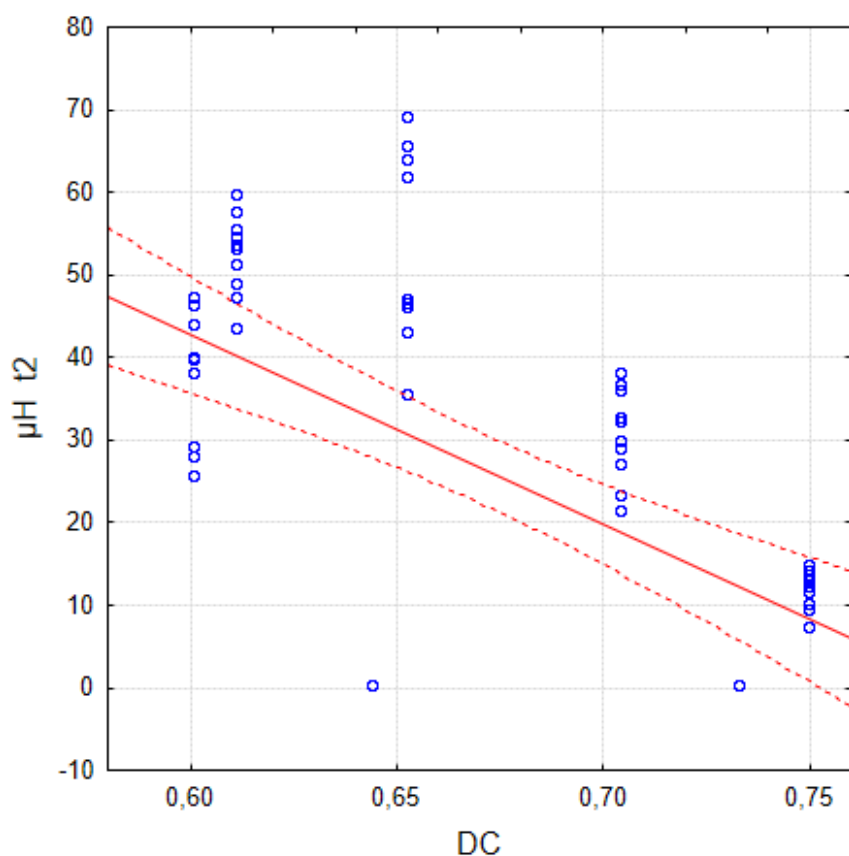
Za sve kombinacije kompozita i adheziva, korelacija s prosječnim DC kombinacije nakon uranjanja nije bila značajna ($r=0,131$; $p=0,124$).

Za kombinacije kompozita i adheziva osvjetljavane 10 sekundi, korelacija s prosječnim DC-em kombinacije bila je linearna, pozitivna i velika (slika 26; $r=0,639$; $p<0,001$). Prema regresijskoj jednadžbi ($\mu H_{t2} = -57,49 + 143,88 \cdot DC$), porastom DC-a za jednu skalarnu jedinicu, μH poslije uranjanja će rasti za 143,88 za kombinacije osvjetljavane 10 sekundi.



Slika 26. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) poslije uranjanja za kombinacije osvjetljavane 10 sekundi.

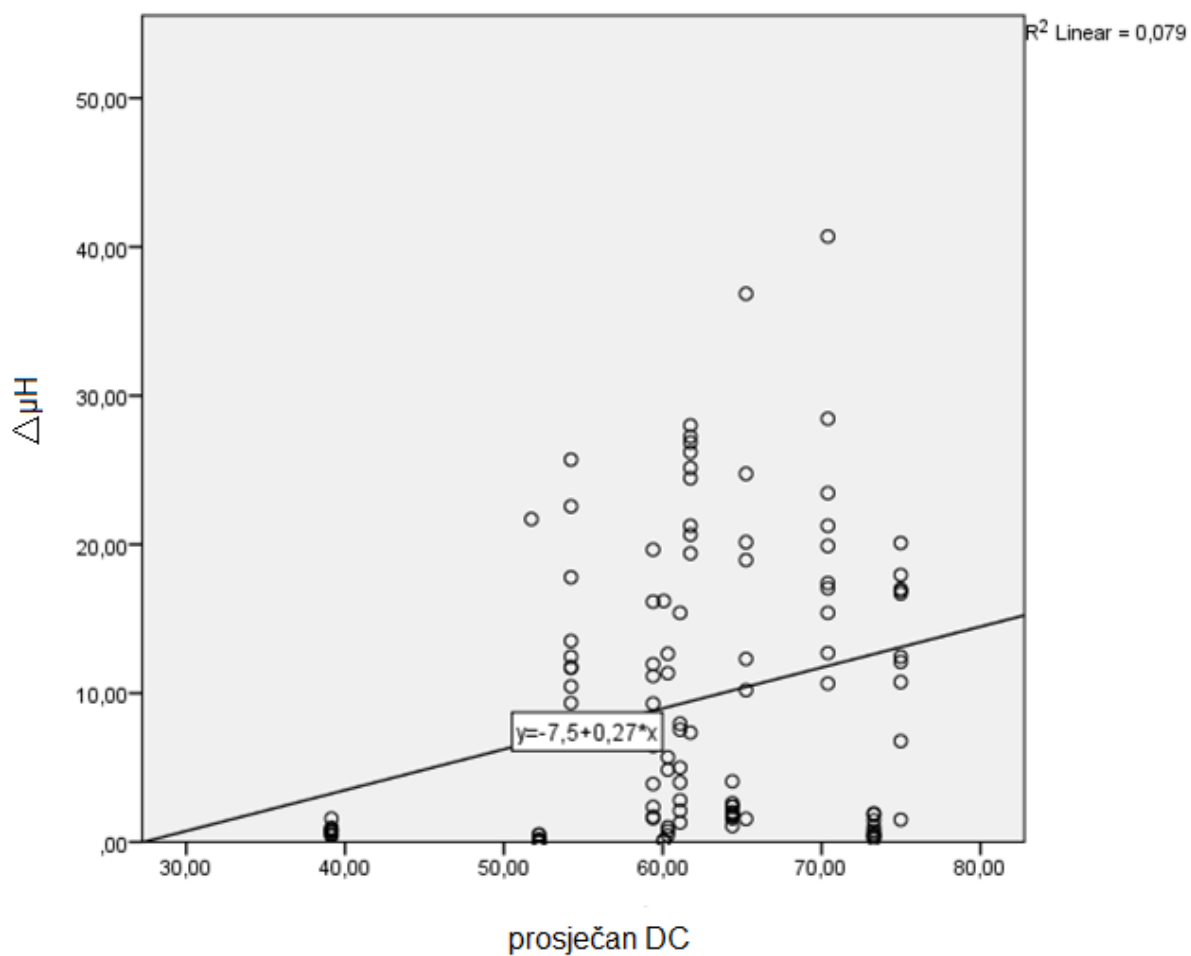
Za kombinacije kompozita i adheziva osvjetljavane 20 sekundi, korelacija s prosječnim DC-em kombinacije bila je linearna, negativna i jaka (slika 27; $r=-0,576$; $p<0,001$). Prema regresijskoj jednadžbi ($\mu H_{12} = 180,78 - 230,0 * DC$), porastom DC-a za jednu skalarnu jedinicu, μH poslije uranjanja će se smanjivati za 230 za kombinacije osvjetljavane 20 sekundi.



Slika 27. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) poslije uranjanja za kombinacije osvjetljavane 20 sekundi.

Korelacija DC-a i μH poslije uranjanja za kombinacije osvjetljavane 10 sekundi bila je značajno veća od korelacije poslije uranjanja za kombinacije osvjetljavane 20 sekundi ($p<0,001$).

Prosječni DC je slabo linearno pozitivno korelirao s promjenom mikrotvrdoće ($\Delta\mu H$; $r=0,261$; $p=0,002$; slika 28). Porastom DC-a za jednu skalarnu jedinicu, promjena μH će rasti za 0,27.



Slika 28. Korelacija prosječnog stupnja konverzije (DC) s promjenom mikrotvrdoće (μH).

4.4. Citotoksični i genotoksični učinci kompozita, adheziva i njihovih kombinacija *in vitro*

4.4.1. Citotoksičnost kompozita, adheziva i njihovih kombinacija

Pozitivna kontrola i ispitivani materijali pokazali su vrlo slične rezultate indeksa diobe jezgara kao negativna kontrola (tablica 11). Tretman nije doveo do značajnih zastoja u replikaciji limfocita.

Tablica 11. Indeks diobe jezgara za pozitivnu i negativnu kontrolu te sve ispitivane materijale obzirom na vrijeme osvjetljavanja

tretman	CBPI	
PK	1,25	
NK	1,69	
vrijeme	10 s	20 s
TBXT	1,56	1,68
TB+	1,35	1,36
LB	1,69	1,77
LBF	1,81	1,81
ACP	1,56	1,44
Sr70	1,64	1,61
GS	1,70	1,72
TBXT bond	1,66	1,73
LB bond	1,76	1,57
LBF bond	1,73	1,72
Tenure	1,66	1,67
TBXT komb	1,64	1,67
TB+ komb	1,48	1,47
LB komb	1,74	1,80
LBF komb	1,79	1,69
ACP komb	1,59	1,70
Sr70 komb	1,69	1,70
GS komb	1,74	1,69
Traka	1,67	1,72

CBPI, indeks diobe jezgara; NK, negativna kontrola; PK, pozitivna kontrola etilmetanosulfonat u konačnoj koncentraciji 10 µg/mL kulture

Hi-kvadrat test pokazao je značajan porast broja binuklearnih stanica s mikronukleusom (BN s MN) kod pozitivne kontrole u odnosu na negativnu kontrolu (tablica 12; $p < 0,001$). Time je utvrđeno da je test valjan.

Tablica 12. Rezultati citohalazinom B blokiranog mikronukleus testa za pozitivnu i negativnu kontrolu

	f (BN s MN)**	% udio** (BN s MN)
PK	35	1,75
NK	8	0,4
p*	<0,001	

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; PK, pozitivna kontrola; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Hi-kvadrat test

**na 2000 binuklearnih stanica

4.4.2. Razlike u rezultatima citohalazinom B blokiranog mikronukleus testa obzirom na vrijeme osvjetljavanja

Generalno, materijali osvjetljavani 20 sekundi pokazali su veći broj BN s MN, binuklearnih stanica s jezgrinim pupom (BN s NB) i binuklearnih stanica s nukleoplazmatskim mostom (BN s NPB) nego materijali osvjetljavani 10 sekundi, ali razlike nisu bile značajne (tablica 13).

Tablica 13. Broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom ili nukleoplazmatskim mostom na 2000 pregledanih binuklearnih stanica po materijalu

	10 s**	20 s	p*
f (BN s MN)	138	155	
% udio (BN s MN)**	0,38	0,43	0,319
f (BN s NB)	319	320	
% udio (BN s NB)**	0,89	0,89	0,968
f (BN s NPB)	2	6	
% udio (BN s NPB)**	0,01	0,01	0,683

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; BN s NPB binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom; p, razina statističke značajnosti

*Hi-kvadrat test s Yatesovom korekcijom za $N < 5$

**ukupno pregledano 36000 binuklearnih stanica po vremenu osvjetljavanja

Kompoziti osvjetljavani 10 sekundi pokazali su veći broj BN s MN, BN s NB i BN s NPB nego materijali osvjetljavani 20 sekundi, ali razlike nisu bile značajne (tablica 14).

Tablica 14. Broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom, odnosno nukleoplazmatskim mostom na 2000 pregledanih binuklearnih stanica po kompozitu

	10 s**	20 s	p*
f (BN s MN)	59	50	
% udio (BN s MN)**	0,42	0,36	0,388
f (BN s NB)	123	111	
% udio (BN s NB)**	0,88	0,79	0,431
f (BN s NPB)	2	0	
% udio (BN s NPB)**	0,01	0,00	0,500

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; BN s NPB binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom; p, razina statističke značajnosti

*Fisherov test

**ukupno pregledano 14000 binuklearnih stanica po vremenu osvjetljavanja

Adhezivi osvjetljavani 20 sekundi pokazali su veći broj BN s MN i BN s NB nego oni osvjetljavani 10 sekundi, ali razlike nisu bile značajne. Kod adheziva nije bilo binuklearnih limfocita s nukleoplazmatskim mostom (tablica 15).

Tablica 15. Broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom, odnosno nukleoplazmatskim mostom na 2000 pregledanih binuklearnih stanica po adhezivu

	10 s**	20 s	p*
f (BN s MN)	30	38	
% udio (BN s MN)**	0,38	0,48	0,331
f (BN s NB)	59	75	
% udio (BN s NB)**	0,74	0,94	0,165
f (BN s NPB)	0	0	
% udio (BN s NPB)**	0,00	0,00	1,000

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; BN s NPB binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom; p, razina statističke značajnosti

*Fisherov test

**ukupno pregledano 8000 binuklearnih stanica po vremenu osvjetljavanja

Kombinacije adheziva i kompozita osvjetljavane 10 sekundi pokazale su manji broj BN s MN i BN s NPB, a više BN s NB od kombinacija osvjetljivanih 20 sekundi. Razlike nisu bile značajne (tablica 16).

Tablica 16. Broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom, odnosno nukleoplazmatskim mostom na 2000 pregledanih binuklearnih stanica po kombinaciji kompozita i adheziva

	10 s**	20 s	p*
f (BN s MN)*	49	67	
% udio (BN s MN)**	0,35	0,48	0,094
f (BN s NB)	137	134	
% udio (BN s NB)**	0,98	0,96	0,855
f (BN s NPB)	0	4	
% udio (BN s NPB)**	0,00	0,03	0,453

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; BN s NPB binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom; p, razina statističke značajnosti

*Fisherov test

**ukupno pregledano 14000 binuklearnih stanica po vremenu osvjetljavanja

Gledajući svaki materijal zasebno, nije bilo značajnih razlika u broju BN s MN obzirom na vrijeme osvjetljavanja (tablica 17).

Tablica 17. Deskriptivna statistika za broj binuklearnih stanica s mikronukleusom kod svih materijala nakon 10 i 20 sekundi osvjetljavanja

	f (BN s NB)**	% udio** (BN s NB)	f (BN s NB)**	% udio** (BN s NB)	p*
vrijeme	10 s		20 s		
TBXT	10	0,50	6	0,30	0,316
TB+	14	0,70	14	0,70	1,000
LB	4	0,20	3	0,15	1,000
LBF	1	0,05	5	0,25	0,220
GS	4	0,20	6	0,30	0,752
ACP40	12	0,60	7	0,35	0,250
Sr70	14	0,70	9	0,45	0,296
TBXT bond	9	0,45	16	0,80	0,160
LB bond	5	0,25	13	0,65	0,059
LBF bond	5	0,25	5	0,25	1,000
Tenure	11	0,55	4	0,20	0,121
Traka	4	0,20	5	0,25	1,000
TBXT komb	6	0,30	12	0,60	0,156
TB+komb	14	0,70	10	0,50	0,413
LB komb	10	0,50	13	0,65	0,530
LBF komb	6	0,30	7	0,35	0,781
GS komb	5	0,25	6	0,30	0,763
ACP40 komb	7	0,35	9	0,45	0,616
Sr70 komb	1	0,05	10	0,50	0,016

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; p, razina statističke značajnosti

*Hi-kvadrat test uz Yatesovu korekciju za N<5

**na 2000 binuklearnih stanica

Tablica 18. Deskriptivna statistika za broj binuklearnih stanica s pupom kod svih materijala nakon 10 i 20 sekundi osvjetljavanja uz naznačene značajne razlike

	f (BN s NB)**	% udio** (BN s NB)	f (BN s NB)**	% udio** (BN s NB)	p*
vrijeme	10 s		20 s		
TBXT	11	0,55	13	0,65	0,682
TB+	32	1,60	15	0,75	0,013***
LB	22	1,10	22	1,10	1,000
LBF	8	0,40	17	0,85	0,071
GS	13	0,65	9	0,45	0,392
ACP40	17	0,85	18	0,90	0,865
Sr70	20	1,00	17	0,85	0,620
TBXT bond	8	0,4	27	1,35	0,001***
LB bond	16	0,8	22	1,10	0,328
LBF bond	16	0,8	14	0,70	0,714
Tenure	19	0,95	12	0,60	0,207
Traka	18	0,90	4	0,20	0,005***
TBXT komb	22	1,10	21	1,05	0,878
TB+komb	27	1,35	9	0,45	0,003***
LB komb	16	0,80	24	1,20	0,204
LBF komb	10	0,50	17	0,85	0,176
GS komb	11	0,55	11	0,55	1,000
ACP40 komb	37	1,85	28	1,40	0,260
Sr70 komb	14	0,70	24	1,20	0,103

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; p, razina statističke značajnosti

*Hi-kvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N < 5$

**na 2000 binuklearnih stanica

***značajna razlika pri $p < 0,05$

Kompozit TB+ pokazao je značajno više BN s NB prilikom 10 sekundi, nego nakon 20 sekundi osvjetljavanja (tablica 18; $p = 0,013$). Kod tekućeg adheziva TBXT bond, prilikom 20 sekundi osvjetljavanja, značajno je više BN s NB u odnosu na 10

sekundi osvjetljavanja ($p=0,001$). Kod negativne kontrole „Traka“ značajno manje BN s NB prilikom 20 sekundi osvjetljavanja u odnosu na 10 sekundi osvjetljavanja ($p=0,005$). Kod adhezivnog je sustava TB+ komb značajno više BN s NB prilikom 10 sekundi osvjetljavanja, nego prilikom 20 sekundi osvjetljavanja ($p=0,003$).

