

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Zorana Ivanković Buljan

**KONVENCIONALNE I SAMOLIGIRAJUĆE
ORTODONTSKE BRAVICE KAO IZVOR
OKSIDACIJSKOG STRESA *IN VITRO***

Doktorski rad

Rijeka, 2011.

Mentor rada: doc. dr. sc. Stjepan Špalj, dr. med. dent., spec. ortodont

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

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Ovaj rad je izrađen na Katedri za dječju stomatologiju i ortodonciju te laboratorijima Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju i Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Rad je dio istraživačkih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske „Nove dijagnostičke metode u ortodonciji i biokompatibilnost naprava“ (065-0650444-0436) voditelja prof. dr. sc. Mladena Šlaja sa Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te „Biološki učinci stomatoloških materijala“ voditeljice prof. dr. sc. Sonje Pezelj Ribarić s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci 062-0650444-0442 objedinjenih u programu „Temeljna i primijenjena istraživanja oralnog zdravlja i stomatoloških materijala“ (0650444) voditelja prof. dr. sc. Ivice Anića sa Stomatološkog fakulteta u Zagrebu.

Zahvaljujem svome dragom mentoru doc. dr. sc. Stjepanu Špalju jer me inspirirao da sanjam više, učim više, nastojim više i postanem više.

Zahvaljujem i prof. dr. sc. Maji Abram za ustupanje prostora i korištenje potrebnih instrumenata i aparature Zavoda za mikrobiologiju te prof. dr. sc. Stipanu Jonjiću za angažiranje laboranata sa Zavoda za histologiju koji su mi pripomogli i podučili me u laboratorijskom dijelu ovog istraživanja.

Hvala mojoj asistentici Gordani Veron za organizaciju posla u ordinaciji i potporu tijekom mog poslijediplomskog i specijalističkog usavršavanja, i mojim pacijentima koji su morali trpjeti moje izbivanje.

Nadasve hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, potpori, toleranciji, razumijevanju i povjerenju koje imaju u mene. Bez njih ne bih sve ovo postigla. Ovaj Doktorat je za Njih.

Posvećujem svome ocu jer je uvijek slijedio svoje snove.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati razlike u stupnju oksidacijskog stresa koji izazivaju konvencionalne i samoligirajuće ortodontske bravice izrađene od različitih metalnih i estetskih materijala.

Materijal i metode: Mjerena je razina biljega oksidacijskog stresa 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina (8-OHdG) u DNA kulturi stanica mišjih fibroblasta L929 nakon *in vitro* izlaganja umjetnoj slini kontroliranog pH 6.75 ± 0.15 u koju su tijekom 30 dana bile potopljene bravice. Testirano je tri tipa konvencionalnih (*Mini Sprint*, *Quantum*, *Inspire Ice*) i četiri samoligirajućih bravica (*Speed*, *QuicKlear*, *In-Ovation C* i *Damon 3*). Tripansko modriilo je rabljeno za određivanje stanične vijabilnosti i promjena u broju stanica prije izlaganja i nakon njega.

Rezultati: Nisu pronađene statistički značajne razlike u staničnoj vijabilnosti između metalnih, keramičkih i polimernih bravica te samoligirajućih bravica načinjenih od kombinacije tih materijala no vijabilnost je bila značajno viša u usporedbi s pozitivnom kontrolom ($p < 0.05$). Safirne keramičke bravice (*Inspire Ice*) imale su visoku vijabilnost, najveći porast broja stanica i najniži stupanj oksidacijskog stresa. Višu koncentraciju biljega oksidacijskog stresa imale su potpuno metalne bravice (*Speed* i *MiniSprint*) i poliuretanske bravice (*Quantum*) u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0.05$).

Zaključak: Svi tipovi ortodontskih bravica, bez obzira na gradbeni material, izvor su oksidacijskog stresa *in vitro*, no najveći stres induciraju potpune metalne i poliuretanske bravice. Keramičke bravice pokazuju najviši stupanj biokompatibilnosti u usporedbi s polimernim i metalnim bravicama te onima načinjenima od kombinacije tih materijala.

Ključne riječi: Oksidacijski stres; Ortodontske bravice; Testovi genotoksičnosti; Testovi mutagenosti.

SUMMARY

Objectives: To investigate the differences in level of oxidative stress induced by the conventional and self-ligating brackets made of different metallic and aesthetic materials.

Material and methods: Concentration of oxidative stress marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in DNA of murine fibroblast cells L929 was assessed after in vitro exposure to artificial saliva of controlled pH 6.75 ± 0.15 in which during the 30 day period brackets were immersed. Three types of conventional (*Mini Sprint, Quantum, Inspire Ice*) and four types of self-ligating brackets (*Speed, QuicKlear, In-Ovation C i Damon 3*) were tested. To determine the viability and the changes in number of cells before and after exposure trypan blue dye was used.

Results: There was no significant difference in cell viability between metal, ceramic, polymeric brackets and self-ligating brackets made of combination of those materials, but viability was significantly higher compared to positive control ($p < 0.05$). Sapphire ceramic bracket (*Inspire Ice*) showed high viability, the largest increase in the number of cells and the lowest oxidative stress. A higher concentration of markers of oxidative stress was observed in the full metal brackets (*Speed* and *MiniSprint*) and the polyurethane brackets (*Quantum*) compared to negative control ($p < 0.05$).

Conclusion: All types of orthodontic brackets, regardless of the constituent materials are a source of oxidative stress in vitro, but the highest stress induce full metal and polyurethane brackets. Ceramic brackets show the highest degree of biocompatibility compared with polymeric and metal brackets, and those made from combinations of these materials.

Key words: Genotoxicity tests; Mutagenicity tests; Orthodontic brackets; Oxidative stress.

SADRŽAJ

1.	Uvod.....	1
1.1.	Oksidacijski stres.....	4
1.2.	Detekcija biljega oksidacijskog stresa.....	9
1.3.	Biokompatibilnost dentalnih materijala i ortodontskih naprava.....	14
2.	Cilj istraživanja.....	25
3.	Materijal i metode.....	27
3.1.	Materijal.....	28
3.2.	Metode.....	33
3.3.	Statistička obrada podataka.....	43
4.	Rezultati.....	44
5.	Rasprava.....	55
6.	Zaključak.....	66
7.	Literatura.....	68
	Popis skraćenica.....	79
	Životopis.....	80

1. UVOD

Ispravljanje nepravilnog položaja zubi i zagriža fiksnim ortodontskim napravama *edgewise* tipa danas je vrlo česta i u djece i u odraslih, a u prosjeku traje dvije do tri godine. Kako su naprave duže vremena pričvršćene na zube u ustima, vrlo je važno ispitati sve moguće učinke produženoga biološkog učinka njihovih gradbenih materijala na stanice, tkiva, organe i cijeli organizam (1). Ortodontski materijali i naprave mogu djelovati toksično i/ili kao alergeni izazivajući pritom odgođene reakcije preosjetljivosti (2). Mnoge sirovine koje se rabe u sintezi materijala za različite namjene testirane su već u proizvodnji te ih proizvođači deklariraju kao biokompatibilne. Međutim, sirovina ili sastavni dio može se promijeniti procesom obrade ili pripreme, stoga je prijeko potrebno provoditi njihovo ispitivanja. (3). Dobra stanična i tkivna podnošljivost je presudna pri uporabi dentalnih materijala jer dolaze u izravni dodir sa živim tkivom (4).

Fiksne ortodontske naprave *edgewise* tipa sastoje se od bravica i cjevčica zalijepljenih za zube te povezanih žičanim lukom koji se za bravice pričvrste nekim ligirajućim sredstvom ili mehanizmom. Obično su izrađene od slitina koje sadrže metale željeza, kroma, molibdena i nikla. Konvencionalne *edgewise* bravice izrađene su od plemenitog čelika, a u novije vrijeme izrađuju se i estetske varijante od polikarbonatnih, poliuretanskih i polioksimetilenskih polimera, kompozitnih smola, aluminijoksidne i cirkonijoksidne keramike te umjetnog safira (5). Samoligirajuće bravice su u širu kliničku uporabu ušle posljednjih nekoliko godina, a u sebi imaju ugrađeni pasivni ili aktivni ligirajući element – kvačicu (engl. *clip*) koja se izrađuje od plemenitog čelika, legure nikal-titana ili kobalt-kroma, a radi poboljšanja estetike retinirajuća kvačica može biti obložena rodijem (6). Radi poboljšanja estetike, a zadržavanja mehaničkih svojstava, samoligirajuće ortodontske bravice izrađuju se u raznim kombinacijama navedenih metalnih i estetskih materijala. Biološki učinak takvih bravica sastavljenih od kombinacije raznih materijala još nije dovoljno istražen. Dosadašnja istraživanja samoligirajućih bravica temeljila su se na njihovu bimehaničkom učinku,

ekonomičnosti, efikasnosti i stabilnosti rezultata, privlačnosti njihova izgleda i prihvaćenosti od pacijenata (7, 8).

Usna šupljina je dinamično mjesto, a slina dinamični medij sklon promjeni pH u ovisnosti o prehrani. Njihova fiziološka, toplinska, mikrobiološka i biokemijska svojstva pružaju idealno okruženje za biodegradaciju dentalnih materijala i ortodontskih naprava (3, 4, 9, 10), a time se olakšava otpuštanje produkata korozije metala koji su povezani sa štetnim posljedicama za zdravlje, kao što su stanična i genetska toksičnosti (1, 4, 11).

1.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je poremećaj u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu pri čemu je pomak ravnoteže usmjeren prema oksidaciji (12). Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja kisikovih slobodnih radikala pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnost neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica. Drugim riječima, oksidacijski stres se može definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidacijskog sustava. Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja (12).

Oksidacijski stres ima za posljedicu prekomjerno stvaranje kisikovih slobodnih radikala, a štetno utječe i na strukturu molekula, pri čemu kao krajnji rezultat nastaju promjene u tkivima i organima. Slobodni radikal je svaka kemijska vrsta sposobna za samostalan život koja u vanjskoj ljusci posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona. Sve slobodne radikale karakterizira iznimno visoka reaktivnost, što je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu i time postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju. Biokemijski su najznačajniji hidroksilni i superoksidni radikali kao reaktivni oblici kisika, te radikali dušičnog monoksida i dioksida (12).

Redukcija molekularnog kisika do vode uz sudjelovanje enzima citokrom oksidaze na unutrašnjoj membrani mitohondrija ili plazma membrani bakterija je najvažniji izvor energije za aerobne organizme. Međutim, nepotpunom redukcijom kisika nastaju toksični međuproizvodi poznati kao kisikovi slobodni radikali. Naime, redukcijom kisika s jednim elektronom nastaje superoksidni anion radikal (O_2^-). Njegovom dizmutacijom pomoću superoksid dizmutaze stvara se H_2O_2 , koji takođe nastaje redukcijom kisika s dva elektrona.

Vodikov peroksid nema nesparenih elektrona i nije slobodni radikal, ali je prethodnik vrlo reaktivnoga hidroksilnog radikala (OH). Ovaj visoko reaktivni oblik nastaje reakcijom između H_2O_2 i O_2 u prisustvu dvovalentnih kationa, a naziv se Haber - Weissova reakcija (13, 14). Također, hidroksilni radikal nastaje od vodikova peroksida sudjelovanjem tranzicijskih metalnih kationa kao što su Fe^{2+} i Cu^+ u takozvanoj Fentonovoj reakciji. Ekscitacija molekularnog kisika uvjetuje promjenu spina jednog od elektrona zbog čega nastaje singlentni kisik ($^1\text{O}_2$) (15).

Izvor slobodnih radikala mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni slobodni radikali u organizmu mogu nastati tijekom metabolizma kisika, fagocitoze, kemotaksije, apoptoze, koagulacije, hipoksije ili hiperoksije. Egzogeni izvor slobodnih radikala mogu biti fizikalni ili kemijski agensi poput dima cigarete, lijekovi, prehrana, pesticidi, neki metali, radioaktivno ili UV-zračenje (16). Hidroksilni radikali su najreaktivnija poznata vrsta reaktivnog oblika kisika, a mogu reagirati kao inicijatori autooksidacije lipida, izazvati oštećenje proteina, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata te drugih organskih molekula ukoliko dolazi do sinteze u njihovoj blizini. Slobodni radikali se konstantno generiraju *in vivo* i uzrokuju oksidacijsko oštećenje biomolekula, a cijeli proces se kontrolira mnogobrojnim antioksidansima, reparatornim sustavima te zamjenom oštećenih nukleinskih kiselina, proteina i lipida. Primarna zaštita stanice od produkcije slobodnih radikala je reduciranje kisika do vode prijenosom četiriju elektrona pomoću citokrom oksidaze, bez stvaranja kisikovih radikala kao međuproizvoda (17). Drugi smjer zaštite od slobodnih radikala je omogućen enzimima (superoksid dizmutaza, katalaza, peroksidaza) koji kataliziraju uklanjanje međuproizvoda redukcije kisika (18). Treći sustav zaštite je dopunjen nivoom antioksidanta male molekularne težine kao što su vitamini E i C te reducirani glutation (18).

DNA je vjerojatno biološki najznačajnija meta oksidacijskog napada, a učinak slobodnih radikala na DNA manifestira se u dimerizaciji pirimidina, izmjeni ili gubitku baza,

jednolančanim i dvolančanim lomovima, lomovima vodikovih veza te oksidaciji dušikovih baza (12). Oštećenje DNA oksidacijskim stresom ne mora se nužno povezivati s direktnim djelovanjem agensa, nego i s oštećenjem posredovanim interakcijom nekoga štetnog agensa s drugim makromolekulama i procesima. Smatra se da dugotrajno oksidacijsko oštećenje DNA ima važnu ulogu u cijelom nizu patofizioloških procesa koji uključuju karcinome, aterosklerozu, neurodegenerativne poremećaje, infektivne i autoimune bolesti, dijabetes, hemolize i starenje (12, 17).

Poznato je da industrijska onečišćenja mogu uzrokovati genotoksične učinke koji se očituju u promjenama na strukturi DNA. Spomenute promjene na DNA mogu inducirati mutagenezu (promjene genetske informacije), teratogenezu (razvojne malformacije), klastogenezu (cijepanje kromosoma) i karcinogenezu (rak ili neoplazmu). Brojna istraživanja proučavala su utjecaj egzogenih čimbenika, posebice iz radne okoline, na nastanak oksidacijskog stresa. Izgleda da izloženost azbestu povećava biljege oksidacijskog stresa u leukocitima za dva puta (19). I ekspozicija silikatnoj prašini bi mogla uzrokovati oksidacijski stres, a manji oporavak oštećene DNA mogao bi biti povezan s većim postotkom zračne opstrukcije pluća kod pacijenata sa silikozom (21). Dugotrajni kontakt s organofosfatnim pesticidima mogao bi uzrokovati oksidacijski stres i oštećenje DNA u poljoprivrednika, čime se izloženost pesticida dovodi u svezu s karcinomima i neurološkim bolestima (22). Izloženost kromu i kobaltu iz industrije, ali i njihovo otpuštanje iz ugrađenih kirurških implantata, poput kukova, moglo bi biti čimbenik nastanka oksidacijskog stresa (23), iako neka istraživanja to ne potvrđuju (24).

Loft i suradnici identificirali su tri čimbenika povezana s povećanom razinom biljega oksidacijskog stresa 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina (8-OHdG) u urinu - pušenje, indeks tjelesne mase i spol (25). Duhanski dim, uz kemijske komponente, sadrži i radioaktivne komponente, kao i katran u različitim koncentracijama. Polonij 210, koji se nalazi u

duhanskom dimu, emitira alfa čestice visoke energije koje se apsorbiraju u okolna tkiva, a uzrokuje i kromosomska oštećenja (26).

Kod pušača je zabilježena 1.5 puta veća razina biljega oksidacijskog stresa u urinu nego kod nepušača. Kod žena su i pušenje i indeks tjelesne mase bili značajno povezani s oksidacijskim stresom, dok je kod muškaraca samo pušenje bilo granično bitan čimbenik. Međutim, veća razina urinarne ekskrecije markera oksidacijskog stresa u pušača nije se smanjila dodavanjem antioksidansa, već prestankom pušenja (27). Assami i dr. izvijestili su o gotovo dvostruko višoj razini markera oksidacijskog stresa u leukocitnoj DNA, ali i 1,6 puta veći kapacitet oporavka oštećene DNA kod pušača nego kod nepušača (28). Izgleda da na razinu markera oksidacijskog stresa i reparatornu aktivnost DNA u leukocitima ne utječe samo pušenje nego i životni stil, okoliš i genetika. Pronađena je pozitivna korelacija između pušenja duhana i razine markera oksidacijskog stresa koja je ovisna o intenzitetu i trajanju pušačkog staža kod aktivnih i bivših pušača. U pušača je zabilježena 1.43 puta viša razina markera u nekanceroznom tkivu pluća nego u nepušača (28). Ipak, ne mogu sve studije potvrditi utjecaj pušenja na oksidacijski stres. Neki autori su čak pronašli niže razine markera u leukocitima pušača nego u nepušača te obrnuti odnos između razine markera i intenziteta te trajanja pušačkog staža (29).

Danas je životni i radni čovjekov okoliš nepredvidiva mješavina kemijskih spojeva, od kojih neki mogu djelovati kao mutageni ili karcinogeni. Lagorio i suradnici (30) proučavali su odnos između izloženosti benzenu, toluenu i ksilenu i markera oksidacijskog stresa kod radnika na benzinskim crpkama. Autori su izvijestili o značajnoj korelaciji između oksidacijskog stresa i prosječne godišnje izloženosti benzenu. No izloženost toluenu i ksilenu, iako visoko koreliraju s razinama benzena, nije utjecala na urinarnu koncentraciju biljega. Ograničenja ove studije odnose se na procjenu izloženosti koja nije bila dobivena iz podataka ove studije, i na mogućnost da i ostali sastojci benzina mogu uzrokovati oksidacijsko

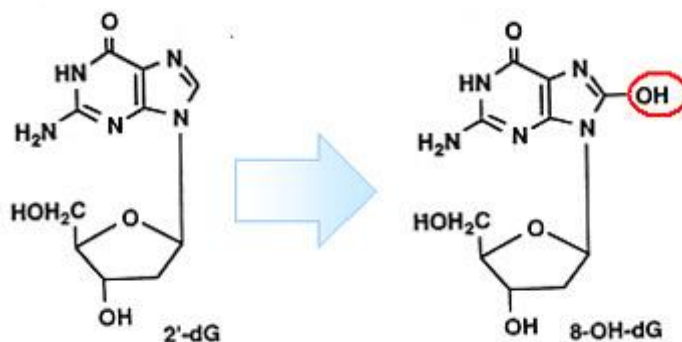
oštećenje DNA. Neki podatci upućuju na činjenicu da toluen može spriječiti genotoksičnost benzena. Kod izloženosti jednakoj koncentraciji benzena radnice (ženski spol) pokazale su značajno više razine 8-OHdG nego radnici (muški spol), dok s druge strane nije bilo značajne razlike u nivou limfocitne 8-OHdG između ženskih i muških zdravih pripadnika i kontrolne skupine (31).

Primijećen je značajan porast markera oksidacijskog stresa u limfocitima brodograđevnih radnika izloženih stirenu u usporedbi s kontrolnom skupinom. Međutim, nema dokaza da je izloženost stirenu duže od 10 godina značajnija za proizvodnju oksidacijskog oštećenja DNA nego izloženost u kraćim razdobljima (32).

1.2. Detekcija biljega oksidacijskog stresa

Detekcija slobodnih radikala je vrlo komplicirana zbog njihova kratkog poluživota te je detekcija usmjerena na produkte / biljega oksidacijskog stresa – modificirane nukleozide, pri čemu je najveći interes na mjerenju 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina (8-OHdG) (13, 19, 33). Biomarker ili biljeg definira se kao karakteristika koja se može objektivno mjeriti i dokazati kao indikator normalnog ili bolesnog procesa ili farmakološkog odgovora (34). Mjerenje adekvatnog biljega oksidacijskog stresa može nam ukazati ne samo na ranu pojavu bolesti, njezinu progresiju i procjenu efikasnosti terapije, već i pomoći u rasvjetljavanju patofizioloških mehanizama oštećenja tkiva djelovanjem oksidacijskog stresa, u predikciji prognoze bolesti i izboru adekvatnog liječenja u ranim stadijima bolesti.

Veliko biološko značenje 8-OHdG je u njezinoj sposobnosti da inducira transverziju gvanina u timin, što je jedno od najčešćih somatskih mutacija koji se nalaze u karcinomu. Dosadašnja istraživanja efekata kronične izloženosti raznim okolišnim čimbenicima na koncentraciju 8-OHdG u leukocitima i urinu do sada su producirali kontroverzne rezultate, pri čemu istraživanja financirana od industrija negiraju, a nezavisna uglavnom potvrđuju oštećenje DNA (19). Do sada je proučavana kronična izloženost nanočesticama, nikotinu, metalima, azbestu, azo-bojama, benzenu, policikličkim aromatskim ugljikovodicima, silikatima, stirenu, toluenu, ksilenu te česticama nastalima u industriji stakla i gume (13). Dostupni podatci upućuju da još uvijek nedostaje dobro utvrđen odnos doza – učinak između dugotrajne izloženosti nekoj supstanciji i indukcije 8-OHdG te su potrebna daljnja istraživanja da bi se postigao konsenzus za razinu 8 OHdG.