Tablica 19. Deskriptivna statistika za binuklearne stanice s nukleoplazmatskim mostom kod svih materijala nakon 10 i 20 sekundi osvjetljavanja

	f (BN s NPB)**	% udio** (BN s NPB)	f (BN s NPB)**	% udio** (BN s NPB)	p*
vrijeme	10 s		20 s		
TBXT	0	0,00	0	0,00	1,000
TB+	1	0,05	0	0,00	1,000
LB	1	0,05	0	0,00	1,000
LBF	0	0,00	0	0,00	1,000
GS	0	0,00	0	0,00	1,000
ACP40	0	0,00	0	0,00	1,000
Sr70	0	0,00	0	0,00	1,000
TBXT bond	0	0,00	0	0,00	1,000
LB bond	0	0,00	0	0,00	1,000
LBF bond	0	0,00	0	0,00	1,000
Tenure	0	0,00	0	0,00	1,000
Traka	0	0,00	0	0,00	1,000
TBXT komb	0	0,00	2	0,10	0,500
TB+komb	0	0,00	1	0,05	1,000
LB komb	0	0,00	0	0,00	1,000
LBF komb	0	0,00	0	0,00	1,000
GS komb	0	0,00	0	0,00	1,000
ACP40 komb	0	0,00	0	0,00	1,000
Sr70 komb	0	0,00	0	0,00	1,000

f, frekvencija; BN s NPB binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom; p, razina statističke značajnosti

*Fisherov test

**na 2000 binuklearnih stanica

Nakon 10 sekundi osvjetljavanja, po jedan BN s NPB javio se samo u kulturama tretiranim TB+ i LB, a nakon 20 sekundi osvjetljavanja BN s NPB javili su se kod TBXT

komb i LB komb (tablica 19). Razlike nisu bile značajne. Daljnje analize BN s NPB nisu učinjene.

4.4.3. Razlike u rezultatima citohalazinom B blokiranog mikronukleus testa obzirom na vrstu materijala

Nakon 10 sekundi osvjetljavanja, TB+ i Sr70 su pokazali najveću frekvenciju BN s MN, ujedno i značajno veću od LBF, ali uz malu veličinu učinka (tablica 20; Cramerov $V=0,045$; $p<0,001$). Između ostalih kompozita nije bilo značajnih razlika te se niti jedan nije značajno razlikovao od negativne kontrole. TB+ je pokazao značajno veću frekvenciju BN s NB od negativne kontrole, LBF i TBXT, uz male veličine učinka (Cramerov $V=0,047-0,067$; $p\leq 0,001$).

Tablica 20. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom uz naznačene razlike između kompozita osvjetljivanih 10 s

		% udio**		
	f (BN s MN)**	(BN s MN)	f (BN s NB)**	(BN s NB)
TBXT	10	0,50 ^{abc}	11	0,55 ^{*a}
TB+	14	0,70 ^c	32	1,60 ^b
LB	4	0,20 ^{abc}	22	1,10 ^{ab}
LBF	1	0,05 ^b	8	0,40 ^a
GS	4	0,20 ^{abc}	13	0,65 ^{ab}
ACP 40	12	0,60 ^{abc}	17	0,85 ^{ab}
Sr 70	14	0,70 ^{ac}	20	1,00 ^{ab}
NK	8	0,40 ^{abc}	6	0,30 ^a
p*		0,004		<0,001
Cramerov V		0,036		0,045

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N<5$ s post hoc testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno.

**na 2000 binuklearnih stanica

Nakon 20 sekundi osvjetljavanja, ponovno je najveći broj BN s MN pokazao TB+, dok je najmanji broj bio prisutan kod LB (tablica 21). Međutim, razlike između kompozita nisu bile značajne, a ujedno se niti jedan nije znatno razlikovao od negativne kontrole.

Tablica 21. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom kod kompozita osvjetljivanih 20 sekundi

	% udio**		%udio**	
	f (BN s MN)**	(BN s MN)	f (BN s NB)**	(BN s NB)
TBXT	6	0,30*	13	0,65
TB+	14	0,70	15	0,75
LB	3	0,15	22	1,10
LBF	5	0,25	17	0,85
GS	6	0,30	9	0,45
ACP40	7	0,35	18	0,90
Sr70	9	0,45	17	0,85
NK	8	0,40	6	0,30
p*		0,164		0,077
Cramerov V		0,026		0,028

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N < 5$

**na 2000 binuklearnih stanica

Frekvencije BN s MN nisu se razlikovale međusobno, ni od kontrole Traka, ni od negativne kontrole za adhezive nakon 10 sekundi osvjetljavanja (tablica 22). Između adheziva i kontrola nije bilo razlika ni u broju BN s NB.

Tablica 22. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom kod adheziva osvjetljivanih 10 sekundi

	f (BN s MN)**	% udio**		f (BN s NB)	% udio** (BN s NB)
		(BN s MN)			
TBXT bond	9	0,45		8	0,40*
LB bond	5	0,25		16	0,80
LBF bond	5	0,25		16	0,80
Tenure	11	0,55		19	0,95
Traka	4	0,20		18	0,90
NK	8	0,40		6	0,30
p*		0,364			0,055
Cramerov V		0,021			0,030

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N < 5$

**na 2000 binuklearnih stanica

Nakon 20 sekundi osvjetljavanja, razlike u broju BN s MN između materijala i kontrola bile su značajne, ali uz vrlo malu veličinu učinka, zbog čega post hoc test nije detektirao značajne razlike (tablica 23). U broju BN s NB, TBXT bond i LB bond pokazali su značajno veći rezultat od negativne kontrole (Cramerov $V=0,058$, odnosno $0,048$; $p \leq 0,004$) i od kontrole Traka (Cramerov $V=0,042$, odnosno $0,030$; $p < 0,001$), uz male veličine učinka.

Tablica 23. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom uz naznačene razlike između adheziva osvjetljivanih 20 sekundi

	f (BN s MN)**	% udio**	f (BN s NB)**	% udio**
		(BN s MN)		(BN s NB)
TBXT bond	16	0,80 ^{*a}	27	1,35 ^{*a}
LB bond	13	0,65 ^a	22	1,10 ^a
LBF bond	5	0,25 ^a	14	0,70 ^{ab}
Tenure	4	0,20 ^a	12	0,60 ^{ab}
Traka	5	0,25 ^a	4	0,20 ^b
NK	8	0,40 ^a	6	0,30 ^b
p*		0,014		<0,001
Cramerov V		0,035		0,049

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N < 5$ s post hoc testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno.

**na 2000 binuklearnih stanica

Nakon 10 sekundi osvjetljavanja, u frekvenciji BN s MN, TB+ komb je pokazala značajno viši rezultat od Sr70 komb uz malu veličinu učinka (tablica 24; Cramerov $V=0,030$; $p<0,001$), ali se nije značajno razlikovala od NK, kao ni ostale kombinacije kompozita i adheziva.

U frekvenciji BN s NB, jedino su se ACP40 komb i TB+ komb značajno razlikovale od negativne kontrole (Cramerov $V=0,075$; $p<0,001$), a ACP40 komb je ujedno imala viši rezultat od LBF komb, GS komb i Sr70 komb, ali uz male veličine učinka (Cramerov $V=0,051-0,063$; $p\leq 0,001$).

Tablica 24. Razdioba frekvencija binukelarnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom uz naznačene razlike između kombinacija kompozita i adheziva osvjetljivanih 10 sekundi

	% udio**		% udio**	
	f (BN s MN)**	(BN s MN)	f (BN s NB)**	(BN s NB)
TBXT komb	6	0,30 ^{ab}	22	1,10 ^{*abcde}
TB+ komb	14	0,70 ^b	27	1,35 ^{bce}
LB komb	10	0,50 ^{ab}	16	0,80 ^{abcde}
LBF komb	6	0,30 ^{ab}	10	0,50 ^{de}
GS komb	5	0,25 ^{ab}	11	0,55 ^{abde}
ACP40 komb	7	0,35 ^{ab}	37	1,85 ^c
Sr70 komb	1	0,05 ^a	14	0,70 ^{abde}
NK	8	0,40 ^{ab}	6	0,30 ^{ad}
p*		0,048		<0,001
Cramerov V		0,030		0,051

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N\leq 5$ s post hoc testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno.

**na 2000 binuklearnih stanica

Nije bilo značajnih razlika između kombinacija kompozita i adheziva osvjetljavanih 20 sekundi u broju BN s MN, kao ni značajnih razlika između kombinacija i NK (tablica 25). ACP40 komb, LB komb i Sr70 komb pokazale su značajno veću frekvenciju BN s NB od negativne kontrole, uz malu veličinu učinka (Cramerov $V=0,060$, odnosno, $0,052$; $p \leq 0,001$). Ujedno je TB+ komb pokazala znatno manje BN s NB od ACP komb.

Tablica 25. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom uz naznačene razlike između kombinacija kompozita i adheziva osvjetljavanih 20 sekundi

	% udio**		% udio**	
	f (BN s MN)**	(BN s MN)	f (BN s NB)**	(BN s NB)
TBXTkomb	12	0,60 ^a	21	1,05 ^{abcd}
TB+komb	10	0,50 ^a	9	0,45 ^{cd}
LBkomb	13	0,65 ^a	24	1,20 ^{bd}
LBFkomb	7	0,35 ^a	17	0,85 ^{abcd}
GSkomb	6	0,30 ^a	11	0,55 ^{abcd}
ACP40komb	9	0,45 ^a	28	1,40 ^b
Sr70komb	10	0,50 ^a	24	1,20 ^{bd}
NK	8	0,40 ^a	6	0,30 ^{ac}
p*		0,748		<0,001
Cramerov V		0,016		0,040

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N < 5$ s post hoc testom uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe. Vrijednosti koje dijele ista slova u eksponentu ne razlikuju se statistički značajno.

**na 2000 binuklearnih stanica

Hi-kvadrat test je pokazao značajno više BN s MN kod Sr70 u odnosu na Sr70 komb nakon 10 sekundi osvjetljavanja te značajno više BN s NB kod ACP40 komb u odnosu na sami kompozit (tablica 26).

Tablica 26. Razlike u frekvenciji binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom između kompozita i kombinacije istog kompozita s odgovarajućim adhezivom pri 10 sekundi osvjetljavanja

	f (BN s MN)**	% udio** (BN s MN)	p*	f (BN s NB)**	% udio** (BN s MN)	p*
TBXT	10	0,50*		11	0,55	
TBXT komb	6	0,30	0,316	22	1,10	0,054
TB+	14	0,70		32	1,60	
TB+ komb	14	0,70	1,000	27	1,35	0,512
LB	4	0,20		22	1,10	
LB komb	10	0,50	0,180	16	0,80	0,327
LBF	1	0,05		8	0,40	
LBF komb	6	0,30	0,130	10	0,50	0,636
GS	4	0,20		13	0,65	
GS komb	5	0,25	0,739	11	0,55	0,682
ACP40	12	0,60		17	0,85	
ACP40 komb	7	0,35	0,250	37	1,85	0,006
Sr70	14	0,70		20	1,00	
Sr70 komb	1	0,05	0,001	14	0,70	0,301

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N < 5$

**na 2000 binuklearnih stanica

Hi-kvadrat test je pokazao značajno više BN s MN kod LB komb u odnosu na LB nakon 20 sekundi osvjetljavanja. Razlike u frekvenciji BN s NB unutar parova kompozita i njegove kombinacije s adhezivom nisu bile značajne (tablica 27).

Tablica 27. Razlike u frekvenciji binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom između kompozita i kombinacije istoga kompozita s odgovarajućim adhezivom pri 20 sekundi osvjetljavanja

	f (BN s MN)**	% udio** (BN s MN)	p*	f (BN s NB)**	% udio** (BN s MN)	p*
TBXT	6	0,30		13	0,65	
TBXT komb	12	0,60	0,156	21	1,05	0,168
TB+	14	0,70		15	0,75	
TB+ komb	10	0,50	0,413	9	0,45	0,219
LB	3	0,15		22	1,10	
LB komb	13	0,65	0,024	24	1,20	0,767
LBF	5	0,25		17	0,85	
LBF komb	7	0,35	0,563	17	0,85	1,000
GS	6	0,30		9	0,45	
GS komb	6	0,30	1,000	11	0,55	0,654
ACP40	7	0,35		18	0,90	
ACP40 komb	9	0,45	0,616	28	1,40	0,138
Sr70	9	0,45		17	0,85	
Sr70 komb	10	0,45	0,818	24	1,20	0,272

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N < 5$

**na 2000 binuklearnih stanica

Kruskal-Wallisov test nije pokazao značajne razlike u broju MN kod BN s MN između kompozita, kao ni između kompozita i negativne kontrole (tablica 28).

Tablica 28. Razlike u broju mikronukleusa u stanicama s mikronukleusima između kompozita i negativne kontrole u oba vremena osvjetljavanja

	f (BN s MN)**	prosjeak (MN)	95% CI
TBXT	16	1,1	0,9-1,2
TB+	28	1,0	1,0-1,1
LB	7	1,0	-
LBF	6	1,7	0,0-3,4
GS	10	1,1	0,9-1,3
ACP40	19	1,0	-
Sr70	23	1,0	-
NK	8	1,0	-
p*		0,250	

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; MN, mikronukleus; 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Kruskal-Wallisov test

**na 2000 binuklearnih stanica

Kruskal-Wallisov test nije pokazao značajne razlike u broju MN kod BN s MN između adheziva, kao ni između kompozita i kontrole Traka, te negativne kontrole (tablica 29).

Tablica 29. Razlike u broju mikronukleusa u stanicama s mikronukleusima između adheziva i negativne kontrole u oba vremena osvjetljavanja

	f (BN s MN)**	prosjeak (MN)	95% CI
TBXT bond	25	1,08	0,97-1,19
LB bond	18	1,22	0,86-1,59
LBF bond	10	1,00	-
Tenure	15	1,07	0,92-1,21
Traka	9	1,00	-
NK	8	1,00	-
p*		0,421	

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; MN, mikronukleus; 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Kruskal-Wallisov test

**na 2000 binuklearnih stanica

Kruskal-Wallisov test nije pokazao značajne razlike u broju MN kod BN s MN između kombinacija, kao ni između kombinacija i negativne kontrole (tablica 30).

Tablica 30. Razlike u broju mikronukleusa u stanicama s mikronukleusima između kombinacija i negativne kontrole u oba vremena osvjetljavanja

	f (BN s MN)**	prosjeak (MN)	95 % CI
TBXT komb	18	1,0	-
TB+ komb	24	1,0	-
LB komb	23	1,0	0,95-1,13
LBF komb	13	1,1	0,91-1,24
GS komb	16	1,0	-
ACP40 komb	11	1,0	-
Sr70 komb	11	1,0	-
NK	8	1,0	-
p*		0,4714	

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; MN, mikronukleus; 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti; NK, negativna kontrola; p, razina statističke značajnosti

*Kruskal-Wallisov test

**na 2000 binuklearnih stanica

U oba vremena osvjetljavanja ACP40 i Sr70 se nisu razlikovali ni u broju BN s MN, ni u broju BN s NB (tablica 31).