Slika 1. Nastajanje 8-OHdG od kisikovih radikala (preuzeto iz 35)

Nastajanje 8-OHdG u DNA i njegova ekskrecija u urin često su mjereni kako bi se procijenio oksidacijski stres kod ljudi. Najčešće mjereni biljezi oksidacijskog oštećenja DNA u biološkom nadzoru provedenom kod ljudi su 8-OHdG u leukocitima DNA i izlučivanje 8-OHdG u urin. 8-OHdG je ostatak nastalih slobodnih radikala gvanozina u DNA. Kada je stanični promet oštećen, on pušta svoj sadržaj u krvotok. Taj gvanozin bude eliminiran i nađen netaknut u urinu kao 8-OHdG. Smatra se da količina modificiranih nukleotida koji su izlučeni u urin predstavlja oksidacijsko oštećenje DNA cijeloga tijela. Ipak, ne postoji direktan dokaz ravnoteže između oksidacijskog oštećenja DNA jezgre i izlučivanja 8-OHdG u urin. Da bi se provjerila djelotvornost urinarnog 8-OHdG, štakorima je dana intravenozna injekcija 8-OHdG (34, 36). Ovaj test je pokazao da je došlo do 66% oporavka unutar 24 sata skupljanja urina i nije zabilježena degradacija 8-OHdG. Otkrilo se da je prehranom uneseni dio 8-OHdG u izlučevinama od malog značenja (<2% od cjelokupno pronađenog 8-OHdG). Kada ga usporedimo s određivanjem 8-OHdG u leukocitima DNA, mjerenje urinarnog 8-OHdG nudi neke prednosti: metoda nije invazivna, nema produkcije artefakta za vrijeme procesa uzimanja uzoraka, 8-OHdG se dalje ne metabolizira i pokazuje visoki nivo stabilnosti u urinu, a njegovo izlučivanje će vjerojatno odražavati oksidacijska oštećenja i popravak svih stanica u organizmu.

Za detekciju 8-OHdG u DNA najčešće se koriste metode: visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC) s elektrokemijskom detekcijom (EC), plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (CG-MS), 32P-post označavanje, metode koje se baziraju na uporabi formamidopirimidina DNA N-glikozilaze te imunoenzimatski test ELISA.

Metodu za detekciju 8-OHdG uz pomoć HPLC-EC uvedena je 1986. godine (37). Ova tehnika je, s različitim modifikacijama, često primjenjivana u posljednjem desetljeću. Protokol uključuje enzimsku hidrolizu kako bi se razlomila DNA, separaciju na stupcu C18 i EC detekciju 8-OHdG. Rezultat se izražava u količini 8-OHdG koji je uočen po količini neoštećenog dG (8-OHdG/10 na 5 dG).

Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (CG-MS) izuzetno je specifična i osjetljiva tehnika za kvantitativnu analizu individualnih produkata oksidiranih DNA baza, uključujući 8-oksoguanin (38). Ipak, nedostatak ove metode možda je oksidacija gvanina za vrijeme derivatizacije 8-oksoguanina trimetilsilacijom prije CG-MS (39). Vrijednosti dobivene ovom metodom su 10-50 više od onih koje su izmjerene uz pomoć HPLC-EC (40).

32P-post označavanje se koristi kako bi se pokazalo da su reaktivni oblici kisika sposobni potaknuti velika podvlačenja *in vitro* putem direktne DNA oksidacije (41). Uložili su se veliki naponi kako bi se razvili 32P-post označavajući testovi za osjetljivu detekciju 8-OHdG-a. Sa 32P-post označavanjem uzorci su izloženi ionizirajućoj radijaciji koja može uzrokovati oksidaciju deoksigvanozina (dG) kod 8-OHdG. Kako bi se smanjio rizik artefaktne produkcije 8-OHdG za vrijeme obrade, izuzetno je važno da se odvoji 8-OHdG od dG prije post obilježavanja (42).

Formamidopirimidina DNA N-glikozilaze (FPG) uklanja 8-OHdG te otkriva oksidirane pirimidine, odnosno promijenjene purine ostavljajući AP mjesta koja su prebačena u DNA rubove veza s pomoću odgovarajuće AP endo nuklearne aktivnosti. Prema tome upotreba enzima specifičnih za lezije omogućava uvođenje dodatnih rubova veza na mjestima

gdje je došlo do oksidacijskih oštećenja. Ovaj pristup je primijenjen i u različitim metodama: jednostruki gel elektroforeze (komet test) (43), tehnika lužnate evaluacije (44) i lužnato odmotavanje (45). Ovi testovi ne trebaju ekstrakciju DNA i čini se da su manje skloni artefaktima, a rezultati su niži od onih dobivenih putem HPLC-EC.

Komet test (CA) i Mikronukleus test (MN) jednostavni su testovi za procjenu genotoksičnog rizika. Kada se provjerava neka tvar ili kemijski spoj, zapravo se testira izaziva li on kakve promjene u genomu stanice, tj. promjene na razini kromosoma ili gena. Time se otkriva je li spoj toksičan za organizam ili nije.

Komet test se radi tako da se stanica ili jezgra izloži nekom agensu, te se stavi u alkalne uvjete i pusti na elektroforezu. Jezgra putuje kroz elektroforezni gel, manji komadići putuju prvi jer lakše prolaze kroz gel. Ako ima puno manjih komadića, znači da je agens potrgao jezgru i njen genetički material te je citotoksičan za organizam.

Mikronukleus je test (MN) složeniji, za njega se koriste stanice koje se često dijele, jer se ispituje stanica u mitozu. Takve se stanice također izlože nekom stranom agensu i puste se da uđu u mitozu. Ako se nakon nje primijeti mali mikronukleus (mala jezgrica) nakon diobe, znači da se ili dio kromosoma ili cijeli kromosom odvojio. To znači da je dotični agens ošteti genetički materijal, te je on po standardima toksičan.

Prednost je imunoenzimskih testova (ELISA) da se prilično lako provode. ELISA (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) ili enzimski imunovezujući test kombinira specifičnost reakcije antigen-antitijelo i osjetljivost jednostavne enzimske reakcije, što ovoj tehnici osigurava visoku osjetljivost i selektivnost. Zahvaljujući tomu, omogućuje određivanje niskih koncentracija analita (do ng / ELISA kg), često uz relativno jednostavnu pripremu uzorka, a istovremeno ne treba zahtjevnju i skupu opremu poput kromatografskih tehnika. Uz to, ELISA se radi na standardnim mikrotitarskim pločama s 96 jažica, što omogućuje istovremeno ispitivanje velikog broja uzoraka. Postoji niz varijacija ELISA tehnike. Sve

imaju isti osnovni princip: temelje se na reakciji antigen-antitijelo, a količina analita određuje se na temelju promjene boje kromogena uz prisutnost enzima. Tri su osnovna tipa: direktni, indirektni i tzv. sendvič test. Sva tri sustava mogu se temeljiti na kompeticijskoj ili inhibicijskoj tehnici. Nakon ekstrakcije i probavljanja DNA, kojoj je uslijedila imuno srodna purifikacija i imunoenzimski test, određivanje količine 8-OHdG, može se demonstrirati dobra korelacija s vrijednostima dobivenim putem HPLC.

Unatoč značajnim naporima za poboljšanje analize 8-OHdG i za određivanje prediktora formiranja 8-OHdG, broj pitanja koji se odnose na pojavu artefaktne pozadine i čimbenika okruženja koji utječu na stabilno stanje razine 8-OHdG ostaju još uvijek neodgovorena (16). Naime, postoje značajne međulaboratorijske razlike u osnovnim razinama ovog biomarkera i veliki broj različitih čimbenika (primjerice dob, spol, prehrana, pušenje, konzumacija alkohola, fizička aktivnost, vitaminski deficit) mogu utjecati na stvaranje 8-OHdG. Osim toga, prisustvo 8-OHdG u DNA i u urinu može ovisiti i o nekim drugim čimbenicima poput kapaciteta oporavka DNA i upalne reakcije. O utjecaju izloženosti na radnom mjestu postoje oprečni rezultati, a stvaranje ili eliminacija 8-OHdG može pokazati značajnu različitost među pojedincima ili čak pojedinačno. Nadalje, potreban je daljnji rad kako bi se utvrdila dobro utemeljena razina 8-OHdG.

1.2. Biokompatibilnost dentalnih materijala i ortodontskih naprava

Studije biokompatibilnosti u ortodontskoj domeni često su usmjerene na koroziju žica i bravica, citotoksični učinak metalnih iona na kulturu stanica i obraznu sluznicu i hiperplaziju gingive te promjene salivarnih parametara (1 - 4, 10, 11, 46 - 48). Biokompatibilnost je sposobnost materijala da harmonično koegzistira s biološkom ravnotežom domaćinskog tkiva i tijela bez uzrokovanja štetnih promjena (49- 51). Biokompatibilnost se dijeli na površinsku i strukturnu (52). Površinska kompatibilnost bazirana je na površinskoj morfologiji i označava kemijsku, biološku i fizikalnu usklađenost materijala s domaćinom. Strukturna kompatibilnost predstavlja optimalnu prilagodbu mehaničkom ponašanju domaćinskog tkiva. U strukturnu kompatibilnost ubrajaju se mehanička svojstva materijala – modul elastičnosti, čvrstoća, oblik i minimalna međupovršinska napetost na sučelju materijala i tkiva (52).

Genotoksičnost se definira kao nepoželjno djelovanje agenasa na genetički materijal, a ovisno o intenzitetu, stanica se oporavlja, započinje neoplastični rast ili umire. Citotoksičnost se definira kao nepoželjno djelovanje agenasa na stanicu kao cjelinu, što u konačnici može dovesti do smrti stanice ili slijedi oporavak. To znači da genotoksičnost podrazumijeva ili mutagene ili kancerogene procese (53). Značenje genotoksičnosti je u tome što niske koncentracije agensa ne pokazuju učinke koji se mogu zamijetiti na razini funkcioniranja stanice i/ili organizma, ali u dugotrajnoj izloženosti uslijed djelovanja na genetički materijal mogu dovesti do razvoja neoplazmi i smrti čitavog organizma.

Toksičnost se definira kao sposobnost agensa da naruši homeostazu u mjeri štetnoj za zdravlje: na razini stanice, na razini organa, organskih sustava ili cijelog organizma (zbroj učinaka na razini pojedinih stanica, organskih sustava ili cijelog organizma) (53).

Specifična toksičnost predmnijeva stanje kada agens/noksa ispoljava neželjene učinke isključivo u određenom tipu stanica (neurotoksičnost, nefrotoksičnost, hepatotoksičnost...), dok se kod nespecifične toksičnosti neželjeni učinci očituju u svim tipovima stanica.

Malobrojna su istraživanja o genotoksičnosti ortodontskih naprava i uglavnom su bazirana samo na ispitivanje učinaka konvencionalnih čeličnih bravica (53,54). Procjena citotoksičnosti je dio inicijalnog vrednovanja biokompatibilnosti, a određuje se korištenjem različitih metoda poput brojenja preživjelih stanica, mjerenja raspona proliferacije stanica, sinteze staničnih makromolekula ili određivanja enzimske aktivnosti (55).

Ortodontske naprave su u oralnom okruženju izložene velikom broju potencijalno štetnih fizičkih i kemijskih agenasa koji mogu dovesti do korozije metalnih komponenti tih naprava (56). Korozija je destrukcija metala i legura usljed kemijske i elektrokemijske reakcije s okolnom sredinom. Korozija se karakterizira ravnomjernim smanjenjem debljine materijala, bez značajnijeg lokaliziranog napada, dok se piting (rupičasta) korozija definira kao izrazito lokalizirani korozivni napad, pri kome dolazi do stvaranja poroznih jamica ili pitova. Do pitova dolazi u prisustvu halogenih iona, naročito Cl⁻. Pri koroziji metala na njihovoj površini se istovremeno događaju dvije ili više elektrokemijskih reakcija. Anodnu reakciju predstavlja otapanje metala, odnosno prelazak metalnih iona u otopinu. Katodnu reakciju predstavlja redukcija nekoga oksidacijskog sredstva koje je prisutno u otopini. To je najčešće redukcija kisika. U kiseloj sredini se najčešće odvija i reakcija redukcije vodikovih iona. S povećanjem temperature raste sklonost metala i legura formiranju pitova, a lakše se stvaraju na mjestima metalurške heterogenosti materijala.

Kako bi se sila dovela sa žice na zub, bravice bi trebale imati određenu snagu i čvrstoću, trebale bi imati gladak utor kako bi se smanjila otpornost na trenje, i naravno glatku površinu kako bi se smanjilo zadržavanje plaka. Ortodontske bravice su proizvedene tako da imaju trodimenzionalnu preskripciju za svaki zub, pa bi trebale imati visoku otpornost na koroziju i dobru biokompatibilnost. Keramičke bravice su pokazale lomljivost, i ponekad se kod njihova skidanja odlomi i dio zubnoga caklinskog sloja. Keramika je druga po čvrstoći iza dijamanta te je kao takva puno čvršća od zubne cakline, stoga kada pacijent grize na

bravicu često dođe do abrazije zubne cakline antagonista. Izgleda da ove bravice u kombinaciji s bilo kojim lukovima, osim nikal titanskim, proizvode najveće frikcijske sile, jednako u vlažnim ili suhim uvjetima (57). Polimerne bravice su pokazale da lako gube boju i imaju nisku otpornost na deformaciju kod torkviranja. Metalne bravice od nehrđajućeg čelika pokazale su osobine najbliže idealnim i najčešće se koriste. Ortodonska naprave su uglavnom napravljene od austenitičkoga nehrđajućeg čelika koji je dizajnirao American Iron and Steel Institut (AISI) kao seriju 300. U ortodonciji se najčešće koriste tipovi 304, 316 te 17-4 PH SS za proizvodnju bravica, prstenova i žica. Većina ima 18-20% kroma, 8-10% nikla, manju količinu mangana i silicija te ugljika manje od 0,03%. Međutim, lokalizirana korozija ovih materijala može se učestalo pojavljivati u oralnom okruženju (58). Među proizvodima metalne korozije koji mogu ući u tijelo (59) ioni nikla privlače posebnu pozornost zbog svojih karcinogenih, mutagenih, alergeni i genotoksičnih utjecaja. Nikal je ugrađen u sve legure austenitičkoga nehrđajućeg čelika kako bi poboljšao antikoroziivna svojstva legure, dok se krom dodaje da poboljša stvaranje antikoroziivnoga pasivnog sloja. Alternativne legure sa smanjenim udjelom nikla i titana potiskuju tradicionalne legure od nehrđajućeg čelika u proizvodnji ortodontskih materijala i naprava, posebno za osobe osjetljive na nikal. Ipak, biokompatibilnost legura sa smanjenim udjelom nikla do sada nije dovoljno ispitana. Otpornost ortodontskih legura ovisi o okruženju u ustima, što opet ovisi o nekoliko varijabli poput količine i kvalitete sline te pH hrane i pića (60). Smanjujući pH sa 6.75 na 3,5 , povećava se otpuštanje iona za prosječno 37 puta, s najvećim povećanjem za krom (1:106), a najmanjim za titan. Ovi rezultati potvrđuju hipotezu da niska pH vrijednost smanjuje otpornost dentalnih legura na koroziju (46). Izgleda da sila koja se prenosi s aktiviranog luka na slot bravice kao i trenje tijekom slobodnog klizanja po luku, utječe na promjene materijala u usnoj šupljini. Promjena temperature u ustima može snažno utjecati na osobine lukova i opruga od nikal titana tako da je njihova otpornost na pucanje smanjena. Budući da ioni nikla

nisu snažno povezani s metalnim spojevima, veća je vjerojatnost za sporije oslobađanje iona nikla iz legurnih površina, a sve to skupa može imati implikacije na biokompatibilnost ovih materijala (4). Otpornost legure na koroziju ovisi o pasivnom filmu koji se spontano formira (pasivizacija) i ponovo se stvara (repasivizacija) u zraku i u uvjetima vlažnog tkiva. Mehaničko ili kemijsko razaranje ovog sloja, ili izloženost tvari koja ga otapa, i sprječava njegovo oporavljanje, rezultirat će u koroziji. Kako bi se stvorio, potreban je kisik, dok kiselost i kloridni ioni mogu za nj biti posebno štetni. Na makroskopskom nivou korozija je karakterizirana hrapavošću površine bravica koja je često udružena s odlaganjem korozivnih produkata. Ovo je kontinuiran proces, a efekti su kumulativni, pa tako u slotu bravice može biti progresivan porast površne hrapavosti, ili korozivni proces koji se povećava s vremenom. Ovo može uzrokovati smanjenu otpornost na trenje kod klizajuće mehanike i konačno utjecati na tijek ortodontskog tretmana (61) .

Povećavanje udjela kroma u leguri rezultira u smanjenju trenutačne pasivne gustoće, povećava se mogućnost lomljenja i oštećivanja, a isto tako se smanjuje trenutačna kritična gustoća i potencijal potreban za pasivizaciju. Nikal se dodaje kako bi se smanjila trenutačna kritična gustoća, dok molibden ima snažan efekt na smanjivanje trenutačne kritične gustoće i smanjuje mogućnost za pitičasti korozivni potencijal.

Nikal - titanski lukovi sadrže 47% - 50% nikla i najbogatiji su izvor nikla u intraoralnom okruženju jednoga prosječnoga ortodontskog pacijenta (4). Postoji trend državnih zakona da se sve više uzima u obzir mogućnost različitih reakcija na nikal i istakne potrebu pacijentove svijesti o mogućim neželjenim posljedicama. Materijali koji su smješteni u usnoj šupljini, kao lukovi i bravice, pokazuju stalnu reakciju s čimbenicima okruženja koji su tu prisutni. Slina može sadržavati kiselinu nastalu iz degradacije i raspadanja hrane. Dokazano je prisustvo streptokoknih kolonija na elastičnim ligaturama nakon intraoralne izloženosti i djelovanju flore usta. Akcija mikrobne kolonizacije je dvostruka: najprije neke

vrste mogu metabolizirati metale iz legura, a onda mikrobn bioproducti i metabolički procesi mogu mijenjati uvjete mikrookruženja smanjujući pH i tako pridonose nastanku korozivnih produkata. Eliades i Athanasiou su pokazali korozivne procese na zubnoj caklini koja je apsorbirala produkte korozije nakon skidanja metalnih i plastičnih bravica, a prije skidanja ljepila (4). Dio korozivnih produkata može se preseliti u gastrointestinalni trakt za normalnog žvakanja.

Nikal i krom imaju dermatološke, toksikološke i mutagene efekte (62). Nikal je najčešći uzročnik kontaktnoga alergijskog dermatitisa uzrokovanoga metalima. Pojavnost štetnih reakcija na nikal je procijenjena kod ortodontskih pacijenata na 1:100, a 85% ovih slučajeva udruženi su s kontaktnim dermatitisom koji drukčije izgleda u ustima nego na koži, stoga se često u dijagnostici može pomiješati s lezijama od mehaničkih ozljeda sluznice ili lošom oralnom higijenom. Izgleda da krom u ljudi utječe na osjetljivost koja je povezana s kroničnim dermatitisom kao rezultat kontakta sa solima kroma, što je povezano s korozijom ovih legura (63). Alergija na krom je potvrđena kod 10% muških te 3% ženskih, a na nikal kod 10% ženskih i manje od 1% muških ispitanika (63). Nikal nije kumulativni toksin; apsorbira se u gastrointestinalnom traktu i eliminira metaboličkim putem. Glavni put za eliminaciju nikla su bubrezi; oko 90% se brzo izluči urinom. Biološki efekti sistemskog povećanja nikla u urinu su nepoznati. Pacijenti koji nisu profesionalno izloženi niklu, imaju prosječni urinarni nivo oko 4.5 µg/L (64), a dnevni unos prehranom je oko 300-500 µg dnevno za nikal, a za krom 280 µg. Značajna izloženost niklu i kromu može se pojaviti iz atmosfere, vode za piće, patentnim zatvaračima na odjeći i nakitu. Epidemiološki podatci pokazuju da se broj ljudi osjetljivih na nikal povećao na oko 20% (54). Tri mehanizma uključuju reakcije superosjetljivosti: alergiju, netoleranciju i hiperreaktivnost. Osobe osjetljive na nikal u kontaktu s njim mogu očitovati širok opseg reakcija koje se mogu pojaviti u oralnoj šupljini, a i češće ekstraoralno. Alergije na nikal se očituju kao crvene zone unutar

usne šupljine, kao mjehurići ili ulceracije koje se šire i na područja oko usta i opisuju se kao kontaktni dermatitis ili mukozitis. Intraoralne reakcije uključuju crvenilo, otok, svrbež i suhoću usana i sluznice, kao i upalu gingive. Sve ove reakcije nisu nužno ograničene na izložena mjesta. Ekcemi i urtikarije na licu ili daljim područjima mogu se pojaviti skupa s crvenilom, iritacijom, svrbežom i ljuštenjem (64). Ipak, mnogo toga što nije proučeno ostaje nepoznato kod nikla kao što je vrijeme početka njegova otpuštanja, apsorpcija i reakcije. Nikal se izlučuje slinom i znojem. Ovo se može povezati s povećanim izlučivanjem nikla u područjima koji imaju visoke temperature. Neke studije pokazuju da postoje indikacije da ortodontski tretman može poboljšati toleranciju imunološkog sustava na nikal kod ljudi kod kojih je prije tretmana postojala alergija na nikal (65, 66). Studije su pokazale da postoji otpuštanje nikla i kroma iz fiksnih ortodontskih naprava nakon stavljanja u pacijentova usta, ali njihove vrijednosti u bilo kojem razdoblju tretmana ne dostižu toksične razine u krvi i slini i iste su kao kod zdravih osoba (62). Ipak, ne može se isključiti činjenica da čak i netoksične koncentracije mogu biti dovoljne da potaknu biološke učinke na stanicama oralne sluznice (54). Reakcije mogu varirati od jednostavnog eritema do nekroze, ovisno o toksičnosti primarnog iritanta, koncentraciji i vremenu izloženosti (67).

Grimsdottir i suradnici (65) u *in vitro* studiji pronašli su niske količine nikla i kroma otpuštenih iz lukova od nikl titana, dok su, interesantno, nađeni visoki nivoi otpušteni iz obraznog luka. Obrazni lukovi sadrže srebrnu leguru, za koju se smatra da potiče stvaranje galvanskih parova koji vode k otpuštanju nikla i drugih metalnih iona. Ipak, reakcija kože na obrazni luk je drukčija od reakcije u usnoj šupljini zbog nedostatka Langerhansovih stanica. Zaključak je da bi laserom lemljeni obrazni lukovi bili bolja alternativa.