Tablica 31. Razlike u broju binuklearnih stanica s mikronukleusima između eksperimentalnih kompozita ACP40 i Sr70

	% udio**			% udio**		
	f (BN s MN)**	(BN s MN)	p*	f (BN s NB)**	(BN s NB)	p*
vrijeme 10 s						
ACP40	12	0,006		17	0,009	
Sr70	14	0,007	0,694	20	0,010	0,620
vrijeme 20 s						
ACP40	7	0,004		18	0,009	
Sr70	9	0,005	0,616	17	0,009	0,865

f, frekvencija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; p, razina statističke značajnosti

*Hi-hvadrat test

**na 2000 binuklearnih stanica

4.4.4. Korelacije stupnja konverzije i rezultata citohalazinom B blokiranog mikronukleus testa

Porastom DC-a rasla je i frekvencija BN s MN kada se u analizu uzmu sve kombinacije kompozita i adheziva bez obzira na vrstu osvjetljavanja (tablica 32, slika 29; $r=0,548$; $p=0,042$), kao i kod kombinacija kompozita i adheziva osvjetljivanih 10 sekundi (tablica 32, slika 30; $r=0,839$; $p=0,018$). Korelacija je bila linearna, pozitivna i jaka za kombinacije bez obzira na vrstu osvjetljavanja, a vrlo jaka za osvjetljavanje 10 sekundi. Za kombinacije osvjetljivane 20 sekundi, korelacija je bila negativna, ali nije bila značajna (tablica 32; $p=0,316$)

Porastom DC-a za jednu skalarnu jedinicu proporcija binuklearnih stanica s mikronukleusima će porasti za 0,01 ako nije važno osvjetljava li se 10 ili 20 sekundi, odnosno za 0,02 ako se osvjetljava 10 sekundi. Regresijske jednadžbe su:

$BN \text{ s } MN = -0,0021 + 0,01023 * DC$, odnosno $BN \text{ s } MN = -0,0085 + 0,02216 * DC$.

Korelacija pri osvjetljavanju 10 sekundi nije bila jača nego ona kada se uzorak ne dijeli po vremenu osvjetljavanja (tablica 32; $p=0,968$).

Porastom DC-a rasla je i proporcija BN s NB, kada se u analizu uzmu sve kombinacije kompozita i adheziva bez obzira na vrstu osvjetljavanja, međutim, korelacija nije bila značajna (tablica 32; $r=0,030$; $p=0,919$). Slično kao i kod korelacija DC-a i proporcije BN s MN, porastom DC-a povećavala se i proporcija BN s NB kod kombinacija osvjetljivanih 10 sekundi, a smanjivala se kod kombinacija osvjetljivanih 20 sekundi. Međutim, korelacije DC-a i p (BN s NB) nisu bile značajne (tablica 32; $p \geq 0,410$)

Tablica 32. Pearsonove korelacije prosječnoga stupnja konverzije s proporcijom binuklearnih stanica s mikronukleusom te prosječnoga stupnja konverzije s proporcijom binuklearnih stanica s pupom

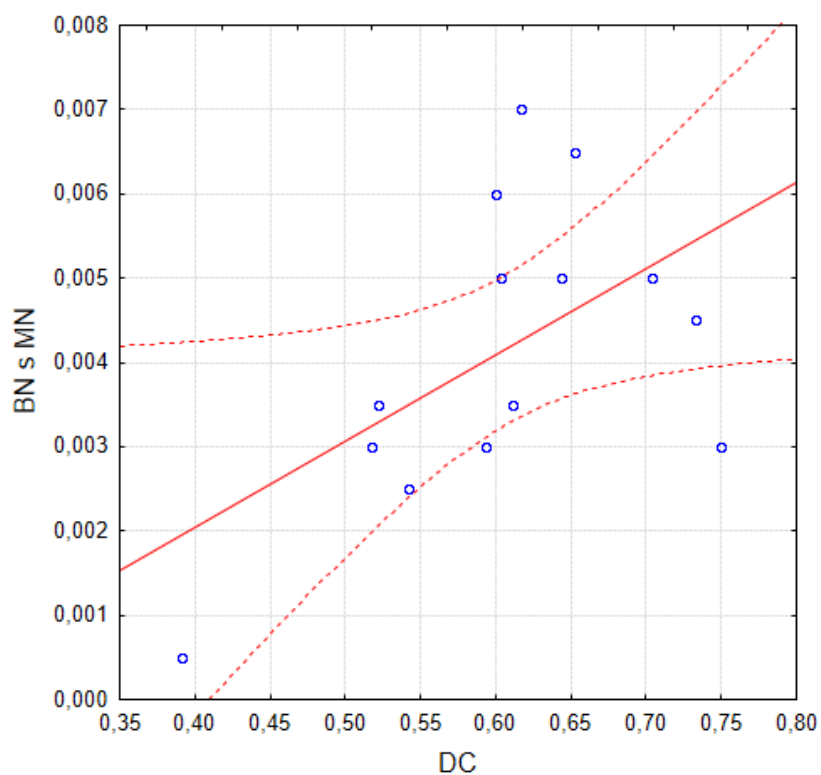
	korelacije DC i p (BN s MN)			korelacije DC i p (BN s NB)		
	N	r	p*	N	r	p
kompoziti	14	-0,407	0,149	14	-0,098	0,739
kompoziti 10s	7	-0,507	0,246	7	-0,121	0,796
kompoziti 20s	7	-0,242	0,601	7	0,152	0,745
adhezivi	8	0,105	0,805	8	0,116	0,784
adhezivi 10s	4	-0,535	0,465	4	-0,590	0,410
adhezivi 20s	4	0,406	0,594	4	0,371	0,629
kombinacije	14	0,548	0,043** a	14	0,030	0,919
kombinacije 10s	7	0,839	0,018** a	7	0,264	0,567
kombinacije 20s	7	-0,446	0,316	7	-0,260	0,567

DC, stupanj konverzije; p, proporcija; BN s MN, binuklearna stanica s mikronukleusom; BN s NB, binuklearna stanica s jezgrinim pupom; N, veličina uzorka; p, razina statističke značajnosti

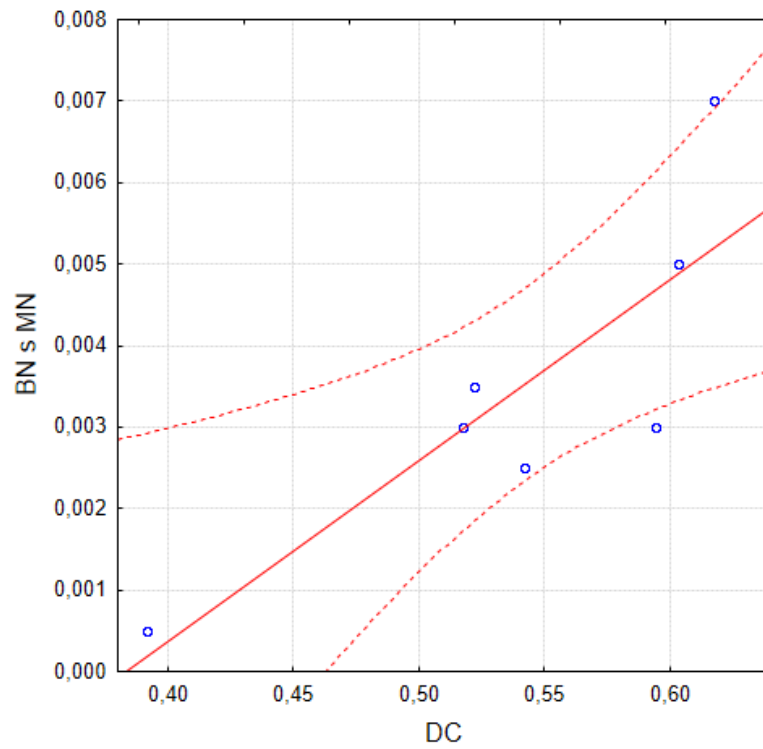
*Hi-hvadrat test uz Yatesovu korekciju za $N < 5$

**značajna korelacija

^a između korelacija za sve kombinacije i kombinacije osvijetljavane 10 sekundi nema značajne razlike ($p=0,968$)



Slika 29. Korelacija prosječnog stupnja konverzije (DC) i proporcije binuklearnih stanica s mikronukleusom (BN s MN) za sve kombinacije kompozita i adheziva.



Slika 30. Korelacija prosječnoga stupnja konverzije (DC) i proporcije binuklearnih stanica s mikronukleusom (BN s MN) za kombinacije kompozita i adheziva osvjetljavane 10 sekundi.

4.4.5. Regresijski modeli za predikciju pojave mikronukleusa i pupova

U logističku regresiju uključeni su ispitivani ortodontski materijali te je ona rađena na osnovi ukupno pregledane 72 000 stanica. Nije bilo značajnih odrednica pojave BN s MN (tablica 33). Jedina značajna odrednica prisustva BN s NB bio je bioaktivni ACP koji povećava izgled za nastanak pupova za 1,4x (CI 1,1-1,8).

Tablica 33. Rezultati logističke regresije za prisustvo binuklearnih stanica s pupom

	B	SE	p	OR	95% CI za OR
Prisutni fluoridi (0=ne; 1=da)	-0,109	0,087	0,210	0,9	0,8-1,1
Bioaktivni sustav (0=ne; 1=da)	0,346	0,117	0,003	1,4	1,1-1,8
konstanta	-4,716	0,060			

B, nestandardizirani koeficijent; SE, standardna pogreška; p, razina statističke značajnosti; OR, omjer izgleda; 95% CI, 95% interval pouzdanosti

Slično je ostalo i kada su u model dodane ostale varijable (tablica 34). U linearnoj regresiji nije bilo značajnih odrednica broja BN s MN ni BN s NB.

Tablica 34. Rezultati logističke regresije za prisustvo binuklearnih stanica s pupom uz kontrolu ostalih varijabli

	B	SE	p	OR	95% CI za OR
Prisutni fluoridi (0=ne; 1=da)	-0,498	0,126	<0,001	0,6	0,5-0,8
Bioaktivni sustav (0=ne; 1=da)	0,330	0,118	0,005	1,4	1,1-1,8
Vrijeme osvjetljavanja (0=10s; 1=20s)	0,030	0,097	0,761	1,0	0,9-1,3
Samo kompozit (0=ne; 1=da)	-0,151	0,199	0,447	0,9	0,6-1,3
Samo kombinacija (0=ne; 1=da)	0,031	0,174	0,857	1,0	0,7-1,5
Samo adheziv (0=ne; 1=da)	-0,065	0,138	0,639	0,9	0,7-1,2
DC (0<60; 1>60)	-0,038	0,104	0,719	1,0	0,8-1,2
konstanta	-4,640	0,198			

B, nestandardizirani koeficijent; SE, standardna pogreška; p, razina statističke značajnosti; OR, omjer izgleda; 95% CI, 95% interval pouzdanosti

4.4.6. Rezultati komet testa

Pozitivna kontrola pokazala je značajno veću dužinu repa te značajno veći udio DNK u repu kometa od negativne kontrole (tablica 35; $p \leq 0,014$), čime je utvrđeno da je test valjan. Veličina učinka bila je mala za razliku u dužini, a vrlo velika za razliku u intenzitetu repa.

Jednofaktorska ANOVA nije pokazala značajne razlike u dužini i intenzitetu repa kometa unutar skupina kompozita, adheziva te njihovih kombinacija, u oba vremena osvjetljavanja. Ujedno se nijedan ispitivani materijal nije značajno razlikovao od negativne kontrole, stoga rezultati nisu prikazani.

Tablica 35. Razlike u rezultatima komet testa između pozitivne i negativne kontrole

	Prosjek dužine		Prosjek intenziteta repa	
	repa (μm)	SD	(% DNK u repu)	SD
NK	17,3	1,8	1,4	0,7
PK	32,8	12,6	38	21,4
p*	0,014		<0,001	
Cohenov d	0,350		1,250	

SD, standardna devijacija; PK, pozitivna kontrola etilmetanosulfonat u konačnoj koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ kulture; NK, negativna kontrola; p, razina značajnosti

*Studentov t-test za nezavisne uzorke

5. RASPRAVA

5.1. Stupanj konverzije ortodontskih adhezivnih sustava i njihovih komponenti

Razlike u DC-u između ortodontskih kompozita bile su značajne u oba vremena osvjetljavanja, to se može pripisati razlikama u njihovom sastavu. Obzirom da proizvođači točan sastav materijala čuvaju kao poslovnu tajnu, razlike nije jednostavno obrazložiti.

GS je pokazao značajno veći DC od ostalih komercijalnih kompozita u oba vremena osvjetljavanja. On je staklenoionomer modificiran smolom te polimerizira dvojako: smolasta komponenta svjetlosno, a stakloionomerna komponenta kemijski. Prema dostupnim podacima iz deklaracije proizvođača, čini se kako upravo GS ima najsloženiji sastav od svih ispitivanih materijala, a ujedno je maseni udio smolaste komponente dominantan u odnosu na staklenoionomernu. Naime, poliakrilna kiselina i stakleno punilo zajedno čine samo oko 10% sastava GS. Najveći je sadržaj Bis-EMA, koji pokazuje značajno veći DC od Bis-GMA [38], vjerojatno zato što ne sadrži hidroksilne skupine koje kod Bis-GMA stvaraju vodikove veze smanjujući fleksibilnost i mobilnost [153]. Manji dio matrice GS čini sustav NTG-GMA i PMDM koji promovira adheziju na caklinu i metalne površine [19], ali podaci o njegovom DC-u nisu dostupni u literaturi. Obzirom da nakon 20 sekundi osvjetljavanja DC za GS nije bio značajno veći, očito je da ovaj hibridni materijal svoj maksimalni DC dostiže već nakon 10 sekundi osvjetljavanja te je daljnje osvjetljavanje nepotrebno.

TBXT je baziran na Bis-GMA i očekivano je pokazao značajno manji DC od svih kompozita, uz izuzetak ACP40, nakon 10 sekundi osvjetljavanja. Preporuka proizvođača je osvjetljavanje od po 5 sekundi s mezijalne i distalne strane pri 1000 mW/cm². Vrijednost DC-a za ovaj kompozit od 39,7% niža je od vrijednosti dobivenih u prijašnjim istraživanjima [63, 74]. Međutim, Jagdish *et al.* ne opisuju uvjete osvjetljavanja, navodeći samo da je ono učinjeno prema preporuci proizvođača [74], dok su Gioka *et al.* osvjetljavali po 10 sekundi s incizalne i cervikalne strane metalne bravice, ali pri intenzitetu svjetlosti od 650 mW/cm² [63]. Zbog različitih ekperimentalnih uvjeta, izravne usporedbe rezultata nisu moguće. U ovome je istraživanju TBXT postigao značajno veći DC nakon ukupno 20 sekundi osvjetljavanja, to navodi na zaključak da vrijeme koje je predvidio proizvođač nije dovoljno za postizanje

maksimalne konverzije. No, i nakon 20 sekundi, DC je za TBXT bio značajno niži od svih ispitivanih kompozita, uz izuzetak TB+. Bazni monomer u TB+ je PEGDMA, dok je Bis-GMA prisutan u manje od 1% masenog udjela. Kod eksperimentalnih kompozita s ova dva monomera, DC je rastao s promjenom omjera u korist PEGDMA [77], što može objasniti razlike između TBXT i TB+. Duže osvjetljavanje je značajno povećalo DC i kod TB+, ali u manjem iznosu nego kod TBXT.

Kompoziti LB i LBF su bazirani isključivo na UDMA i TEGDMA, iako se, zbog neprecizne deklaracije proizvođača, ne može jednoznačno tvrditi da su istoga sastava matrice. Čini se da 1% sadržaj fluorida ne utječe na DC kod LBF. Razlike u DC-u između ovih dvaju kompozita bile su minimalne, a duže vrijeme osvjetljavanja ga je kod oba materijala značajno poboljšalo. Preporuka je proizvođača osvjetljavanje od 6 do 20 sekundi, ovisno o intenzitetu svjetlosti, koji nije dalje specificiran. Obzirom da se intenzitet od 1100 mW/cm² korišten u ovom istraživanju smatra visokim [132], očito je da je osvjetljavanje kraće od 20 sekundi nepovoljno za LB i LBF te se ne preporuča.