Citotoksični efekti se povezuju i s ortodontskim prstenovima, a smatra se da su za to odgovorne legure srebra i bakra koje se koriste u njihovoj izradi. Naime, metali se spajaju postupcima varenja i lotanja (68). Za lotanje je potreban lot koji spaja dva metala, a najčešće

se koristi srebrni ili zlatni lot. Do spajanja metala dolazi zagrijavanjem plamenikom ili električnim putem pomoću elektroda. Izgleda da je lasersko lemljenje bravica jedini proces spajanja materijala koji sve testirane stanice dobro toleriraju, što govori u prilog biokompatibilnosti ovog postupka (69). Bravice istog sastava mogu imati značajno različite korozijske osobine u *in vitro* uvjetima (56). Mikrostruktura legure može utjecati na koroziju, i mikrostruktura sama utječe na legiranje, tretmane topline i hladno oblikovanje. Tvorničko završavanje poliranja površine bravica može utjecati na korozijsko ponašanje. Mnogi proizvođači elektropoliraju svoje bravice da poboljšaju izgled i smanje korozijsko ponašanje. Ipak, elektropoliranje može potaknuti stanice galvanske korozije između poliranih površina (krilca) i nepoliranih površina bravica (utor). Kada se dva metala spoje i stave u neku otopinu ili elektrolit, onaj koji je više elektronegativan ili bazični metal postat će anoda, dok onaj koji je više elektropozitivan ili plemenit funkcionira kao katoda. Metalni ioni kao kadmij, bakar, srebro i cink prisutni su u srebrnim legurama i smatraju se potencijalno opasnim kemijskim proizvodima (70). *In vitro* studije su pokazale da bakar kada je slobodan može katalizirati stvaranje visoko toksičnih hidroksilnih radikala koji mogu uzrokovati neurodegenerativne promjene. U većim dozama cink može izazvati iritaciju gastrointestinalnog trakta, nekrozu bubrežnih tubulusa i akutni nefritis. Izgleda da je toksičnost lateks gumica koje se koriste u ortodonciji uzrokovana otpuštanjem cinka. Budući da ingestija cinka nije zdravstveni rizik, istraživanja sugeriraju da je upotreba lateks gumica u ortodonciji prihvatljiva usprkos nalazima da lateks gumice imaju veću *in vitro* citotoksičnost nego gumice koje ne sadrže lateks (71). Kadmij, koji je isto tako prisutan u srebrnim legurama, može promijeniti mitohondrijsku propusnost, što može voditi smrti stanice (70). Za pričvršćivanje bravica za zube koriste se adhezivi i ljepljive smole koji su pokazali povećanu toksičnost odmah nakon primjene i trideset dana nakon polimerizacije (72). Grimsdottir i sur. su izvijestili da je otpuštanje nikla iz fiksnih ortodontskih naprava povezano i sa spojevima i s metodama

proizvodnje naprava, ali da nije proporcionalno sadržaju nikla (64). Barret i sur. su zaključili da nema značajnih razlika u otpuštanju nikla ili kroma od lukova od nehrđajućeg čelika i nikal - titana (72).

Ortodontska primjena nikla je jedinstvena u tome što legurni element nije implantiran u tkivo nego se stavlja u otvorenu usnu šupljinu (4). Prema tome, testovi koji uključuju implantaciju legura nikla koji se često koriste u drugim medicinskim područjima, ne nose nikakvu relevantnost kliničkoj upotrebi materijala u ortodonciji. Iako implantacijska procedura može biti smatrana više invazivnom nego intraoralno smještanje legura koje sadrže nikal, reakcija na implantirane materijale je povećana zbog stvaranja kapsule vezivnog tkiva koje okružuje strano tkivo. Suprotno tomu, materijali koji su smješteni intraoralno, poput žica i bravica, pokazuju stalnu reakciju s čimbenicima okruženja koji su prisutni u otvorenoj usnoj šupljini. Poznato je da je korozivni potencijal nehrđajućeg čelika povećan u kiselom okruženju. Većina studija je prihvatila *in vitro* pristupe koji su se pokazali metodološki nestabilnim i klinički irelevantnim zbog drukčije prirode *in vitro* medija i usne šupljine. Ortodontske naprave i materijali koji se koriste kao dio sveobuhvatnog tretmana, predstavljaju idealan model za studije s obzirom na to da se glavnina materijala, osim bravica i prstenova, može izvaditi tijekom kontrole i proučavati *in vivo*. Većina žica, elastomera i drugih pomagala samo se periodično koriste tijekom terapije. Proučavanje bravica i prstenova može se napraviti samo na kraju tretmana zbog etičkih i tehničkih problema koji proizlaze iz namjernog skidanja i stavljanja naprave. Zato su autori radili istraživanja na napravama i žicama koje su neko vrijeme bile u ustima pa su promatrali promjene na njima. Eliades i Athanasiou su pronašli na površinama žica od nikal - titana i unutarnjem luku obraznog luka od nehrđajućeg čelika formirane proteinske ovojnice koje su bile u ovisnosti o dužini izloženosti u ustima i uvjetima oralnog okruženja (4). Organski dijelovi filma prisutni na legurnoj površini su amid, alkohol i karbonati, dok su prevladavajući elementi kalcij, fosfor i

natrijev klorid. Ova istraživanja su pokazala i povećanu koncentraciju iona nikla i željeza u slini tri tjedna nakon stavljanja *edgewise* ortodontskih naprava. Međutim, velike individualne razlike koje su proizašle iz različitog broja prstenova i bravica svakog sudionika, spriječili su otkrivanje statističkih značajnih razlika u koncentraciji nikla. Slično tomu studije o razinama nikla i kroma u slini nisu otkrile povećanu koncentraciju ovih iona u razdoblju od jednog dana do jednog mjeseca nakon stavljanja fiksnih ortodontskih naprava *edgewise* tipa u odnosu na koncentraciju prije stavljanja (73). S druge strane, neka istraživanja su uputila da mjerenje otpuštanja nikla može ne biti mjerivo u slini ili krvi nakon jednog tjedna. (74).

Pukotinska korozija pojavljuje se na mjestu koje je izloženo korozivnom okruženju, često kroz dodatke nemetalnih dijelova na metal (primjerice elastične ligature na bravice) i nastaje zbog razlika u metalnim ionima ili koncentracije kisika između pukotine i njezina sadržaja (4). Ovaj atak može biti udružen s nedostatkom kisika koje je povezano sa stvaranjem plaka i bioprodukata mikrobne flore koji crpe kisik i na taj način ometaju regeneraciju pasivnog sloja kromova oksida.

Poznato je da željezo, bakar, krom i vanadij prolaze kroz redoks ciklus i time direktno stvaraju radikale, dok ih indirektno stvaraju kadmij, živa, nikal i olovo (11), što ima za posljedicu stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta kao što su superoksidni ioni, hidrogen peroksid i hidroksilni radikal. Time se povećava lipidna peroksidacija i oštećenje DNA te se pojavljuje promijenjena kalcijaska i sulfhidrilna homeostaza (75). Različite studije su potvrdile da ovi metali aktiviraju signalne putove te da je njihov karcinogeni efekt bio povezan s aktivacijom redoks osjetljivih prijenosnih čimbenika kao što su NF-kapaB, AP-1 i p53. Sadašnje studije su potvrdile da metalni ioni mogu potaknuti stvaranje tumor nekroza faktora α (TNF α) i aktivirati protein kinazu C te potaknuti stvaranje proteina stresa. Enzimatski i neenzimatski antioksidansi osiguravaju zaštitu protiv štetnih napada slobodnih radikala koji su uzrokovani metalima. Zajednički čimbenik za određivanje toksičnosti i karcinogenosti za ove metale je

stvaranje reaktivnog kisika i dušičnih vrsta. Specifične razlike u toksičnosti metalnih iona odnose se na razlike u topljivost, sposobnosti apsorpcije, prijenosa te kemijskoj reaktivnosti i spojevima koji se stvaraju unutar ljudskog tijela.

Pokušavajući napraviti fiksne ortodonske naprave estetski prihvatljive pacijentima, proizvođači nastoje proizvesti bravice i pomagala koja oponašaju boju zuba, a odavno su poznate lingvalne bravice. Iako su postojaniji od metala, izgleda da keramika, polikarbonati i umjetni safir, koji se koriste za izradu estetskih komponenti novijih ortodontskih bravica, nisu inertni materijali. Sve trenutačno dostupne keramičke bravice napravljene su od alumine koja je u mono-kristalnoj ili polikristalnoj formi. Primarna prednost proizvodnje monokristala je u eliminaciji mogućih stresom uzrokovanih zagađenja i nedostataka (47). Safir je kristal aluminijevog trioksida u koji mogu biti ugrađeni metali željeza, kroma, titana ili vanadija koji mu određuju boju, a ti metali mogu uzrokovati stvaranje radikala. Zbog multiplih kristala bravice od polikristalne alumine imaju relativno grube površine (76) te između njih i sluznice usne šupljine postoji veća kontaktna površina (47). Nadalje, proizvodne procedure, završavanje i poliranje ovih bravica je zahtjevno. Ovo objašnjava njihove zrnaste i rupičaste površine koje u kontaktu s ortodontskim žicama mogu riskirati biokompatibilnost i estetiku. Citogenetička analiza upućuje da neke vrste aluminijoksidne keramike ne uzrokuju strukturalne, ali uzrokuju numeričke kromosomske aberacije (77).

Polikarbonati su termoplastični polimerni materijali proizvedeni kemijskim reakcijama koje mogu biti reverzibilne, spontane ili stimulirane (toplinom ili reagensima), u kojima se monomeri kemijski povezuju u formu izduženih razgranatih molekula (78). Plastične bravice koje se dobivaju od polikarbonatnih materijala nisu kemijski rezistentne u kontaktu s otapalima ili visokim temperaturama jer omogućavaju otpuštanje monomera dalje od originalnog proizvoda. Iako polikarbonatne bravice dolaze od hijaluronske kiseline, smatraju se potencijalno opasnijim od kompozitnih. Razlog tomu je što su dobivene od bisfenola koji

se koristi u proizvodnji plastike, smola i fungicida. Polikarbonati hidroliziranjem otpuštaju bisfenol A, spoj iz skupine aromatskih ugljikovodika koji je povezan s hipometilacijom DNA, nastankom karcinoma dojke i prostate, te poremećajem rada štitnjače i gonada (79,80). Često se navodi da bi bisfenol A mogao biti okidač preranog puberteta kod mladih djevojaka te da utječe na mušku plodnost (47).

Treći tip estetskih bravica je napravljen od plastike ili polioksimetilena (POM). Usprkos prednostima polioksimetilenske bravice imaju sklonost depolimerizaciji u formaldehid, a koja se može pojaviti kod izlaganja visokim temperaturama, kemijskim agensima kao što su alkalije, kisik ili enzimi te x-zrakama. Izgleda da je formaldehid toksičan, alergogen i potencijalno karcinogen (47, 81). S obzirom na to da se formaldehid koristi kao dezinfekcijska baza, isključena je njegova blagotvorna prisutnost u ljudskom tijelu te je dalja upotreba POM za ortodontske bravice, krunice za djecu i ostale protetske naprave kontraindicirana jer će čak i radiografija izazvati njegovo raspadanje. Formaldehidne pare su poznati iritansi mukoznih membrana i mogu uzrokovati dermatitis. Kada se kombiniraju s vodom i progutaju, mogu uzrokovati bolove u abdomenu, hematuriju i konačno smrt (81).