Eksperimentalni kompoziti ACP40 i Sr70 značajno su se razlikovali u DC-u samo nakon 20 sekundi osvjetljavanja, kada je ACP40 pokazao najveći DC među ispitivanim kompozitima, što je vjerojatno posljedica visokoga sadržaja Bis-EMA. Očito je da osvjetljavanje od 10 sekundi nije dovoljno za primjerenu polimerizaciju ACP40, tim više što se ona u ortodonciji odvija ispod metalne bravice. Dosadašnja istraživanja DC-a za ovaj eksperimentalni materijal provedena su izravnim osvjetljavanjem uzoraka tijekom 30 i 40 sekundi, čime je ostvaren DC iznad 70% [102, 105]. Zanimljivo je da je raspršenje vrijednosti DC-a kod ACP40 mnogo veće prilikom 10 sekundi nego pri 20 sekundi osvjetljavanja. Moguće objašnjenje nalazimo u činjenici da, obzirom da polimerizacija nije završena, infracrvena analiza zahvaća raznolike regije polimerne mreže i još uvijek slobodnih monomera te prema tome detektira manje ili više C=C veza. Iako je smolasta matrica kod oba eksperimentalna kompozita istoga sastava, Sr70 nije dostigao DC ACP40 nakon 20 sekundi osvjetljavanja. Vjerojatni je razlog tome mnogo veći udio punila u Sr70 koje može otežavati prodor svjetlosti [200].

Ispitivani adhezivi također su se razlikovali sastavom. Obzirom da je LBF bond pokazao značajno niži DC od TBXT bonda u oba vremena osvjetljavanja, vjerojatno je kod njega veći udio Bis-GMA u odnosu na TEGDMA nego kod TBXT bonda. LB bond sadrži Bis-GMA i UDMA i imao je najveći DC te značajno veći od LBF nakon 10 sekundi

osvjetljavanja. Nije jasno je li sadržaj hidrofluorid metakrilata mogao utjecati na DC LBF bonda koji je bio najniži među adhezivima u oba vremena osvjetljavanja. Ujedno je to i jedini adheziv kod koga duže osvjetljavanje nije dovelo do značajno boljšeg DC-a. Tenure je pokazao najveće raspršenje podataka, moguće zbog nehomogenosti nastalih prilikom ručnoga miješanja komponenti, a imao je i najveće povećanje DC-a prilikom dužeg osvjetljavanja.

Kombinacije kompozita i odgovarajućeg adheziva odgovaraju klinički prisutnom adhezivnom sustavu između bravice i cakline. U ovom je istraživanju analiziran DC pojedinačnih komponenti kako bi se mogao procijeniti njihov utjecaj na DC sustava. Utjecaj adheziva na DC sustava jasan je na primjeru GS komb: dok je kod samih kompozita nakon 10 sekundi osvjetljavanja GS imao najveći DC, 69,3%, u kombinaciji s Tenure pokazao je niži DC od 55,5%, što je logično obzirom da je DC samog Tenure bio 42,2%. Nakon 20 sekundi osvjetljavanja, DC za GS komb je ponovno bio najveći među svim kombinacijama, što također slijedi rezultate za pojedinačne komponente.

Čini se da je TBXT bond značajno pridonio većem DC-u i kod TBXT komb i TB+ komb u oba vremena osvjetljavanja. Neobično je da je Sr70 komb pokazala niži DC od pojedinačnih komponenti nakon 10 sekundi osvjetljavanja, što bi se djelomično moglo objasniti velikim raspršenjem podataka zbog nepotpune polimerizacije, ali i moguće nehomogenosti eksperimentalnoga materijala. LB komb nije se značajno razlikovala od TBXT u oba vremena osvjetljavanja, a LBF komb je imala značajno niži DC od TBXT komb nakon 10 sekundi osvjetljavanja. Kada su analizirane razlike samih kompozita, TBXT je imao značajno niži DC i od LB i od LBF u oba vremena. Vjerojatno su razlike kod kompozita prisutne zbog toga što je TBXT baziran na Bis-GMA, a LB i LBF na UDMA i TEGDMA. S druge strane, TBXT bond u TBXT komb unosi TEGDMA, a LB bond i LBF bond u kombinacije s odgovarajućim kompozitima unose Bis-GMA, zbog čega se rezultati za kombinacije materijala doimaju oprečnima. Stoga je u budućim istraživanjima DC ortodontskih kompozitnih sustava uputno koristiti obje klinički prisutne komponente.

Općenito, DC je kod svih kombinacija adheziva i kompozita bio veći nakon 20 sekundi osvjetljavanja, što ponovno navodi na zaključak da je, unatoč preporuci proizvođača, kraće osvjetljavanje nedostavno za postizanje primjerenoga DC-a.

5.2. Mikrotvrdoća kombinacija kompozita i adheziva

U ovome je dijelu istraživanja ispitana mikrotvrdoća kombinacija kompozita i adheziva obzirom da one odgovaraju materijalu prisutnom u kliničkoj situaciji. Uzorci su potpuno uronjeni u umjetnu slinu kiselog pH, dok je klinički samo rubni dio adhezivnoga sustava izložen djelovanju sline i dentobakterijskoga plaka. No, cilj je bio intenzivirati djelovanje navedenih čimbenika tijekom mjesec dana inkubacije pri tjelesnoj temperaturi kako bi se u kraćemu vremenu simulirali uvjeti kojima su adhezivni sustavi u usnoj šupljini izloženi tijekom dvije ili tri godine.

Nakon 10 sekundi osvjetljavanja, TB+ komb je imala značajno veću mikrotvrdoću od TBXT komb. Oni sadrže isto punilo, ali, unatoč nepreciznoj deklaraciji proizvođača, postoji naznaka da ga u TB+ ima više, što bi moglo objasniti ovu razliku. LB komb i LBF komb, koje su sličnoga sastava, nisu se međusobno značajno razlikovale. GS komb je imala nisku mikrotvrdoću, što je u suglasju s rezultatima Gladys *et al.* [64]. Izuzetno nisku mikrotvrdoću pokazali su ACP40, ali i Sr70, unatoč visokom udjelu punila. Stoga je vjerojatno da kod ovih materijala sastav matrice utječe na njihove mehaničke karakteristike. Nakon mjesec dana uranjanja u umjetnu slinu kiselog pH, mikrotvrdoća se značajno smanjila za sve kombinacije osim LB komb i LBF komb te se pokazalo da su ova dva materijala dugoročno strukturno stabilnija od TB+ komb i TBXT komb, ako su osvjetljavani 10 sekundi. Iako je zbog složenog sastava ovih materijala teško odrediti uzrok takve razlike, moguće je da prisutnost UDMA u LB komb i LBF ove materijale čini tvrdima obzirom da je dodatak UDMA poboljšao tvrdoću Bis-GMA/TEGDMA smolaste matrice u istraživanju Chowdhury *et al.* [30]. Smanjenje mikrotvrdoće GS može se pripisati apsorpciji vode [24]. Također, pokazalo se da izlaganje umjetnoj slini uzrokuje smanjenje površinske mikrotvrdoće kompozita [113]. Obzirom da su uzorci ortodontskih adhezivnih sustava izuzetno tanki, kod njih je površinska mikrotvrdoća jedina mjerljiva i relevantna.

Nakon 20 sekundi osvjetljavanja, LB komb, LBF komb i TB+ komb postigle su značajno veću mikrotvrdoću od TBXT komb. Nakon uranjanja, LB komb i LBF komb su ponovno pokazale veću postojanost, a TB+ komb značajno smanjenje mikrotvrdoće. Općenito, duže osvjetljavanje je poboljšalo mikrotvrdoću nakon uranjanja kod svih komercijalnih sustava, iako se kod TB+ komb i GS komb time ne može postići značajan učinak. Suprotno hipotezi, rezultati su pokazali da sadržaj NaF

u LBF komb nije povezan sa smanjenjem mikrotvrdoće. Čini se da topive soli fluorida nemaju značajnu ulogu u strukturnoj stabilnosti kompozita, već ona ovisi o sastavu matrice i punila. S druge strane, u TB+ komb fluoridi se nalaze u sastavu staklenog punila koje bi trebalo osigurati njihovo otpuštanje uz zadržavanje dobrih mehaničkih karakteristika [6], no TB+ komb se nije pokazala dovoljno postojanom nakon izlaganja umjetnoj slini kiseloga pH. Eksperimentalni kompoziti su pokazali izuzetno nisku mikrotvrdoću nakon uranjanja u umjetnu slinu, neovisno o trajanju osvjetljavanja. Iako je problem apsorpcije vode problem kod ACP40 zbog hidrofilnosti samog ACP [5], niska tvrdoća i postojanost Sr70 ukazuju na problem u matrici te ovi materijali nemaju zadovoljavajuće mehaničke karakteristike za kliničku upotrebu u ortodonciji.

5.3. Korelacije stupnja konverzije i mikrotvrdoće ortodontskih adhezivnih sustava

Općenito, mikrotvrdoća adhezivnih sustava netom po polimerizaciji pokazala je pozitivnu, no slabu korelaciju s DC-em. Osim toga, DC nije bio značajno povezan s mikrotvrdoćom materijala nakon mjesec dana uranjanja u umjetnu slinu. Međutim, kada su materijali grupirani prema vremenu osvjetljavanja, i prije i nakon uranjanja, pokazalo se da se mikrotvrdoća adhezivnih sustava osvjetljivanih 10 sekundi povećava s porastom DC-a, dok je kod sustava osvjetljivanih 20 sekundi trend suprotan te je veći DC povezan s nižom mikrotvrdoćom. Ujedno, korelacije su pri 20 sekundi bile značajno slabije nego pri 10 sekundi osvjetljavanja. To se može objasniti činjenicom da su nakon 20 sekundi među sustavima s najvećim DC-em bili GS, ACP40, i Sr70, materijali koji su ujedno pokazali najniže vrijednosti mikrotvrdoće. Obzirom da su svi materijali imali veći DC nakon 20 sekundi, nego pri 10 sekundi osvjetljavanja, vjerojatno je da dužim osvjetljavanjem postižu maksimum konverzije nakon koga će mikrotvrdoća ovisiti o fizikalnim svojstvima polimerizirane matrice i punila, uz što je povezana i apsorpcija vode tijekom uranjanja, dok je visoki DC samo posljedica reakcije polimerizacije. Suprotno tome, tijekom kraćeg osvjetljavanja, kada nije još postignuta maksimalna moguća konverzija, DC je indikator nagloga stvrdnjavanja zbog prelaska vrlo mekane monomerne paste u polimer i zbog toga je korelacija mikrotvrdoće i DC-a u istraživanju bila pozitivna i jaka. Ovime bi se mogla objasniti proturječnost rezultata dosadašnjih istraživanja [78, 141, 176].

Korelacija DC-a i razlike u mikrotvrdoći prije i poslije izlaganja umjetnoj slini vrlo je slaba. Porastom DC-a rasla je i razlika mikrotvrdoće, vjerojatno zato što su ACP40 i Sr70 i prije izlaganja umjetnoj slini imali vrlo nisku tvrdoću te nisu mogli postati mnogo mekši tijekom uranjanja.

5.4. Genotoksičnost ortodontskih adhezivnih sustava i njihovih komponenti

CBMN-test nije pokazao značajne razlike u frekvenciji jezgrinih anomalija obzirom na vrijeme osvjetljavanja kada su materijali bili grupirani u skupine kompozita, adheziva i kombinacija. Stoga je potvrđena hipoteza da genotoksičnost generalno ne ovisi o trajanju osvjetljavanja. Obzirom na heterogenost ovih skupina, analizirani su i rezultati po pojedinačnome materijalu te se kod kompozita TB+ i kombinacije TB+ komb kod kraćeg osvjetljavanja javio značajno veći broj binuklearnih limfocita s pupovima. Zanimljivo je da je adheziv koji ulazi u sustav TB+ komb, TBXT bond, pokazao suprotan rezultat, značajno manje binuklearnih stanica s pupovima prilikom kraćeg osvjetljavanja. Obzirom da je maseni udio kompozita unutar adhezivnoga sustava mnogo veći od udjela adheziva, vjerojatno je i doprinos kompozita genotoksičnosti kombinacije veći. TB+ sadrži hidrofilni metakrilat PEGDMA zbog koga bi, prema tvrdnjama proizvođača, materijal trebao biti manje osjetljiv na vlažnu sredinu prilikom polimerizacije, što osigurava dobru vezu bravice i zuba i u slučaju kontaminacije cakline slinom tijekom postave [183]. Nakon polimerizacije, PEGDMA oblikuje hidrogel koji se istražuje kao sintetski analog izvanstaničnoga matriksa u pokušaju regeneracije raznih vrsta tkiva [81] te, kao takav, nije pokazao citotoksičan učinak nad humanim glatkim mišićnim stanicama [101] i goveđim hondrocitima [92]. Genotoksičan učinak PEGDMA do sada nije istražen. Obzirom da je TB+ osvjetljavao 10 sekundi pokazao i značajno više binuklearnih stanica s pupovima od negativne kontrole, moguće je da je razlog tome otpuštanje monomera PEGDMA. TB+ i TB+ komb osvjetljavani 20 sekundi nisu se značajno razlikovali od negativne kontrole, što bi mogla biti posljedica većega DC-a i, posljedično, manjeg otpuštanja PEGDMA. S druge strane, hidrofilna svojstva ovoga materijala trebala bi olakšati difuziju fluoridnih iona iz punila te je njihovo otpuštanje oko 500 µg/g materijala u prvome danu [183], što je kod uzoraka u ovome istraživanju, prosječne mase 5,5 mg, značilo otpuštanje od 2,7 µg u 5 mL staničnoga medija. Ta je koncentracija oko 2,5 puta manja od koncentracije NaF od 10 µg/7 mL staničnog medija koja je imala genotoksičan učinak u obliku povećanog broja izmjena sestrinskih kromatida u kulturi humanih limfocita [119]. Obzirom da fluoridni ion čini oko 50% mase NaF, koncentracija fluorida koja je u navedenom istraživanju imala genotoksičan učinak zapravo je slična onoj koju bismo očekivali u našem eksperimentu. Ipak, 70-90% mase TBXT i TB+ čini isto stakleno

punilo u koje su kod TB+ dodani fluoridi, a između ovih materijala nije bilo značajnih razlika u genotoksičnosti. Osim toga, logistička regresija koja je u obzir uzela i druge kompozite i kombinacije s fluoridima osim TB+ (LB, LB komb, GS, GS komb, Sr70, Sr70 komb) pokazala je da sadržaj fluorida nije odrednica pojave mikronukleusa ni pupova.

Generalno, svi su kompoziti, adhezivi i njihove kombinacije uzrokovali povećanje broja binuklearnih stanica s pupovima, ali ne i s mikronukleusima. No, to je povećanje bilo statistički značajno samo za kompozit TB+ nakon 10 sekundi, adhezive TBXT bond i LB bond nakon 20 sekundi, adhezivni sustav TB+ komb nakon 10 sekundi te sustave ACP40 komb i Sr70 komb nakon 20 sekundi. Povećanje broja pupova očekivano je obzirom da izlaganje kemijskim spojevima koji uzrokuju stvaranje epoksida dovodi do pojačanog popravka DNK.