Biokompatibilnost i reakcije tkiva ovise o otpuštanju elemenata iz ovih materijala. Toksične, upalne, alergijske ili mutagene reakcije mogući su biološki odgovori na njih. (71) Kako genotoksičnost obuhvaća mutagene i kancerogene procese, ispitivanja i poznavanje genotoksičnih svojstava materijala ortodontskih naprava morale bi biti bitan kriterij za odabir naprava koje bi imale siguran biološki učinak na pacijente (82).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati uzrokuju li ortodontske bravice oksidacijski stres u *in vitro* uvjetima i postoje li razlike u oksidacijskom oštećenju DNA jezgre stanice između pojedinih vrsta konvencionalnih i samoligirajućih ortodontskih bravica.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Uzorak je činilo tri tipa konvencionalnih i četiri samoligirajućih bravica:

- (1) konvencionalne čelične bravice *Mini Sprint* (Forestadent, Phorzheim, Njemačka),
- (2) konvencionalne kompozitne *Quantum* (Masel, Carlsbad, SAD),
- (3) konvencionalne monokristalne safirne *Inspire Ice* (Ormco, Orange, SAD),
- (4) samoligirajuće čelične s nikal – titanskom kvačicom *Speed* (Strite Industires, Cambridge, Canada),
- (5) samoligirajuće čelično - keramičke s kobalt – kromovom kvačicom *QuicKlear* (Forestadent, Phorzheim, Njemačka),
- (6) samoligirajuće keramičke s čeličnom kvačicom punktiranom rodijem *In-Ovation C* (Dentsply GAC, Bohemia, SAD) te
- (7) samoligirajuće čelično – kompozitne s čeličnom kvačicom *Damon 3* (Ormco, Orange, SAD).



Slika 2. Bravica Mini Sprint



Slika 3. Bravica Quantum



Slika 4. Bravica Inspire Ice



Slika 5. Bravica Speed



Slika 6. Bravica QuicKlear



Slika 7. Bravica In-Ovation C



Slika 8. Bravica Damon 3

Kao apsolutna kontrola rabio se medij kulture stanica bez testnih materijala. Negativna kontrola bila je umjetna slina, a pozitivna kontrola 0.1 mM H₂O₂. U svakom uzorku testiralo se po pet maksilarnih bravica od kompleta bravica (1 komplet sadrži 20 bravica – po 10 maksilarnih i mandibularnih), a svi testovi su rađeni u triplicatu i ponavljani dva puta.

Tabela 1. Sastav konvencionalnih bravica prema navodima proizvođača (Material safety dana sheet)

Tip	Proizvođač	Vrsta	Sastav
Mini Sprint	Forestadent, Phorzheim, Njemačka	konvencionalne čelične	Cr 16-20%, Mn 16-20%, Mo 1.8-2%, Si 1%, Ni 0.3 %, P, S, V, C 0.1%, Fe ostatak ≤65%
Quantum	Masel, Carlsbad, SAD	konvencionalne kompozitne	Isocijanat, dugolančani makrodiol, kratkolančani diol ekstender. (Opasne supstance: difenilmetan 4,4 diisocijanat (MDI), polieter poliol baziran na dipropilenglikolu)
Inspire Ice	Ormco, Orange, SAD	konvencionalne monokristalne safirne	Monokristalni aluminoksid, cirkonij oksid

Tabela 2. Sastav samoligirajućih bravica prema navodima proizvođača (Material safety dana sheet)

Tip	Proizvođač	Vrsta	Sastav
Speed	Strite Industires, Cambridge, Canada	samoligirajuće čelične s nikal – titanskom kvačicom	Baza: Cr 20%, Ni 14%, Cu 5%, Mo 3%, Mg 2%, P, S, Cb, Ta, C <1%, Fe ostatak ≤54% Kvačica: Ni 55%, Ti 45%
QuicKlear	Forestadent, Phorzheim, Njemačka	samoligirajuće čelično - keramičke s kobalt – kromovom kvačicom	Baza: 99,99 % aluminum oksid Kvačica: Co 38-42%, Cr 15-30%, Ni 14-16 %, Mo 6-8%, Mn 1-3%, Be, C <1%, Fe ostatak ≤25%
In-Ovation C	Dentsply GAC, Bohemia, SAD	samoligirajuće keramičke s čeličnom kvačicom punktiranom rodijem	Baza: 99.9% aluminum oxide Kvačica: Ni 10-50%, Co 10-50%, Cr 1- 30%, Mb 0-20%, Fe, Nb, Ti 0-5% Obloženost klipa: Rh
Damon 3	Ormco, Orange, SAD	samoligirajuće čelično – kompozitne s čeličnom kvačicom	Baza: SS<30% (Fe 73%, Cr 12%, Ni 7%, Mn 2%, Si 1%, C <1%), poli-(2,2- bis-(fenilen) propan karbonate 40-60%, e-tip stakleno punilo (kalcijum-alumini- borsilikate) <20% Kvačica: Cr 15.5-17.5%, Ni 3-5%, Cu 3-5%, Mn, Si 1%, C, P, S, Nb <1%, Fe ostatak ≤75%

Kultura stanica na kojoj se obavljalo *in vitro* ispitivanje bila je linija stanica mišjih fibroblasta L929. Sve stanice su uzgajane u kulturi u Dulbecco modificiranom Eagle mediju – DMEM (Sigma Chemicals, St. Louis, SAD) obogaćenom 10% fetalnim goveđim serumom (Gibson BRL, Grand Island, SAD) te uz dodatak 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina, 2mM L-glutamina i 11 mM natrij bikarbonata. Stanice su uzgajane do konfluentnosti u Petrijevim posudama za kulture stanice promjera 100 mm (Sigma Aldrich Co, St. Louis, SAD) u količini 2×10^6 stanica u atmosferi s 5% CO₂ pri 37°C tijekom 24 sata te održavane u kulturi presađivanjem 0.25% otopinom tripsina (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, California, SAD).

Za simulaciju medija sline rabljen je preparat umjetne sline Glandosane (Stada Arzneimittel, Beč, Austrija) koji sadrži 10.15 g / L karmeloze -natrija, 30.45 g / L sorbitola, 1.22 g / L kalij klorida, 0.86 g / L natrij klorida, 0.05 g / L magnezij klorid - heksahidrata, 0.15 g / L kalcij klorid - dihidrata i 0.35 g / L kalij monohidrogenfosfata u destiliranoj vodi, a pH vrijednost od 6.75 ± 0.15 prilagodila se i kontrolirala 10 N otopinom NaOH.

Za izolaciju genomske DNA iz stanica rabio se komplet GenElute Mammalian Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich Co, St. Louis, SAD). Za određivanje oksidacijskog stresa rabio se OxiSelect Oxidative Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation) (Cell Biolabs, San Diego, SAD) imunoenzimatski test razvijen za brzu detekciju i kvantifikaciju 8-OHdG, a očitavanja apsorbance se obavljalo na spektrofotometru Start Fax 2010 (Awarenes Technology, Palm City, USA) filtrom od 620 nm.

3.2. Metode

Priprema uzoraka

Bravice i polietilenske epruvete su izvagane i autoklavirane te su bravice umetnute u epruvete i dodana je umjetna slina u količini 1 mL sline po 0,2 g mase bravica prema ISO standardu (83). Slini je prethodno dodan 10 M NaOH pufer radi održavanja pH vrijednosti 6.75 ± 0.15 . Uzorci su rađeni u triplicatu, a pokus ponavljan dvaput. Epruvete s uzorcima i slinom su pohranjene u inkubatoru na temperaturi od 37°C i 5% CO_2 u stacionarnim uvjetima 30 dana. Umjetna slina s puferom, koja je služila kao negativna kontrola, pohranjena je na isti način. Nakon protoka 30 dana slina se pretočila u nove sterilne epruvete te pohranila na 4°C do daljnje analize.

Uzgoj kulture stanica

Za to vrijeme se uzgojila primarna kultura stanica mišjih fibroblasta L929 u plastičnim polistirenskim Petrijevim posudama promjera 100 mm (Sigma Aldrich Co, St. Louis, SAD) u Dulbecco modificiranom Eagle mediju DMEM (Sigma Chemicals, St. Louis, SAD) obogaćenim 10% fetalnim goveđim serumom FBS (Gibson BRL, Grand Island, SAD) te uz dodatak 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomicina, 2mM L-glutamina i 11 mM natrij bikarbonata. Stanice su u svakoj Petrijevoj posudi uzgajane do konfluentnosti u količini 2×10^6 stanica u atmosferi s 5% CO_2 pri 37°C tijekom 24 sata te su održavane u kulturi presađivanjem s 0.25% otopinom tripsina (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, California, SAD).

Na pripremljenu atherentnu kulturu stanica mišjih fibroblasta u količini 2×10^6 smještenu u Petrijeve posude, dodalo se po 200 μL svakog uzorka sline u kojoj su bile potopljene pojedine bravice. Prethodno se odstranilo pola količine medija te se u preostalu količinu dodala spomenuta količina uzorka sline, lagano promiješalo naginjanjem Petrijeve

posude i ostavilo da djeluje na stanice četiri sata u inkubatoru. Time je postignuto da se ne dobije preveliko razrjeđenje uzoraka slina s medijem za uzgoj stanica te da se dobije jači utjecaj uzoraka slina na kulturu stanica. Nakon četiri sata dodana je preostala količina medija potrebnog za normalni rast stanica, lagano promiješalo nagnjanjem Petrijeve posude i ponovno pohranilo u inkubator na 48 sati pri 37°C i 5% CO₂. Za negativnu kontrolu stanicama je dodana sama umjetna slina s puferom, a za pozitivnu kontrolu 0.1 mM H₂O₂. Kao apsolutna kontrola koristila se kultura stanica s medijem za normalni rast stanica, ali bez eksponiranja ikakvim agensima.

Određivanje vijabilnosti stanica

Nakon 48 sati uzorci su vađeni iz inkubatora, pipetom se pokupio i odstranio medij, dodalo se 1,5 mL fosfatnog pufera sa soli (PBS) (Sigma Chemicals, St. Louis, SAD), malo se promiješalo, pokupio se pufer te dodalo 1 mL toplog tripsina te ponovno pohranilo u inkubator na 37°C da se razore kolagene veze i odlijepe stanice od podloge. Nakon toga su se posude izvadile iz inkubatora, lagano se protreslo rubom svake posude uz rub stola i pogledalo na svjetlosnom mikroskopu jesu li se stanice odlijepile. Tripsinizacija je zasutavljena dodavanjem 6 mL toplog 10% DMEM-a. Pipetom se pokupio sav sadržaj i prebacio u plastičnu epruvetu (Corning Orange cap 50 mL, Sigma Aldrich Co, St. Louis, SAD) te resuspendirao laganim navlačenjem i izbacivanjem iz pipete desetak puta da se dobije homogena otopina, pri čemu se tekućina nije do kraja ni uvukla ni ispustila iz pipete. Iz te suspenzijske otopine stanica uzelo se 20 µL i pomiješalo s 200 µL 10% otopine tripanskog modrila (Sigma Chemicals, St. Louis, SAD) prethodno položenoga u mikrotitarsku ploču. Tripan specifično boji mrtve stanice u plavo, a pomoću Neubauerove komorice (Blau brand, Wertheim, Njemačka) i svjetlosnog mikroskopa (Olympus BM-2, Olympus, Center Valley, SAD) prebrojene su žive i mrtve stanice. Iz toga je izračunana vijabilnosti prema formuli:

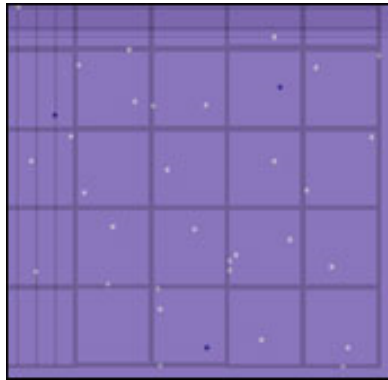
$$\text{Indeks vijabilnosti} = \frac{\text{broj živih stanica}}{\text{broj živih+mrtvih stanica}} \times 100.$$

Također je izračunan i broj stanica u svakom uzorku prema formuli:

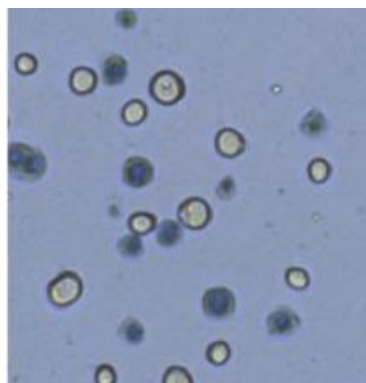
$$\text{broj stanica} \times 90 \text{ (razrijeđenje)} \times 10^3 \text{ na 1 mL uzorka.}$$

Promjena broja stanica od početnih 2×10^6 (T1) do konačnog broja dobivenog nakon izlaganja uzorcima umjetne slinje tijekom 48 sati (T2) izračunana je prema formuli:

$$\frac{N(T2) - N(T1)}{N(T1)}$$



Slika 9. Određivanje broja i vijabilnosti stanica bojenjem tripanskim modrilom



Slika 9. Prikaz stanica kod brojenja u Neubauerovoj komorici

Izolacija genomske DNA

Za izolaciju genomske DNA iz svake Petrijeve posude rabio se *GenElute Mammalian Genomic DNA Kit* (Sigma Aldrich Co, St. Louis, SAD) prema uputi proizvođača. Komponente kita su do uporabe pohranjene na sobnoj temperaturi. Reagensi koji su prethodno bili precipitirali prije korištenja zagrijani su na 60°C da se precipitati otope te ohlađeni na sobnu temperaturu. Reagensi su pripremljeni prema uputi proizvođača. Razrijedio se koncentrat otopine za ispiranje – kako se radilo o kitu za 70 uzoraka s 80 mL etanola (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Otopilo se 10 mg praha proteinaze K u 0.5 mL bidestilirane vode da bi se dobilo 20 mg/mL otopine.

Kako se broj uzgojenih stanica u dva dana, koliko je trajalo izlaganje u umjetnoj slini, sa 2×10^6 popeo na $>5 \times 10^6$ stanica za izolaciju DNA, rabilo se 5×10^6 stanica iz svakog uzorka koje su se centrifugirale u epruveti 5 minuta na 300x g i uklonio medij. Stanice su se resuspendirale u 200 μ L resuspenzijske otopine (PBS) u koju je dodano 20 μ L otopine RNaze A te je inkubirano 2 minute na sobnoj temperaturi. Dodatkom RNaze je iz genomske DNA uklonjena RNA.

Za lizu stanica promiješano je 20 μ L otopine proteaze K i 200 μ L otopine C za lizu stanica te je dodano u resuspendirane stanice. Miješalo se u vibracijskom mješaču (vorteks) 15 sekunda da bi se dobila homogena smjesa te inkubiralo 10 minuta u vodenoj kupelji na 70°C. Vrijeme preparacije nakon lize bilo je 10 minuta.

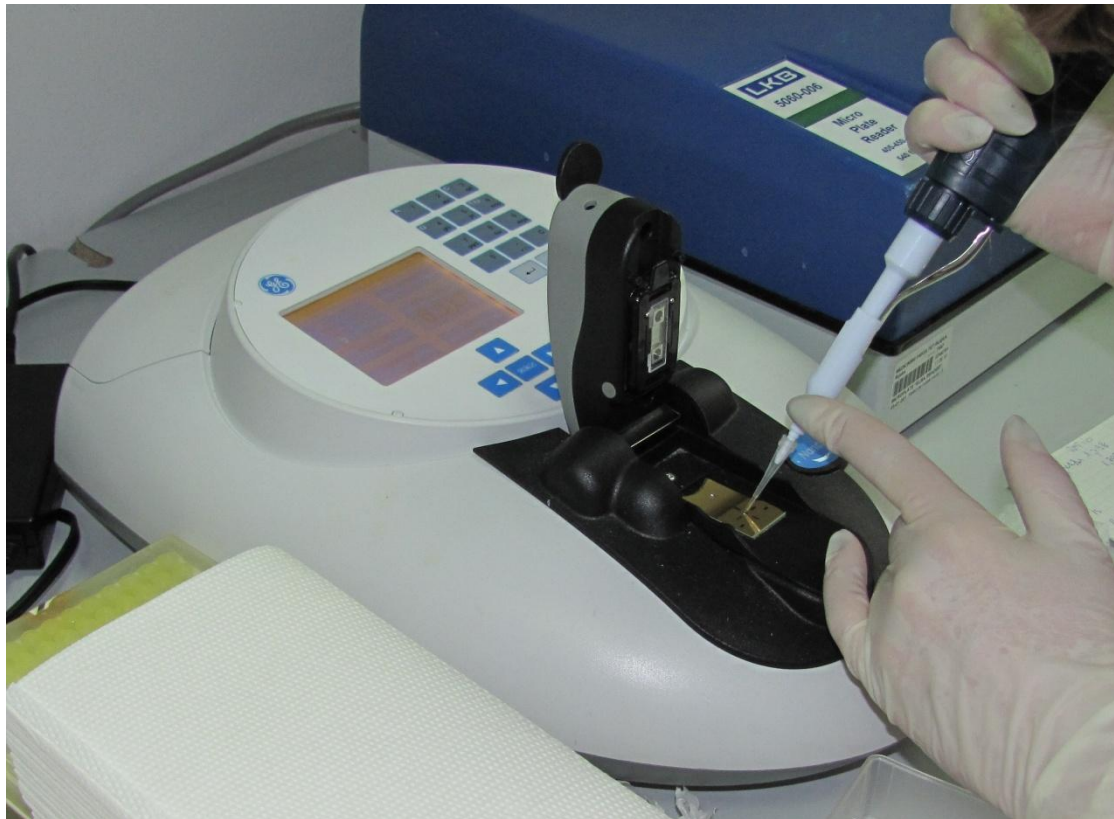
Priprema kolone obavljena je tako da se u prethodno pripremljenu GenElute Miniprep Binding specijalnu epruvetu s crvenim prstenom dodalo 500 μ L otopine za preparaciju kolone u svaku epruvetu te centrifugiralo na 12 000 x g jednu minutu. Otopina s dna epruvete se odstranila. Otopina za pripremu kolone maksimalizira vezivanje DNA na kolonu, što rezultira konzistentnim rezultatom.

Pripremne radnje za vezanje DNA uključivale su dodavanje 200 μ L 95% etanola na lizat stanica smješten u epruveti te miješanje na vorteksu 5-10 sekundi, čime se dobila

homogena otopina. Prebacio se cijeli sadržaj epruvete s liziranim stanicama u pripremljenu kolonu za vezivanje. Koristila se pipeta širokog vrha da bi se reduciralo smicanje DNA pri prijenosu. Centrifugiralo se na 6 500 x g jednu minutu. Kolona za vezivanje prebačena je u novu epruvetu od 2 mL, a prethodna se epruveta s tekućim sadržajem bacila.

Provedeno je prvo ispiranje kolone. Prije prvog korištenja 95% - tnim etanolom razrijeđena je koncentrirana otopinu za ispiranje prema uputama proizvođača. Dodalo se 500 µL otopine za ispiranje na kolonu za vezanje i centrifugiralo jednu minutu na 6 500 x g. Opet se prebacila kolona za vezanje u novu epruvetu od 2 mL te bacila stara epruveta s tekućinom. Nakon toga je provedeno drugo ispiranje kolone. Dodano je 500 µL otopine za ispiranje na kolonu za vezivanje i centrifugiralo se tri minute na brzini od 12 000 x g da bi osušili kolonu za vezanje od alkohola prije eluiranja DNA. Na kraju se uklonio tekući sadržaj, a kolona se prebacila u novu epruvetu od 2 mL.

Pristupilo se eluiranju DNA. Pipetom se nanijelo 200 µL elucijske otopine (Tris EDTA) direktno na centar kolone za vezivanje, inkubiralo pet minuta na sobnoj temperaturi te centrifugiralo jednu minutu na 6 500 x g da bi se DNA odvojila od kolone. Dobiveni eluat je sadržavao čistu genomsku DNA. Kako je nastavak obrade slijedio sutradan, DNA je pohranjena na 4°C. Količina i kakvoća ekstrahirane DNA određena je spektrofotometrijski pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm na uređaju NanoVue (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska). Mjerenje pri 260 nm omogućuje određivanje količine DNA, a omjer očitavanja na 260 i 280 nm daje informaciju o čistoći DNA. Za određivanje količine i kakvoće ekstrahirane DNA otopljen je DNA u TE puferu (10 mM Tris. HCl, 1 mM EDTA, pH 8-8,5). ApSORBANCA bi trebala biti između 0.1 i 1.0. ApSORBANCA od 1.0 pri 260 nm odgovara otprilike 50 µg/mL dvostruko upletene DNA. Omjer očitavanja pri 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}) trebao bi biti 1.6-1.9.

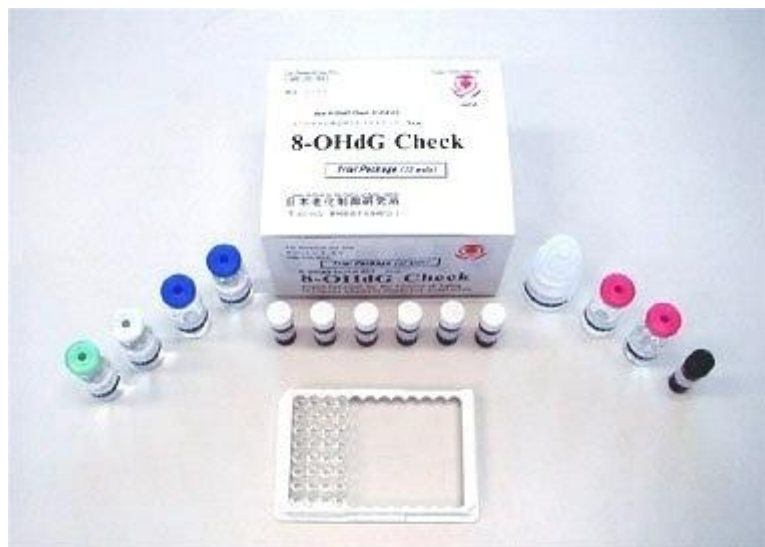


Slika 11. Spektrofotometar NanoVue za očitavanje količine i kakvoće DNA

Za daljnju analizu korištena je ekstrahirana DNA u koncentraciji 0.1 mg/mL. Uzorak je konvertiran u jednolančanu DNA inkubacijom uzorka DNA na 95°C tijekom pet minuta i brzim hlađenjem na ledu. Zatim je DNA digestirana u nukleozide inkubacijom denaturirane DNA s 10 U nukleaze P1 (Sigma Aldrich Co, St. Louis, SAD) tijekom dva sata na 37°C u 20 mM natrij acetatu pH 5.2 te tretirana sa 5 U alkalne fosfataze (Sigma Aldrich Co, St. Louis, SAD) tijekom jednog sata na 37°C u 100 mM Tris puferu pH 7.5. Reakcijska mješavina je centrifugirana pet minuta na 6 000 x g, a supernatant se rabio za ispitivanje koncentracije biljega oksidacijskog stresa (8-OHdG).