Dok se sam kompozit ACP40 nije razlikovao od kontrole, u kombinaciji s adhezivom TBXT bond pokazao je značajno više binuklearnih stanica s pupovima u oba vremena osvjetljavanja. Pri 10 sekundi osvjetljavanja TBXT bond se nije razlikovao od trake na kojoj je unesen u kulturu stanica, ali je rezultat nakon 20 sekundi bio značajno veći. Obzirom da je sustav ACP40 komb unesen bez trake, a ujedno je ACP40 komb pokazala značajno veću frekvenciju binuklearnih limfocita s pupovima od samog ACP40, moguće je da monomeri u ACP40 i TBXT bond pokazuju aditivni učinak i pri 10 sekundi osvjetljavanja. ACP40 je baziran najvećim dijelom na Bis-EMA, koji je djelovao citotoksično na immortalizirane mišje odontoblaste i pulpne stanice, ali značajno slabije od Bis-GMA [17], vjerojatno stoga što, općenito, metakrilati s hidroksilnim skupinama imaju veći toksični potencijal [201]. Prema dosadašnjim saznanjima, citotoksičnost i indukcija dvostrukih lomova DNK uzrokovane dentalnim metakrilatima smanjuju se sljedećim redoslijedom: Bis-GMA > UDMA > TEGDMA > HEMA [184]. Iako još uvijek nedostaju ciljana istraživanja genotoksičnosti Bis-EMA, endodontski cementi u čijem se sastavu nalazi pokazali su biološki irelevantnu genotoksičnost [10]. Moguće je da je u ovom istraživanju Bis-EMA uz dodatak Bis-GMA iz TBXT bond mogao uzrokovati pupanje iz jezgara limfocita izloženih ACP40 komb. Kaspaza-3 ima značajnu ulogu u nastanku mikronukleusa [43], a Bis-GMA povećava njezinu ekspresiju u mišjim makrofazima RAW264.7 te je učestalost mikronukleusa ovisna o dozi Bis-GMA [89]. Moguće je da je količina Bis-GMA

otpuštena iz TBXT bond bila nedovoljna da bi uzrokovala gubitke kromosoma ili kromosomske lomove, ali je u sinergiji s Bis-EMA iz ACP40 komb dovela do povećane aktivnosti reparatornih mehanizama DNK. Takvom učinku mogao je pridonijeti i TEGDMA, koji se zbog relativno male molekularne mase lakše otpušta nego Bis-GMA [57]. Logistička regresija pokazala je kako je ACP40 značajna odrednica pojave pupova. Vjerojatnije je da je uzrok oštećenja i popravka DNK prisutnost Bis-EMA i drugih monomera nego samog ACP [161].

Sr70 komb je nakon 20 sekundi osvjetljavanja pokazala značajno više binuklearnih stanica s pupovima od kontrole, a sam kompozit nije imao takav učinak. Slično kao kod ACP40, tome je mogao doprinijeti TBXT bond. Međutim, obzirom da je udio punila u Sr70 mnogo veći, a genotoksičnost je bila prisutna samo pri dužem osvjetljavanju, kada je DC veći i očekivalo bi se manje otpuštanje monomera, moguće je da je razlog tome stroncijevu stakleno punilo ili fluoridni ioni koji se u njemu nalaze. Poznato je da može doći do ispiranja stroncijevih i silicijevih iona u vodeni medij ili do ispiranja stakla zbog raspadanja veze između punila i matrice posredovane silanom [152], a modifikacija stakla ionima barija ili stroncija povećava ispiranje [162, 163]. Barij-alumino-silikatno staklo inducira sekreciju proupalnih citokina u kulturi humanih bronhijalnih epitelnih stanica [4], a dokazano je i aditivno djelovanje TEGDMA [110]. Genotoksičan i citotoksičan učinak stroncijevih iona ili stroncijevog oksida do sada nije reportiran. Moguće je da TBXT, koji također sadrži visoki udio punila, nije pokazao takvo djelovanje jer se punilo kod toga kompozita sastoji samo od silaniziranoga silicijevog dioksida bez dodataka metalnih iona.

LBF, baziran na UDMA i TEGDMA, nakon 10 sekundi osvjetljavanja pokazao je manju frekvenciju kromosomskih anomalija od TB+ i Sr70, dok razlike nisu bile značajne nakon 20 sekundi osvjetljavanja. Međutim, LB, sličnoga sastava kao i LBF, nije se razlikovao od ovih materijala. Ujedno nije bilo razlika između TBXT, formuliranoga na osnovi Bis-GMA te LB i LBF, a tako ni između adheziva temeljenih na različitim metakrilatima.

Rezultati komet testa i CBMN-testa ukazuju kako ispitivani materijali nisu inducirali oštećenja koja bi nadmašila potencijal mehanizama popravka. Komet test je pokazao nasumične varijacije u parametrima primarnog oštećenja DNK koje nisu bile statistički značajne, stoga je očekivano da adhezivni sustavi nisu uzrokovali ni

povećanje razine mikronukleusa. Jagdish *et al.* dokazali su citotoksičan učinak raznih ortodontskih adhezivnih sustava [74], ali na uzorcima dimenzija 2x2x8 mm koje ne odgovaraju kliničkoj situaciji. Po dvadeset uzoraka stvarne veličine koristili su Gioka *et al.* te su pokazali smanjenje sinteze DNK kod humanih gingivnih fibroblasta nakon izlaganja mediju u kojem su tijekom dva mjeseca uzorci ispirani [63]. U mediju je otkrivena TEGDMA, ali ne i Bis-GMA. Klinički je značaj ovih rezultata upitan obzirom da je intraoralno djelovanju sline izložen samo periferni dio adhezivnog sustava ispod bravice. Unatoč dokazanom citotoksičnom i genotoksičnom učinku metakrilatnih monomera, vjerojatno je da su količine koje se otpuštaju iz ortodontskih kompozitnih sustava nedostatne da bi uzrokovale biološki relevantne promjene DNK. Osim toga, oralni epitel koji je izložen monomerima neprestano se obnavlja, uz prosječno vrijeme potpune zamjene stanica od 14 dana [164]. Potencijalni problem ostaje bisfenol A, nusproizvod degradacije Bis-GMA, koji djeluje estrogeno u životinjskim modelima [1, 135], te se pojavljuje u slini i urinu nakon postave *edgewise* naprave, ali u dozama nižima od tolerabilnih [118]. Potrebno je istražiti nove formulacije matrice bez Bis-GMA koje bi imale dobra mehanička svojstva [126].

5.5. Korelacija stupnja konverzije i genotoksičnosti ortodontskih adhezivnih sustava

Za sve adhezivne sustave i one osvjetljavane 10 sekundi, DC je pozitivno i snažno korelirao s brojem binuklearnih stanica s mikronukleusima. Ovu korelaciju treba oprezno interpretirati jer DC ni vrijeme osvjetljavanja nisu značajne odrednice pojave mikronukleusa, a i usporedba s kontrolom pokazala je da frekvencija mikronukleusa kod adhezivnih sustava nije značajno veća. Stoga se ne može zaključiti da je veći DC povezan s većom genotoksičnošću.

6. ZAKLJUČCI

Razlike u stupnju konverzije između samih kompozita i njihovih kombinacija s adhezivima bile su značajne, što znači da je potrebno ispitivati obje klinički prisutne komponente.

Svi ispitivani adhezivni sustavi postigli su veći stupanj konverzije nakon 20 sekundi osvjetljavanja.

Sustavi s većim udjelom UDMA i TEGDMA imaju veći stupanj konverzije od sustava s većim udjelom Bis-GMA.

Eksperimentalni adhezivni sustav s dodatkom ACP postiže veći stupanj konverzije od eksperimentalnoga sustava s inertnim staklenim punilom koji sadrži fluoride. Oba materijala imaju izuzetno malu tvrdoću i nisu primjereni za kliničku upotrebu u ortodonciji.

Ortodontski adhezivni sustavi ne uzrokuju lomove lanaca DNK ni formiranje mikronukleusa.

Genotoksičnost nije povezana s trajanjem osvjetljavanja ni sa stupnjem konverzije. Sadržaj fluorida u adhezivnom sustavu nije povezan s povećanim stvaranjem pupova. Bioaktivni ACP40 povećava izgled za nastanak pupova.

Materijali s većim udjelom UDMA i TEGDMA nemaju veći genotoksični učinak od onih baziranih na Bis-GMA.

Ortodontski adhezivni sustavi dovode do povećane aktivnosti mehanizama popravka DNK, ali njihovo genotoksično djelovanje je biološki irelevantno.

7. LITERATURA

- [1] Ahmed RA, ElGhamrawy TA, Salama EE. Effect of prenatal exposure to bisphenol a on the vagina of albino rats: immunohistochemical and ultrastructural study. *Folia Morphol (Warsz)* 2014;73:399-408.
- [2] Amato PA, Martins RP, dos Santos Cruz CA, Capella MV, Martins LP. Time reduction of light curing: Influence on conversion degree and microhardness of orthodontic composites. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2014;146:40-46.
- [3] Angelieri F, Joias RP, Bresciani E, Noguti J, Ribeiro DA. Orthodontic cements induce genotoxicity and cytotoxicity in mammalian cells in vitro. *Dent Res J (Isfahan)* 2012;9:393-398.
- [4] Ansteinsen VE, Samuelsen JT, Dahl JE. Filler particles used in dental biomaterials induce production and release of inflammatory mediators in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;89:86-92.
- [5] Antonucci JM, Skrtic D. Matrix resin effects on selected physicochemical properties of amorphous calcium phosphate composites. *J Bioact Compat Polym* 2005;20:29–49.
- [6] Arends J, Dijkman GE, Dijkman AG. Review of fluoride release and secondary caries reduction by fluoridating composites. *Adv Dent Res* 1995;9:367–376.
- [7] Atai Z, Atai M. Side effects and complications of dental materials on oral cavity. *Am J Applied Sci* 2007;4:946–949.
- [8] Attar N, Turgut MD. Fluoride release and uptake capacities of fluoride-releasing restorative materials. *Oper Dent* 2003;28:395-402.
- [9] Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AS, Mioglou E, Garefis P. Sister-chromatid exchange, chromosomal aberrations and delays in cell-cycle kinetics in human lymphocytes induced by dental composite resin eluates. *Mutat Res* 2008;649:79-90.
- [10] Baraba A, Zelježić D, Kopjar N, Mladinić M, Anić I, Miletić I. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of two resin-based root-canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *Int Endod J* 2011;44:652-661.
- [11] Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact* 2010;188:319-333.
- [12] Barszczewska-Rybarek IM. Structure-property relationships in dimethacrylate

- networks based on Bis-GMA, UDMA and TEGDMA. *Dent Mater*. 2009;25:1082-1089.
- [13] Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:429-433.
- [14] Bishara SE, Ostby AW. White spot lesions: Formation, prevention, and treatment. *Semin Orthod* 2008;14:174–182.
- [15] Black GV. A work on operative dentistry, vol. 2. Chicago: The Medico-Dental Publishing Company; 1908, str. 110-116.
- [16] Boersma JG, van der Veen MH, Lagerweij MD, Bokhout B, Prahl-Andersen B. Caries prevalence measured with QLF after treatment with fixed orthodontic appliances: influencing factors. *Caries Res* 2005;39:41-47.
- [17] Boland EJ, MacDougall M, Carnes DL, Dickens SH. In vitro cytotoxicity of a remineralizing resin-based calcium phosphate cement. *Dent Mater* 2006;22:338-345.
- [18] Bolaños-Carmona V, Zein B, Menéndez-Núñez M, Sánchez-Sánchez P, Ceballos-García L, González-López S. Influence of the bracket on bonding and physical behavior of orthodontic resin cements. *Dent Mater J* 2015;34:449-457.
- [19] Bowen RL, Cobb EN. A method for bonding to dentin and enamel. *J Am Dent Assoc* 1983;107:734-736.
- [20] Brantley W, Eliades T, ur. Orthodontic materials. Stuttgart-New York: Thieme; 2001, str. 189-219.
- [21] Buljan ZI, Ribaric SP, Abram M, Ivankovic A, Spalj S. In vitro oxidative stress induced by conventional and self-ligating brackets. *Angle Orthod* 2012;82:340-345.
- [22] Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011;22:97-114.
- [23] Carvalho CV, Saraiva L, Bauer FPF, Kimura RY, Souto MLS, Bernardo CC, Pannuti CM, Romito GA, Pustiglioni FE. Orthodontic treatment in patients with aggressive periodontitis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2018;153:550-557.
- [24] Cattani-Lorente MA, Dupuis V, Payan J, Moya F, Meyer JM. Effect of water on the physical properties of resin-modified glass ionomer cements. *Dent Mater* 1999;15:71-78.
- [25] Chan DC, Swift EJ Jr, Bishara SE. In vitro evaluation of a fluoride-releasing orthodontic resin. *J Dent Res* 1990;69:1576-1579.

- [26] Chang HH, Chang MC, Lin LD, Lee JJ, Wang TM, Huang CH, Yang TT, Lin HJ, Jeng JH. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials* 2010;31:6917-6925.
- [27] Chapman H. Orthodontics: fifty years in retrospect. *Am J Orthod* 1955;41:421-442.
- [28] Chapman JA, Roberts WE, Eckert GJ, Kula KS, González-Cabezas C. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:188-194.
- [29] Chen L, Shen H, Suh BI. Bioactive dental restorative materials: a review. *Am J Dent* 2013;26:219-227.
- [30] Chowdhury NA, Wakasa K, Priyawan R, Yamaki M. Matrix strengthening in new ternary Bis-GMA/TEGDMA/urethane resin systems. *J Mater Sci Lett* 1996;15:1912-1915.
- [31] Christensen GJ. Curing restorative resin: a significant controversy. *J Am Dent Assoc* 2000;131:1067-9.
- [32] Chung HW, Kang SJ, Kim SY. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutat Res* 2002;516:49-56.
- [33] Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010;89:1187-1197.
- [34] Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stětina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997;375:183-193.
- [35] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26:249-261.
- [36] Cook WD, Beech DR, Tyas MJ. Resin-based restorative materials--a review. *Aust Dent J* 1984;29:291-295.
- [37] Çörekçi B, Malkoç S, Öztürk B, Gündüz B, Toy E. Polymerization capacity of orthodontic composites analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;139e:299-304.
- [38] Cornelio RB, Wikant A, Mjøsund H, Kopperud HM, Haasum J, Gedde UW, Örtengren UT. The influence of bis-EMA vs bis GMA on the degree of conversion and water susceptibility of experimental composite materials. *Acta Odontol Scand* 2014;72:440-447.

- [39] Corruccini RS, Pacciani E. "Orthodontistry" and dental occlusion in Etruscans. *Angle Orthod* 1989;59:61-64.
- [40] Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN. Recent advances and developments in composite dental restorative materials. *J Dent Res* 2011;90:402-416.
- [41] Daemen MA, van 't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999;104:541-549.
- [42] De Assis Ribeiro Carvalho F, Almeida RC, Almeida MA, Cevidanes LHS, Leite MCAM. Efficiency of light-emitting diode and halogen units in reducing residual monomers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:617-622.
- [43] Decordier I, Cundari E, Kirsch-Volders M. Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: crosstalk between ploidy control and apoptosis. *Mutat Res* 2008;651:30-39.
- [44] Dobrucki J, Darzynkiewicz Z. Chromatin condensation and sensitivity of DNA in situ to denaturation during cell cycle and apoptosis--a confocal microscopy study. *Micron* 2001;32:645-652.
- [45] Dogon IL. Present and future value of dental composite materials and sealants. *Int J Technol Assess Health Care* 1990;6:369-377
- [46] Eliades T, Eliades G, Brantley WA, Johnston WM. Polymerization efficiency of chemically cured and visible light-cured orthodontic adhesives: degree of cure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;108:294-301.
- [47] Eliades T, Brantley WA. The inappropriateness of conventional orthodontic bond strength assessment protocols. *Eur J Orthod* 2000;22:13-23.
- [48] Eliades T. Orthodontic materials research and applications: part 1. Current status and projected future developments in bonding and adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130:445-451.
- [49] Eliades T. Orthodontic materials research and applications: part 2. Current status and projected future developments in materials and biocompatibility. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:253-262.
- [50] Evensen JP, Øgaard B. Are malocclusions more prevalent and severe now? A comparative study of medieval skulls from Norway. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:710-716.
- [51] Ewoldsen N, Demke RS. A review of orthodontic cements and adhesives. *Am J*

Orthod Dentofacial Orthop 2001;120:45-48.

- [52] Faltermeier A, Rosentritt M, Faltermeier R, Reicheneder C, Müssig D. Influence of filler level on the bond strength of orthodontic adhesives. *Angle Orthod* 2007;77:494-498.
- [53] Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000;455:81-95.
- [54] Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2003;534:65-75.
- [55] Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 2011;26:125-132.
- [56] Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999;18:7719-7730.
- [57] Finer Y, Santerre JP. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res* 2004;83:22-26.
- [58] Forshaw RJ. Orthodontics in antiquity: myth or reality. *Br Dent J* 2016;221:137-140.
- [59] Gajewski VE, Pfeifer CS, Fróes-Salgado NR, Boaro LC, Braga RR. Monomers used in resin composites: degree of conversion, mechanical properties and water sorption/solubility. *Braz Dent J* 2012;23:508-514.
- [60] Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater* 2015;13:43-60.
- [61] Gange P. The evolution of bonding in orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015;147:S56-63.
- [62] Geiger AM, Gorelick L, Gwinnett AJ, Griswold PG. The effect of a fluoride program on white spot formation during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988;93:29-37.
- [63] Gioka C, Bourauel C, Hiskia A, Kletsas D, Eliades T, Eliades G. Light-cured or chemically cured orthodontic adhesive resins? A selection based on the degree of cure, monomer leaching, and cytotoxicity. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*

2005;127:413-419.

- [64] Gladys S, Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative physico-mechanical characterization of new hybrid restorative materials with conventional glass-ionomer and resin composite restorative materials. *J Dent Res* 1997;76:883-894.
- [65] Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig* 2008;12:1-8.
- [66] Gosavi SS, Gosavi SY, Alla RK. Local and systemic effects of unpolymerised monomers. *Dent Res J (Isfahan)* 2010;7:82-87.
- [67] Gupta SK, Saxena P, Pant VA, Pant AB. Release and toxicity of dental resin composite. *Toxicol Int* 2012;19:225-234.
- [68] Hadler-Olsen S, Sandvik K, El-Agroudi MA, Øgaard B. The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen-a prospective study. *Eur J Orthod* 2012;34:633-639.
- [69] Hosseinalipour M, Javadpour J, Rezaie H, Dadras T, Hayati AN. Investigation of mechanical properties of experimental Bis-GMA/TEGDMA dental composite resins containing various mass fractions of silica nanoparticles. *J Prosthodont* 2010;19:112–117.
- [70] Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2011;2:435-444.
- [71] Igarashi K, Lee IK, Schachtele CF. Effect of dental plaque age and bacterial composition on the pH of artificial fissures in human volunteers. *Caries Res* 1990;24:52-58.
- [72] Ikejima I, Nomoto R, McCabe JF. Shear punch strength and flexural strength of model composites with varying filler volume fraction, particle size and silanation. *Dent Mater* 2003;19:206–211.
- [73] International Organization for Standardization. ISO 10993-1:2009 Biological evaluation of medical devices -- part 1: evaluation and testing within a risk management process. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
- [74] Jagdish N, Padmanabhan S, Chitharanjan AB, Revathi J, Palani G, Sambasivam M, Sheriff K, Saravanamurali K. Cytotoxicity and degree of conversion of orthodontic adhesives. *Angle Orthod* 2009;79:1133-1138.

- [75] Johal A, Ide M. Orthodontics in the adult patient, with special reference to the periodontally compromised patient. *Dent Update* 1999;26:101-104,106-108.
- [76] Kalachandra S, Turner DT. Water sorption of polymethacrylate networks: bis-GMA/TEGDMA copolymers. *J Biomed Mater Res* 1987;21:329-338.
- [77] Karmaker AC, Dibenedetto AT, Goldberg AJ. Extent of conversion and its effect on the mechanical performance of Bis-GMA/PEGDMA-based resins and their composites with continuous glass fibres. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:369-374.
- [78] Kauppi MR, Combe EC. Polymerization of orthodontic adhesives using modern high-intensity visible curing lights. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:316-322.
- [79] Kaur G, Dufour JM. Cell lines: valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2012;2:1-5.
- [80] Khalaf K. Factors affecting the formation, severity and location of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *J Oral Maxillofac Res* 2014;5:e4.
- [81] Killion JA, Geever LM, Devine DM, Kennedy JE, Higginbotham CL. Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone regeneration application. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011;4:1219-1227.
- [82] Kim YM, Kim DH, Song CW, Yoon SY, Kim SY, Na HS, Chung J, Kim YI, Kwon YH. Antibacterial and remineralization effects of orthodontic bonding agents containing bioactive glass. *Korean J Orthod* 2018;48:163-171.
- [83] Kingsley NW. *A Treatise on oral deformities as a branch of mechanical surgery*. New York: D. Appleton & Co; 1880.
- [84] Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent* 2004;32:229-234.
- [85] Kopjar N. Mikronukleus-test. U: Sertić J, ur. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2015, str. 641-654.
- [86] Kuhta M, Pavlin D, Slaj M, Varga S, Lapter-Varga M, Slaj M. Type of archwire and level of acidity: effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2009;79:102-110.
- [87] Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces

mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005;26:5130–5137.

- [88] Lempel E, Czibulya Z, Kovács B, Szalma J, Tóth Á, Kunsági-Máté S, Varga Z, Böddi K. Degree of conversion and BisGMA, TEGDMA, UDMA elution from flowable bulk fill composites. *Int J Mol Sci* 2016;17.
- [89] Li YC, Kuan YH, Huang FM, Chang YC. The role of DNA damage and caspase activation in cytotoxicity and genotoxicity of macrophages induced by bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate. *Int Endod J* 2012;45:499-507.
- [90] Lin HY, Bowers B, Wolan JT, Cai Z, Bumgardner JD. Metallurgical, surface, and corrosion analysis of Ni-Cr dental casting alloys before and after porcelain firing. *Dent Mater* 2008;24:378-385.
- [91] Lindberg HK, Falck GC, Järventaus H, Norppa H. Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH. *Mutagenesis* 2008;23:371-376.
- [92] Lin-Gibson S, Bencherif S, Cooper JA, Wetzel SJ, Antonucci JM, Vogel BM, Horkay F, Washburn NR. Synthesis and characterization of PEG dimethacrylates and their hydrogels. *Biomacromolecules*. 2004;5:1280-1287.
- [93] Lohbauer U, Frankenberger R, Krämer N, Petschelt A. Strength and fatigue performance versus filler fraction of different types of direct dental restoratives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;76:114-120.
- [94] Lööf J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H, Pameijer CH. A comparative study of the bioactivity of three materials for dental applications. *Dent Mater* 2008;24:653-659.
- [95] Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008;23:171–182.
- [96] Lovell DP. Statistical analysis of comet assay data. U: Anderson D, Waters MD, Marrs TC, ur. *The comet assay in toxicology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2017, str. 551-580.
- [97] Lucchese A, Gherlone E. Prevalence of white-spot lesions before and during orthodontic treatment with fixed appliances. *Eur J Orthod* 2013;35:664-668.
- [98] Lundström F, Krasse B. *Streptococcus mutans* and lactobacilli frequency in orthodontic patients; the effect of chlorhexidine treatments. *Eur J Orthod* 1987;9:109-116.

- [99] Lynch CD, O'Sullivan VR, McGillicuddy CT. Pierre Fauchard: the 'father of modern dentistry'. *Br Dent J* 2006;201:779-781.
- [100] Malkoc S, Corekci B, Ulker HE, Yalçın M, Sengün A. Cytotoxic effects of orthodontic composites. *Angle Orthod* 2010;80:571-576.
- [101] Mann BK, Gobin AS, Tsai AT, Schmedlen RH, West JL. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials* 2001;22:3045-3051.
- [102] Marovic D, Tarle Z, Ristic M, Music S, Skrtic D, Hiller KA, Schmalz G. Influence of different types of fillers on the degree of conversion of ACP composite resins. *Acta Stomatol Croat* 2011;45:231–238.
- [103] Marovic D, Tarle Z, Hiller KA, Müller R, Ristic M, Rosentritt M, Skrtic D, Schmalz G. Effect of silanized nanosilica addition on remineralizing and mechanical properties of experimental composite materials with amorphous calcium phosphate. *Clin Oral Investig.* 2014;18:783-792.
- [104] Marovic D, Tarle Z, Hiller KA, Müller R, Rosentritt M, Skrtic D, Schmalz G. Reinforcement of experimental composite materials based on amorphous calcium phosphate with inert fillers. *Dent Mater* 2014;30:1052-1060.
- [105] Marovic D, Sariri K, Demoli N, Ristic M, Hiller KA, Skrtic D, Rosentritt M, Schmalz G, Tarle Z. Remineralizing amorphous calcium phosphate based composite resins: the influence of inert fillers on monomer conversion, polymerization shrinkage, and microhardness. *Croat Med J* 2016;57:465-473.
- [106] Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263–271.
- [107] Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-294.
- [108] Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005;32:7-15.
- [109] Martín-Cameán A, Jos A, Cameán AM, Solano E, Iglesias-Linares A. Genotoxic and cytotoxic effects and gene expression changes induced by fixed orthodontic appliances in oral mucosa cells of patients: a systematic review. *Toxicol Mech Methods* 2015;25:440-447.
- [110] Mathisen GH, Ansteinsson V, Samuelsen JT, Becher R, Dahl JE, Bølling AK.

TEGDMA and filler particles from dental composites additively attenuate LPS-induced cytokine release from the macrophage cell line RAW 264.7. *Clin Oral Investig* 2015;19:61-69.

- [111] Matinlinna JP, Lassila LV, Vallittu PK. The effect of five silane coupling agents on the bond strength of a luting cement to a silica-coated titanium. *Dent Mater* 2007;23:1173-1180.
- [112] Matsui S, Umezaki E, Komazawa D, Otsuka Y, Suda N. Evaluation of mechanical properties of esthetic brackets. *J Dent Biomech* 2015;6:1758736015574401.
- [113] Mayworm CD, Camargo SS Jr, Bastian FL. Influence of artificial saliva on abrasive wear and microhardness of dental composites filled with nanoparticles. *J Dent* 2008;36:703-10.
- [114] McCourt JW, Cooley RL, Barnwell S. Bond strength of light-cure fluoride-releasing base-liners as orthodontic bracket adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;100:47-52.
- [115] Mehulić K, ur. *Dentalni materijali*. Zagreb: Medicinska naklada; 2017, str. 98-103.
- [116] Mei L, Busscher HJ, van der Mei HC, Chen Y, de Vries J, Ren Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. *Eur J Oral Sci* 2009;117:419-426.
- [117] Miguel JA, Almeida MA, Chevitarese O. Clinical comparison between a glass ionomer cement and a composite for direct bonding of orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;107:484-487.
- [118] Moreira MR, Matos LG, de Souza ID, Brigante TA, Queiroz ME, Romano FL, Nelson-Filho P, Matsumoto MA. Bisphenol A release from orthodontic adhesives measured in vitro and in vivo with gas chromatography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2017;151:477-483.
- [119] Nair SB, Jhala DD, Chinoy NJ. Mitigation of genotoxic effects of fluoride and arsenic by ascorbic acid in human lymphocyte cultures. *Fluoride* 2004;37:249-256.
- [120] Niepraschk M, Rahiotis C, Bradley TG, Eliades T, Eliades G. Effect of various curing lights on the degree of cure of orthodontic adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;132:382-384.
- [121] Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Guideline for

- the testing of chemicals. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Dostupno na: <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>. Pristupljeno 1.9.2017.
- [122] Øgaard B. Prevalence of white spot lesions in 19-year-olds: a study on untreated and orthodontically treated persons 5 years after treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1989;96:423-427.
- [123] Øgaard B, Larsson E, Henriksson T, Birkhed D, Bishara SE. Effects of combined application of antimicrobial and fluoride varnishes in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:28-35.
- [124] Øgaard B, Alm AA, Larsson E, Adolfsson U. A prospective, randomized clinical study on the effects of an amine fluoride/stannous fluoride toothpaste/mouthrinse on plaque, gingivitis and initial caries lesion development in orthodontic patients. *Eur J Orthod* 2006;28:8-12.
- [125] Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology *Toxicol Sci.* 2011;119:3-19.
- [126] Papakonstantinou AE, Eliades T, Cellesi F, Watts DC, Silikas N. Evaluation of UDMA's potential as a substitute for Bis-GMA in orthodontic adhesives. *Dent Mater* 2013;29:898-905.
- [127] Petoumenou E, Arndt M, Keilig L, Reimann S, Hoederath H, Eliades T, Jäger A, Bourauel C. Nickel concentration in the saliva of patients with nickel-titanium orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:59-65.
- [128] Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997;105:97-116.
- [129] Proffit WR, Fields Jr. HW, Moray LJ. Prevalence of malocclusion and orthodontic treatment need in the United States: estimates from the NHANES III survey. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 1998;13:97-106.
- [130] Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Ortodoncija*. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2010, str. 3–23, 41.
- [131] Pseiner BC, Freudenthaler J, Jonke E, Bantleon HP. Shear bond strength of fluoride-releasing orthodontic bonding and composite materials. *Eur J Orthod* 2010;32:268-273.
- [132] Rahiotis C, Patsouri K, Silikas N, Kakaboura A. Curing efficiency of high-intensity light-emitting diode (LED) devices. *J Oral Sci* 2010;52:187-195.
- [133] Rahiotis C. Degree of cure and monomer leaching from orthodontic adhesive

resins: in vitro and in vivo evidence. *Sem Orthod* 2010;16:266-273.

- [134] Raji SH, Banimostafae H, Hajizadeh F. Effects of fluoride release from orthodontic bonding materials on nanomechanical properties of the enamel around orthodontic brackets. *Dent Res J (Isfahan)* 2014;11:67-73.
- [135] Ramos JG, Varayoud J, Kass L, Rodríguez H, Costabel L, Muñoz-De-Toro M, Luque EH. Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 2003;144:3206-3215.
- [136] Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation--a potential public health threat? *Clin Oral Investig* 2014;18:1711-1718.
- [137] Ribeiro DA. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:251-256.
- [138] Roberts-Harry D, Sandy J. Orthodontics. Part 1: Who needs orthodontics? *Br Dent J* 2003;195:433-437.
- [139] Rogers S, Chadwick B, Treasure E. Fluoride-containing orthodontic adhesives and decalcification in patients with fixed appliances: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:390-391.
- [140] Rosenthal JA. Qualitative descriptors of strength of association and effect size. *J Soc Serv Res* 1996;21:37-59.
- [141] Santos GP, Medeiros IS, Fellows CE, Muench A, Braga RR. Composite depth of cure obtained with QTH and LED units assessed by microhardness and micro-Raman spectroscopy. *Oper Dent* 2007;31:79-83.
- [142] Sarig R, Slon V, Abbas J, May H, Shpack N, Vardimon AD, HersHKovitz I. Malocclusion in early anatomically modern human: a reflection on the etiology of modern dental misalignment. *PLoS One* 2013;8:e80771.
- [143] Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent* 1994;22:S6-11.
- [144] Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 1998;106:696-706.
- [145] Schmalz G, Schuster U, Nuetzel K, Schweikl H. An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures. *J Endod* 1999;25:24-29.

- [146] Schmalz G. Materials science: biological aspects. *J Dent Res* 2002;81:660-663.
- [147] Schmalz G, Arenholt Bindslev D. Biocompatibility of dental materials. Berlin: Springer; 2009, str. 1-58.
- [148] Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001;80:1615-1620.
- [149] Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006;85:870-877.
- [150] Shaw WC, Meek SC, Jones DS. Nicknames, teasing, harassment and the salience of dental features among school children. *Br J Orthod* 1980;7:75-80.
- [151] Shimizu N, Shimura T, Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res* 2000;448:81-90.
- [152] Shin MA, Drummond JL. Evaluation of chemical and mechanical properties of dental composites. *J Biomed Mater Res* 1999;48:540-545.
- [153] Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2002;23:1819–1829.
- [154] Sideridou ID; Karabela, MM. Effect of the amount of 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane coupling agent on physical properties of dental resin nanocomposites. *Dent Mater* 2009;25:1315–1324.
- [155] Silva KG, Pedrini D, Delbem AC, Cannon M. Microhardness and fluoride release of restorative materials in different storage media. *Braz Dent J* 2007;18:309-313.
- [156] Silva MT. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* 2010;584:4491-4499.
- [157] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of organic compounds. Hoboken: John Wiley and Sons; 2005, str. 72-76.
- [158] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-191.
- [159] Sinha PK, Nanda RS, Duncanson MG Jr, Hosier MJ. In vitro evaluation of matrix-bound fluoride-releasing orthodontic bonding adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111:276-282.

- [160] Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED, Eidelman N. Dental composites based on hybrid and surface-modified amorphous calcium phosphates. *Biomaterials* 2004;25:1141-1150.
- [161] Skrtic D, Antonucci JM. Bioactive polymeric composites for tooth mineral regeneration: physicochemical and cellular aspects. *J Funct Biomater* 2011;2:271-307.
- [162] Söderholm KJM. Degradation of glass filler in dental composites. *J Dent Res* 1981;60:1867-1875.
- [163] Söderholm KJM, Yang MC, Garcea I. Filler particle leachability of experimental dental composites. *Eur J Oral Sci* 2000;108:555-560.
- [164] Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;7-15.
- [165] Stoddart MJ, ur. *Mammalian cell viability: methods and protocol*. New York: Springer, 2011; str. 103-114.
- [166] Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod* 2001;23:475-484.
- [167] Summitt JB, Robbins JW, Schwartz RS, ur. *Fundamentals of operative dentistry: a contemporary approach*. Hanover Park: Quintessence Publishing, 2006; str. 2-4.
- [168] Sunitha C, Kailasam V, Padmanabhan S, Chitharanjan AB. Bisphenol A release from an orthodontic adhesive and its correlation with the degree of conversion on varying light-curing tip distances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;140:239-244.
- [169] Swift EJ Jr, Perdigão J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *Quintessence Int* 1995;26:95-110.
- [170] Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki CJ, Chojnacki J, Blasiak J. 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Mol Biol Rep* 2012;39:1561-1574.
- [171] Špalj S, Katalinić A, Varga S, Radica N. *Ortodontski priručnik*. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2012, str. 2-4.

- [172] Šutalo J, ur. Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva. Zagreb: Naklada Zadro; 1994, str. 150-152, 162-175.
- [173] Tadin A, Marovic D, Galic N, Milevoj A, Medvedec Mikic I, Zeljezic D. Genotoxic biomonitoring of flowable and non-flowable composite resins in peripheral blood leukocytes. *Acta Odontol Scand* 2013;71:923-929.
- [174] Tadin A. Citotoksični i genotoksični učinak suvremenih estetskih restaurativnih materijala na stanice pulpe i sluznice usne šupljine. Doktorski rad. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013.
- [175] Taha AA, Patel MP, Hill RG, Fleming PS. The effect of bioactive glasses on enamel remineralization: A systematic review. *J Dent* 2017;67:9-17.
- [176] Tassery H, Donato P, Barres O, Dejou J. In vitro assessment of polymerization procedures in class II restorations: Sealing, FTIR, and micro-hardness evaluations. *J Adhes Dent* 2001;3:247–255.
- [177] Tausche E, Luck O, Harzer W. Prevalence of malocclusions in the early mixed dentition and orthodontic treatment need. *Eur J Orthod* 2004;26:237-244.
- [178] Theilig C, Tegtmeier Y, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes. *J Biomed Mater Res* 2000, 53, 632-639.
- [179] Torlakovic L, Klepac-Ceraj V, Ogaard B, Cotton SL, Paster BJ, Olsen I. Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *J Oral Microbiol* 2012;4.
- [180] Torres-Gallegos I, Zavala-Alonso V, Patiño-Marín N, Martínez-Castañón GA, Anusavice K, Loyola-Rodríguez JP. Enamel roughness and depth profile after phosphoric acid etching of healthy and fluorotic enamel. *Aust Dent J* 2012;57:151-156.
- [181] Toy E, Yuksel S, Ozturk F, Karatas OH, Yalcin M. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the buccal epithelial cells of patients undergoing orthodontic treatment with three light-cured bonding composites by using micronucleus testing. *Korean J Orthod* 2014;44:128-135.
- [182] Turpin DL Need and demand for orthodontic services: the final report. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:151-152.
- [183] Tzou S, James D. Transbond™ plus color change adhesive: on demand convenience with fluoride release, moisture tolerance and color change features.

Orthod Perspect XIV 2007;1:21-23.

- [184] Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials* 2010;31:2010-2014.
- [185] Utani K, Kohno Y, Okamoto A, Shimizu N. Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS One* 2010;5:e10089.
- [186] Uysal T, Basciftci FA, Sener Y, Botsali MS, Demir A. Conventional and high intensity halogen light effects on water sorption and microhardness of orthodontic adhesives. *Angle Orthod* 2008;78:134-139.
- [187] Wahl N. Orthodontics in 3 millennia. Chapter 2: entering the modern era. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;127:510-515.
- [188] Walton D, Lorimer P. *Polymers*. New York: Oxford University Press; 2000. str. 1–91.
- [189] Wataha JC. Principles of biocompatibility. U: Brantley W, Eliades T, ur. *Orthodontic materials*. Stuttgart-New York: Thieme; 2001, str. 271-286.
- [190] Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JA, Medina-Silva R. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res* 2008;7:1259-1266.
- [191] Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 2007;23:343-362.
- [192] Williams DF. *Definitions in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier; 1987.
- [193] Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29:2941-2953.
- [194] Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009;30:5897-5909.
- [195] Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials* 2014;35:10009-10014.
- [196] Wright AB, Lee RT, Lynch E, Young KA. Clinical and microbiologic evaluation of a resin modified glass ionomer cement for orthodontic bonding. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996;110:469-475.
- [197] Yang SY, Kim SH, Choi SY, Kim KM. Acid neutralizing ability and shear bond strength using orthodontic adhesives containing three different types of bioactive

glass. Materials (Basel) 2016;9:125.

- [198] Yap AU, Tan SH, Wee SS, Lee CW, Lim EL, Zeng KY. Chemical degradation of composite restoratives. J Oral Rehabil 2001;28:1015-1021.
- [199] Yengopal V, Mickenautsch S. Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a meta-analysis. Acta Odontol Scand 2009;67:321-332.
- [200] Yoon TH, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Degree of polymerization of resin composites by different light sources. J Oral Rehabil 2002; 29:1165-1173.
- [201] Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. J Biomed Mater Res. 1997;37:517-524.
- [202] Želježić D. Komet-test i primarna oštećenja genetičkog materijala u kliničkoj primjeni. U: Sertić J, ur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2015, str. 655-669.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Estetika zubi prije i poslije ortodontske terapije.

Slika 2. Fiksna naprava edgewise tipa s a) metalnim i b) keramičkim bravicama.

Slika 3. Bijele mrljaste lezije zuba.

Slika 4. Kemijska struktura monomera Bis-GMA, TEGDMA i UDMA. Preuzeto iz reference [12].

Slika 5. Prikaz dvaju nukleoida limfocita. (A) stanica bez genomskih oštećenja, (B) stanica s oštećenjima DNA, uz prikaz dužine glave i repa.

Slika 6. Oštećenja DNA koja se mogu otkriti komet testom: a) jednolančani i dvolančani lom, b) mjesta osjetljiva na lužnate uvjete koja se pri $\text{pH} > 13$ prevode u lomove DNK.

Slika 7. Citohalazinom B blokirani mikronukleus test, izgled stanica pod optičkim mikroskopom. Jezgrine anomalije u binuklearnim limfocitima: a) mikonukleus (gornja stanica), b) most, c) pup.

Slika 8. Položaj lampe neposredno prije osvjetljavanja uzoraka.

Slika 9. Analiza površina vrpce C=C veza i benzena na nepolimeriziranim (gore) i polimeriziranim (dolje) uzorcima u programu OPUS (Bruker Corporation, Billerica, SAD). Superponirane su vrpce za deset uzoraka. Vidljivo je smanjenje u površinama vrpca C=C veza kod polimeriziranih uzoraka, dok su površine vrpce benzene ostale jednake.

Slika 10. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih kompozita pri 10 sekundi osvjetljavanja

Slika 11. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih kompozita pri 20 sekundi osvjetljavanja.

Slika 12. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih adheziva pri 10 sekundi osvjetljavanja.

Slika 13. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih skupina adheziva pri 20 sekundi osvjetljavanja.

Slika 14. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih kombinacija kompozita i adheziva pri 10 sekundi osvjetljavanja.

Slika 15. Razdioba stupnja konverzije (DC) između ispitivanih skupina kombinacija kompozita i adheziva pri 20 sekundi osvjetljavanja.

Slika 16. Usporedba stupnja konverzije (DC) kompozita osvjetljivanih 10 i 20 sekundi.

Slika 17. Usporedba stupnja konverzije (DC) adheziva osvjetljivanih 10 i 20 sekundi.

Slika 18. Usporedba stupnja konverzije (DC) kombinacija kompozita i adheziva osvjetljivanih 10 i 20 sekundi.

Slika 19. Usporedba stupnja konverzije (DC) između kompozita i kombinacija osvjetljivanih 10 sekundi.

Slika 20. Usporedba stupnja konverzije (DC) između kompozita i kombinacija osvjetljivanih 20 sekundi.

Slika 21. Razdioba mikrotvrdoće (μH) prije uranjanja, unutar istoga materijala, između osvjetljavanja od 10 i 20 sekundi.

Slika 22. Razdioba mikrotvrdoće (μH) poslije uranjanja, unutar istoga materijala, između osvjetljavanja od 10 i 20 sekundi.

Slika 23. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) prije uranjanja za kombinacije u oba vremena osvjetljavanja.

Slika 24. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) prije uranjanja za kombinacije osvjetljivane 10 sekundi.

Slika 25. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) prije uranjanja za kombinacije osvjetljivane 20 sekundi.

Slika 26. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) poslije uranjanja za kombinacije osvjetljivane 10 sekundi.

Slika 27. Korelacija stupnja konverzije (DC) i mikrotvrdoće (μH) poslije uranjanja za kombinacije osvjetljivane 20 sekundi.

Slika 28. Korelacija prosječnog stupnja konverzije (DC) s promjenom mikrotvrdoće (μH).

Slika 29. Korelacija prosječnog stupnja konverzije (DC) i proporcije binuklearnih stanica s mikronukleusom (BN s MN) za sve kombinacije kompozita i adheziva.

Slika 30. Korelacija prosječnoga stupnja konverzije (DC) i proporcije binuklearnih stanica s mikronukleusom (BN s MN) za kombinacije kompozita i adheziva osvijetljavane 10 sekundi.

Popis tablica

Tablica 1. Kompoziti i adhezivi korišteni u istraživanju (prema deklaraciji proizvođača)

Tablica 2. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije (DC) s naznačenim značajnim razlikama između kompozita pri 10 sekundi osvjetljavanja

Tablica 3. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije (DC) s naznačenim značajnim razlikama između kompozita pri 20 sekundi osvjetljavanja

Tablica 4. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije (DC) s naznačenim značajnim razlikama između adheziva pri 10 sekundi osvjetljavanja

Tablica 5. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije (DC) s naznačenim značajnim razlikama između adheziva pri 20 sekundi osvjetljavanja

Tablica 6. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije (DC) s naznačenim značajnim razlikama između kombinacija kompozita i adheziva pri 10 sekundi osvjetljavanja

Tablica 7. Deskriptivna statistika za stupanj konverzije (DC) s naznačenim značajnim razlikama između kombinacija kompozita i adheziva pri 20 sekundi osvjetljavanja

Tablica 8. Razlike u stupnju konverzije (DC) između ACP40 i Sr70

Tablica 9. Deskriptivna statistika za mikrotvrdoću (μH) kombinacija osvjetljivanih 10 sekundi prije i poslije uranjanja u umjetnu slin

Tablica 10. Deskriptivna statistika za mikrotvrdoću (μH) kombinacija osvjetljivanih 20 sekundi prije i poslije

Tablica 11. Indeks diobe jezgara za pozitivnu i negativnu kontrolu te sve ispitivane materijale obzirom na vrijeme osvjetljavanja

Tablica 12. Rezultati citohalazinom B blokiranog mikronukleus testa za pozitivnu i negativnu kontrolu

Tablica 13. Broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom ili nukleoplazmatskim mostom na 2000 pregledanih binuklearnih stanica po materijalu

Tablica 14. Broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom, odnosno nukleoplazmatskim mostom na 2000 pregledanih binuklearnih stanica po kompozitu

Tablica 15. Broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom, odnosno nukleoplazmatskim mostom na 2000 pregledanih binuklearnih stanica po adhezivu

Tablica 16. Broj stanica s mikronukleusom, jezgrinim pupom, odnosno nukleoplazmatskim mostom na 2000 pregledanih binuklearnih stanica po kombinaciji kompozita i adheziva

Tablica 17. Deskriptivna statistika za broj binuklearnih stanica s mikronukleusom kod svih materijala nakon 10 i 20 sekundi osvjetljavanja

Tablica 18. Deskriptivna statistika za broj binuklearnih stanica s pupom kod svih materijala nakon 10 i 20 sekundi osvjetljavanja uz naznačene značajne razlike

Tablica 19. Deskriptivna statistika za binuklearne stanice s nukleoplazmatskim mostom kod svih materijala nakon 10 i 20 sekundi

Tablica 20. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom uz naznačene razlike između kompozita osvjetljivanih 10 sekundi

Tablica 21. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom kod kompozita osvjetljivanih 20 sekundi

Tablica 22. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom kod adheziva osvjetljivanih 10 sekundi

Tablica 23. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom uz naznačene razlike između adheziva osvjetljivanih 20 sekundi

Tablica 24. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom uz naznačene razlike između kombinacija kompozita i adheziva osvjetljivanih 10 sekundi

Tablica 25. Razdioba frekvencija binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom uz naznačene razlike između kombinacija kompozita i adheziva osvjetljivanih 20 sekundi

Tablica 26. Razlike u frekvenciji binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom između kompozita i kombinacije istog kompozita s odgovarajućim adhezivom pri 10 sekundi osvjetljavanja

Tablica 27. Razlike u frekvenciji binuklearnih stanica s mikronukleusom i binuklearnih stanica s pupom između kompozita i kombinacije istoga kompozita s odgovarajućim adhezivom pri 20 sekundi osvjetljavanja

Tablica 28. Razlike u broju mikronukleusa u stanicama s mikronukleusima između kompozita i negativne kontrole u oba vremena osvjetljavanja

Tablica 29. Razlike u broju mikronukleusa u stanicama s mikronukleusima između adheziva i negativne kontrole u oba vremena osvjetljavanja

Tablica 30. Razlike u broju mikronukleusa u stanicama s mikronukleusima između kombinacija i negativne kontrole u oba vremena osvjetljavanja

Tablica 31. Razlike u broju binuklearnih stanica s mikronukleusima između eksperimentalnih kompozita ACP40 i Sr70

Tablica 32. Pearsonove korelacije prosječnog stupnja konverzije (DC) s proporcijom binuklearnih stanica s mikronukleusom te prosječnog stupnja konverzije s proporcijom binuklearnih stanica s pupom

Tablica 33. Rezultati logističke regresije za prisustvo binuklearnih stanica s pupom

Tablica 34. Rezultati logističke regresije za prisustvo binuklearnih stanica s pupom uz kontrolu ostalih varijabli

Tablica 35. Razlike u rezultatima komet testa između pozitivne i negativne kontrole

POPIS POKRATA

μH	mikrotvrdoća
25 Q-75 Q	interkvartilni raspon
4E	etil-4- (dimetilamino) benzoat
95% CI	95% interval pouzdanosti
ACP	amorfni kalcijev fosfat
ACP40	eksperimentalni kompozit s 40% masenim udjelom ACP
ACP40 komb	adhezivni sustav koji se sastoji od eksperimentalnog kompozita s 40% masenim udjelom ACP i adheziva Transbond XT
ATR	tehnika prigušene totalne refleksije
Bis-EMA	etoksilirani bisfenol-A-glicidil-dimetakrilat
Bis-GMA	bisfenol-A-glicidil-dimetakrilat
BN s MN	binuklearna stanica s mikronukleusom
BN s NB	binuklearna stanica s pupom
BN s NPB	binuklearna stanica s mostom
CBPI	indeks diobe jezgara
CQ	kamforkinon
DC	stupanj konverzije
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EMS	etilmetanosulfonat
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
FTIR spektroskopija	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
GS	kompozit Geristore
GS komb	adhezivni sustav koji se sastoji od kompozita Geristore i adheziva Tenure
HEMA	hidroksietil-metakrilat
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju
LB	kompozit Light Bond
LB bond	adheziv Light Bond Sealant
LB komb	adhezivni sustav koji se sastoji od kompozita Light Bond i adheziva Light Bond Sealant

LBF	kompozit Light Bond s fluoridom
LBF bond	adheziv Light Bond Sealant s fluoridom
LBF komb	adhezivni sustav koji se sastoji od kompozita Light Bond s fluoridom i adheziva Light Bond Sealant s fluoridom
LED	visoko sjajne svjetleće diode
LMP	nisko talište
MAA	metakrilna kiselina
MEP	metakriloksietil-ftalat
NMP	normalno talište
PBS	otopina fosfatnog pufera
PEGDMA	polietilenglikol-dimetakrilat
RDB	udio dvostrukih veza preostalih u uzorku nakon konverzije
REACH	Uredba Europskog parlamenta i Vijeća 1907/2006 o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija
SBS	posmična čvrstoća veze
SD	standardna devijacija
Sr70	eksperimentalni kompozit sa 70% masenim udjelom stroncijevog stakla
Sr70 komb	adhezivni sustav koji se sastoji od eksperimentalnog kompozita sa 70% masenim udjelom stroncijevog stakla i adheziva Transbond XT
TB+	kompozit Transbond Plus
TB+ komb	adhezivni sustav koji se sastoji od kompozita Transbond Plus i adheziva Transbond XT Primer
TBXT	kompozit Transbond XT
TBXT bond	adheziv Transbond XT Primer
TBXT komb	adhezivni sustav koji se sastoji od kompozita Transbond XT i adheziva Transbond XT Primer
TEGDMA	trietilen-glikol-dimetakrilat
UDMA	uretan-dimetakrilat

ŽIVOTOPIS

OSOBNOSTNE OBAVIJESTI

Ime	Magda Trinajstić Zrinski
Adresa	Vatroslava Lisinskoga 2, HR-51000 Rijeka
Telefon	+385 51 345 638
Faks	+385 51 345 630
E-pošta	magda.zrinski@medri.uniri.hr
Matični broj iz Upisnika znanstvenika	339951
OIB	91568251752
Nacionalnost	hrvatska
Državljanstvo	hrvatsko
Datum rođenja	20. rujna 1987.
Obiteljski status	udana, suprug Kristijan, kći Petra (2015.)

RADNO ISKUSTVO

• Datum (od – do)	Od 2013. do danas
• Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja	Katedra za ortodonciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Krešimirova 40, Rijeka
• Vrsta posla ili područje	suradnik u nastavi
• Zanimanje i položaj koji obnaša	asistent
• Osnovne aktivnosti i odgovornosti	sudjelovanje u nastavi na predmetima Antropometrija i kefalometrija, Dentalna fotografija, Dentalno javno zdravstvo, Uvod u dentalnu medicinu, Pretklinička ortodoncija,

Klinička ortodoncija, Interdisciplinarna ortodoncija.
znanstveni rad u području ortodoncije.

- Datum (od – do) Od 2012. do 2013.
- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja Ordinacija dentalne medicine Marina Zrinski Mlacović, dr. med. dent.
- Vrsta posla ili područje ordinacija polivalentne dentalne medicine
- Zanimanje i položaj koji obnaša doktorica dentalne medicine
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti pripravnički staž

ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

- Datum (od – do) Od 2006. do 2011.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- Osnovni predmet Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni /zanimanje studij Dentalna medicina
- Naslov postignut doktorica dentalne medicine obrazovanjem
- Stupanj nacionalne kvalifikacije (ako postoji) VSS
- Datum (od – do) Od 2002. do 2006.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci
- Osnovni predmet opći smjer /zanimanje

- Naslov postignut obrazovanjem
- Stupanj nacionalne kvalifikacije (ako postoji) SSS
- Datum (od – do) Od 2004. do 2005.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Bedgebury School, Kent TN17 2SH (Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Osnovni predmet /zanimanje komunikologija, umjetnost, povijest, kemija
- Naslov postignut obrazovanjem
- Stupanj nacionalne kvalifikacije (ako postoji) Advanced Subsidiary (AS) Level
- Datum (od – do) Od 30. srpnja do 10. kolovoza 2012.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Odjel za parodontologiju, Sveučilišna bolnica Sveučilišta u Heidelbergu (Njemačka)
- Osnovni predmet /zanimanje Međunarodna ljetna škola parodontologije i implantologije
- Naslov postignut obrazovanjem
- Stupanj nacionalne kvalifikacije (ako postoji)

OSOBNOSTNE VJEŠTINE I
SPOSOBNOSTI

*Stecene radom/životom,
karijerom, a koje nisu
potkrijepljene potvrdama i
diplomama.*

MATERINJI JEZIK hrvatski

DRUGI JEZICI

engleski

- | | | |
|-------------------------------------|----|------------------|
| • sposobnost čitanja | C2 | iskusni korisnik |
| • sposobnost pisanja | C2 | iskusni korisnik |
| • sposobnost usmenog
izražavanja | C2 | iskusni korisnik |

talijanski

- | | | |
|-------------------------------------|----|------------------|
| • sposobnost čitanja | C2 | iskusni korisnik |
| • sposobnost pisanja | C1 | iskusni korisnik |
| • sposobnost usmenog
izražavanja | C1 | iskusni korisnik |

francuski

- | | | |
|-------------------------------------|----|----------|
| • sposobnost čitanja | A2 | početnik |
| • sposobnost pisanja | A1 | početnik |
| • sposobnost usmenog
izražavanja | A1 | početnik |

SOCIJALNE VJEŠTINE I
SPOSOBNOSTI

- stipendistica Foruma za slobodu odgoja u školskoj
godini 2004./2005;

Življenje i rad s drugim ljudima u višekulturnim okolinama gdje je značajna komunikacija, gdje je timski rad osnova (npr. u kulturnim ili sportskim aktivnostima).

- britanski certifikat AS razine iz komunikologije; iskustvo adaptacije na nove i višekulturalne sredine stečeno pohađanjem škole u Ujedinjenom Kraljevstvu;
- usavršavanje na poslovima prijave i menadžmenta projekata financiranih iz fondova EU u okviru Programa za cjeloživotno učenje – Leonardo da Vinci, projekta ICroME, Venice International University u Veneciji, lipanj 2014.
- u sklopu Erasmus stipendije za mobilnost nastavnog osoblja u akademskoj godini 2016./2017. boravila na Odjelu za ortodonciju Sveučilišta u Trstu, rujan 2017.

Sudjelovanje u znanstvenim projektima

- od 2013. do 2017.- istraživač na projektu „Prediktivni čimbenici uspjeha ortodontske terapije u djece i adolescenata“ (13.06.2.1.53), glavnog istraživača Stjepana Špalja pri Sveučilištu u Rijeci
- od 2016. istraživač na projektu „Imunosne i regenerativne implikacije korozije dentalnih materijala u djece i adolescenata“ glavnog istraživača Stjepana Špalja, pri Hrvatskoj zakladi za znanost
- od 2018. istraživač na projektu „Bioaktivni dentalni materijali – modulacija aktivne matrice radi unapređenja kliničke učinkovitosti i redukcije oštećenja DNK“ (18.07.2.2.03.) glavnog istraživača Višnje Katić

Članstvo u strukovnim udruženjima:

- Hrvatska komora dentalne medicine (od 2013.)
- European Orthodontic Society (od 2013.)

ORGANIZACIJSKE
VJEŠTINE I

SPOSOBNOSTI

*Npr. koordinacija i
upravljanje osobljem,
projektima, financijama;
na poslu, u dragovoljnom
radu (npr. u kulturi i
športu) i kod kuće, itd.*

- volontiranje na 9. svjetskom bioetičkom kongresu u
Rijeci, rujan 2008.

-sudionik organizacije tečajeva trajnog usavršavanja
i Međunarodne ljetne škole ortodoncije Sveučilišta u
Rijeci

TEHNIČKE VJEŠTINE I
SPOSOBNOSTI

*S računalima, posebnim
vrstama opreme,
strojeva, itd.*

Rad na računalu, korisnička programska podrška
(MS Office, Corel Draw, Last 2000, AudaxCeph,
Moodle), programska podrška za statistiku
(StatSoft, SPSS)

Rukovanje rtg-rvg sustavom Carestream, strojna
obrada korijenskih kanala sustavom Reciproc,
rukovanje sustavom ortodontskih miniimplantata
Forestadent

UMJETNIČKE
VJEŠTINE I

SPOSOBNOSTI

*Glazba, pisanje, dizajn,
itd.*

sviranje gitare, fotografija

DRUGE VJEŠTINE I
SPOSOBNOSTI

*Sposobnosti koje nisu
gore navedene.*

Nagrade i priznanja:

- dekanove nagrade najboljoj studentici studija
dentalne medicine 2007., 2008. i 2009. godine
- izabrana na natječaju MZOŠ za 20 najboljih
kandidata za asistenta na razini Hrvatske 2013.
godine

- nagrada za najbolju mladu znanstvenicu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci 2015. godine u kategoriji kliničkih medicinskih znanosti, dentalne medicine i javnog zdravstva

VOZAČKA DOZVOLA

B kategorija

DODATNE OBAVIJESTI

Autorica/koautorica 11 znanstvenih radova u časopisima indeksiranim u bazi CC

POPIS RADOVA

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima indeksiranim u bazi CC (10)

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u časopisima indeksiranim u bazi CC (1)

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u časopisima indeksiranim u bazi SCIE (1)

Sažeci u zbornicima i časopisima (9)

Druga sudjelovanja na skupovima (6)

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima indeksiranim u bazi CC

1. Manevska I, Pavlic A, Katic V, **Trinajstic Zrinski M**, Drevensek M, Spalj S. Satisfaction with facial profile aesthetics: are norms overrated? Int J Oral Maxillofac Surg 2018;47:72-78.
2. Varga S, Spalj S, Anic Milosevic S, Lapter Varga M, Mestrovic S, **Trinajstic Zrinski M**, Slaj M. Changes of bite force and occlusal contacts in the retention phase of orthodontic treatment: A controlled clinical trial. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2017;152:767-777.
3. Pavlic A, **Trinajstic Zrinski M**, Katic V, Spalj S. Neoclassical canons of facial beauty: Do we see the deviations? J Craniomaxillofac Surg 2017;45:741-747.
4. Katalinic A, **Trinajstic Zrinski M**, Roksandic Vrancic Z, Spalj S. Influence of manual screwdriver design in combination with and without predrilling on insertion torque of orthodontic mini-implants. Implant Dent 2017;26:95-100.
5. Spalj S, Novsak A, Bilobrk P, Katic V, **Trinajstic Zrinski M**, Pavlic A. Mediation and moderation effect of the big five personality traits on the relationship between self-perceived malocclusion and psychosocial impact of dental esthetics. Angle Orthod 2016;86:413-420.
6. Gavric A, Mirceta D, Jakobovic M, Pavlic A, **Trinajstic Zrinski M**, Spalj S. Craniodentofacial characteristics, dental esthetics-related quality of life, and self-esteem. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2015;147:711-718.

7. Novsak D, **Trinajstic Zrinski M**, Spalj S. Machine-driven versus manual insertion mode: influence on primary stability of orthodontic mini-implants. *Implant Dent* 2015;24:31-36.
8. Lukez A, Pavlic A, **Trinajstic Zrinski M**, Spalj S. The unique contribution of elements of smile aesthetics to psychosocial well-being. *J Oral Rehabil* 2015;42:275-281.
9. Spalj S, Peric D, **Mlacovic-Zrinski M**, Bulj M, Plancak D. Predictive value of dental readiness and psychological dimensions for oral health-related quality of life in Croatian soldiers: a cross-sectional study. *Croat Med J* 2012;53:461-469.
10. Spalj S, **Mlacovic-Zrinski M**, Tudor Spalj V, Ivankovic Buljan Z. In-vitro assessment of oxidative stress generated by orthodontic archwires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;141:583-589.

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u časopisima indeksiranim u bazi CC

1. **Trinajstic Zrinski M**, Miljanic S, Peros K, Turco G, Contardo L, Spalj S. Fluoride release and recharge potential of remineralizing orthodontic adhesive systems. *Fluoride* 2018; prihvaćen za objavljivanje

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u časopisima indeksiranim u bazi SCIE

1. Popovic Z, **Trinajstic Zrinski M**, Spalj S. Orthodontists' clinical experience is the most significant predictor of retention protocol – a survey from Croatia. *Acta Clinica Croatica* 2018; prihvaćen za objavljivanje

Sažeci u zbornicima i časopisima

1. Katić V, Rinčić Mlinarić M, **Trinajstić Zrinski M**, Pavlić A, Špalj S. Working properties of nickel-titanium archwires after corrosion in oral antiseptics and

saliva. European Journal of Orthodontics Book of Abstracts Edinburgh, Velika Britanija, 2018. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

2. Špalj S, **Trinajstić Zrinski M**, Peroš K, Turco G, Contardo L. Fluoride release potential of bioactive orthodontic adhesive systems. European Journal of Orthodontics Book of Abstracts Stockholm, Švedska, 2016. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
3. Pavlić A, Katić V, **Trinajstić Zrinski M**, Špalj S. Neoclassical canons in today's faces of adolescents and young adults and potential psychosocial repercussions of deviations from canons. European Journal of Orthodontics Book of Abstracts Venecija, Italija, 2015. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. **Trinajstić Zrinski M**, Miljanic S, Marović D, Želježić D, Špalj S. Orthodontic adhesives of new formulation – investigation of polymerisation rate and biocompatibility. European Journal of Orthodontics Book of Abstracts Venecija, Italija, 2015. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
5. Mišković I, Muhvić Urek M, Glažar I, **Mlacović-Zrinski M**, Prpić J, Kuiš D, Pezelj-Ribarić S. Soft laser, chewing gum and citric acid effects on salivation. Journal of Dental Research Book of Abstracts Dubrovnik, Hrvatska, 2014. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
6. Pavlić A, **Mlacović-Zrinski M**, Katić V, Špalj S. Do personality traits mediate the relationship between craniodentofacial features and self- esteem? European Journal of Orthodontics Book of Abstracts Varšava, Poljska, 2014. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
7. **Mlacović-Zrinski M**, Pavlić A, Katić V, Špalj S. Do personality traits affect the relationship between malocclusion and the psychosocial impact of dental aesthetics? European Journal of Orthodontics Book of Abstracts Varšava, Poljska, 2014. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
8. Katić V, **Mlacović-Zrinski M**, Pavlić A, Špalj S. Orthognathic quality of life, craniodentofacial characteristics and personality traits. European Journal of

Orthodontics Book of Abstracts Varšava, Poljska, 2014. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

9. **Mlacović-Zrinski M**, Špalj S, Ivanković Buljan Z, Mady Maričić B. In vitro oxidative stress induced by orthodontic archwires. Book of Abstracts, American Association of Orthodontists. Honolulu, Hawaii, SAD, 2012. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Druga sudjelovanja na skupovima

1. Pavlić A, **Trinajstić Zrinski M**, Katić V, Špalj S. Association of malocclusion with body image, self-esteem and quality of life. Drugi međunarodni kongres Hrvatskog ortodontskog društva Zagreb, Hrvatska, 2016. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
2. **Trinajstić Zrinski M**, Miljanić S, Špalj S. Polymerisation rate of various orthodontic adhesive systems in relation to curing time. 12th National Congress Italian Academy of Orthodontics Rim, Italija, 2015. (poster, međunarodna recenzija, neobjavljeni rad, znanstveni)
3. Špalj S, Šlaj M, Pavlić A, **Trinajstić Zrinski M**, Katić V, Roksandić Vrančić Z. Validity and reliability of the Croatian version of the Child Perception Questionnaire 11-14. 1. međunarodni kongres Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu Zagreb, Hrvatska, 2015. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
4. **Mlacović-Zrinski, M**. Usne i estetika osmijeha. Estetika osmijeha: analiza problema i vizualizacija rješenja Rijeka, Hrvatska, 2014. (predavanje, neobjavljeni rad, pp prezentacija, stručni)
5. Lukež A, Pavlić A, **Mlacović-Zrinski M**, Špalj S. Unique contribution of elements of smile esthetics to psychosocial well-being. 4th virtual world dental congress of dental students Zagreb, Hrvatska, 2014. (predavanje, međunarodna recenzija, pp prezentacija, znanstveni)

6. Popović Z, **Mlacović-Zrinski M**, Špalj S. Razlike u retencijskim protokolima ortodonata u Hrvatskoj. Kongres studenata dentalne medicine s međunarodnim sudjelovanjem Rijeka, Hrvatska, 2013. (predavanje, domaća recenzija, pp prezentacija, znanstveni)