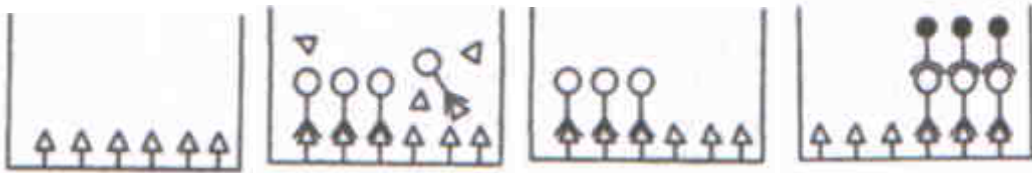
Određivanje koncentracije biljega oksidacijskog stresa

Oksidacijsko oštećenje DNA određivano je pomoću kompetitivnoga imunoenzimskog testa (ELISA) sadržanog u *OxiSelect Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation)* (Cell Biolabs, San Diego, SAD) prema uputama proizvođača.



Slika 12. ELISA kit

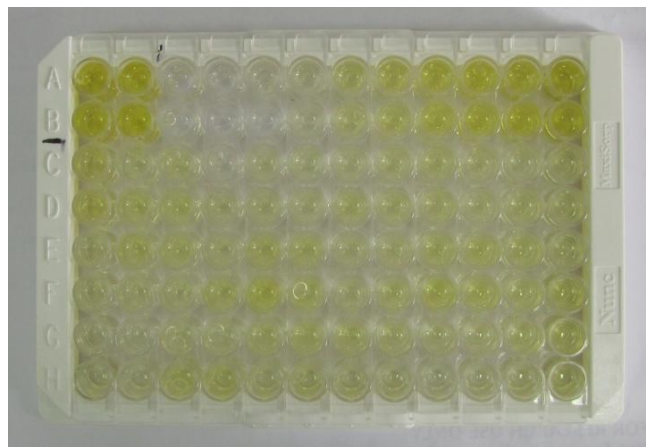
Pripremljena je mikrotitracijska ploča na način da se otopio OHdG konjugat (1 mg/mL) u 1 μ g/mL u 1 x fosfatnog seruma sa soli. Na mikrotitracijske pločice s 96 jažica unijelo se mikropipetama u svaku jažicu 100 μ L 8-OHdG konjugata koncentracije 1 μ g / mL i inkubiralo preko noći na 4°C. Sutradan se uklonila oblažuća otopina 8-OHdG i jednom ispralo s deioniziranom vodom te posušilo postavljanjem pločice na papirnate ubruse da se ukloni višak tekućine. Dodalo se 200 μ L otapala iz kita u svaki zdenac i blokiralo jedan sat na sobnoj temperaturi. Pločica se prebacila na 4°C, a otapalo uklonilo neposredno prije daljnjeg korištenja pločice. Pufer za ispiranje pripremio se na način da se 10 x koncentrat pufera razrijedio u 1 x deioniziranom vodom te promiješao do homogenosti. Neposredno prije korištenja pripremila su se 8-OHdG antitijela i sekundarna antitijela u razrijeđenju 1:500 za antitijela i 1:1000 za sekundarna antitijela s otapalom iz kita.



Slika 13. Procedura ELISA testa



Slika 14. Zaustavljanje enzimske reakcije ELISA-e



Slika 15. Mikrotitarska pločica s uzorcima nakon provedene ELISA-e

Priprema standardne krivulje

Pripremljena je serija otopina 8-OHdG standarda u koncentracijskom rasponu od 0 ng/mL do 20 ng/mL, razrjeđujući 8-OHdG standard u otapalu prema tablici 2.

Tablica 3. Omjer 8-OHdG standard i otapala

Epruveta standarda	8-OHdG standard (μL)	Otapalo (μL)	8-OHdG (ng/mL)
1	10	990	20
2	500 epruvete# 1	500	10
3	500 epruvete# 2	500	5
4	500 epruvete# 3	500	2,5
5	500 epruvete# 4	500	1,25
6	500 epruvete # 5	500	0,625
7	500 epruvete # 6	500	0.313
8	500 epruvete # 7	500	0.156
9	500 epruvete#8	500	0.078
10	0	500	0

Pripremio se supernatant ekstrahirane DNA iz uzoraka kulture stanica. Svaki uzorak i standard se testirao u duplikatu. Po 50 μL uzorka ekstrahirane DNA svakog uzorka i 8-OHdG standarda unesen je u jažice obložene konjugatom i inkubirao na sobnoj temperaturi deset minuta na orbitalnom mješaču. Dodalo se 50 μL otopine 8-OHdG monoklonskih antitijela (u prethodno pripremljenom razrijeđenju 1:500) i inkubiralo na sobnoj temperaturi jedan sat na orbitalnom mješaču. Mikrotitarska ploča se isprala tri puta sa 250 μL 1 x pufera za ispiranje po jažici s temeljitom aspiracijom između svakog ispiranja. Nakon zadnjeg ispiranja jažice su ispražnjene, a ostatak pufera uklonio polaganjem na papirnati ubrus. Dodalo se 100 μL

sekundarnih antitijelo-enzimskih konjugata u svaku jažicu u prethodno pripremljenom razrijeđenju 1:1000 te inkubiralo na sobnoj temperaturi još sat vremena na orbitalnom mješaču. Nakon toga se opet ispralo sa 250 μ L pufera za ispiranje po jažici s temeljitom aspiracijom između svakog ispiranja. Nakon zadnjeg ispiranja posušeno je papirnatim ubrusom da bi se uklonio ostatak pufera. Zatim se dodalo 100 μ L supstratske tekućine zagrijane na sobnu temperaturu u svaku jažicu, uključujući i one prazne, te se inkubiralo na sobnoj temperaturi na orbitalnom mješaču 15 minuta. Enzimatska reakcija se zaustavila dodatkom tekućine stopera u svaku jažicu, uključujući i prazne jažice. Rezultati su odmah očitani na spektrofotometru na valnoj duljini 620 nm. Pomoću izrađenoga grafa standardne krivulje u rasponu koncentracija od 0 do 20 ng / mL za svaku dobivenu valnu duljinu uzoraka očitana je njezina ekvivalentna koncentracija 8-OHdG markera u ng/mL. Prema navođenju proizvođača osjetljivost testa je u rasponu od 100 pg/mL do 20 ng/mL.



Slika 16. Spektrofotometar Stat Fax 2100 za očitavanje razine biljega oksidacijskog stresa

3.3. Statistička obrada podataka

Prosječne vrijednosti indeksa vijabilnosti, promjene broja stanica prije izlaganja i nakon njega, čistoće i koncentracije DNA te koncentracije markera oksidacijskog stresa za svaki tip bravica, prikazane su kao aritmetičke sredine i standardne devijacije. Usporedba razlika navedenih parametara između tipova bravica provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) Sidakovim post-hoc testom. Isti test rabljen je i za usporedbu s pozitivnom, negativnom i apsolutnom kontrolom. Za analizu podataka rabljen je statistički softver SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, SAD) uz razinu značajnosti $p < 0.05$.

4. REZULTATI

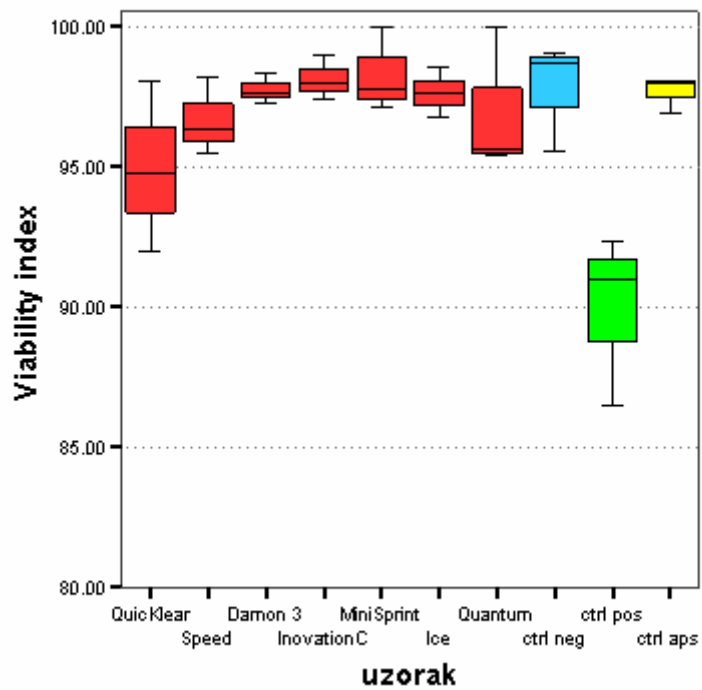
4.1. Vijabilnost

Indeks vijabilnosti se statistički značajno razlikovao između ispitivanih skupina (Tablica 4 i slika 17; $p=0.001$). Najmanje preživljavanje stanica zabilježeno je u skupini izloženoj H_2O_2 kao pozitivnoj kontroli (89.9 ± 3.1) koja se statistički značajno razlikuje od svih skupina ($p<0.05$), osim QuicKlear (94.9 ± 3.3 ; $p=0.18$). Vijabilnost objašnjava 71% varijabiliteta između tipova bravica i kontrole.

Tablica 4. Prosječne vrijednosti indeksa vijabilnosti

Uzorak	Prosjek*	Std. devijacija	95% interval pouzdanosti donja – gornja granica		Minimum	Maksimum
QuicKlear	94.9317 ^{ab}	3.0338	87.3953	102.4681	92.00	98.06
Speed	96.6540 ^a	1.3841	93.2157	100.0923	95.48	98.18
Damon 3	97.7427 ^a	0.5491	96.3787	99.1067	97.25	98.33
In-Ovation C	98.1222 ^a	0.7713	96.2062	100.0383	97.42	98.95
MiniSprint	98.2692 ^a	1.5334	94.4599	102.0785	97.08	100.00
Ice	97.6337 ^a	0.8820	95.4427	99.8247	96.77	98.54
Quantum	96.9862 ^a	2.6123	90.4969	103.4755	95.37	100.00
kontr. negativna	97.7514 ^a	1.9389	92.9349	102.5679	95.52	99.05
kontr. pozitivna	89.9258 ^b	3.0720	82.2944	97.5571	86.46	92.31
kontr. apsolutna	97.6541 ^a	0.6334	96.0807	99.2275	96.92	98.04
Total	96.5671	2.8964	95.4856	97.6486	86.46	100.00

* ANOVA $p=0.001$; $\eta^2=0.708$. Ista slova indiciraju da nema statistički značajnih razlika između uzoraka temeljem Sidakova post-hoc testa.



Slika 17. Usporedba prosječnih vrijednosti indeksa vijabilnosti prikazana dijagramom s pravokutnikom (median, kvartilni raspon, minimalna i maksimalna vrijednost)

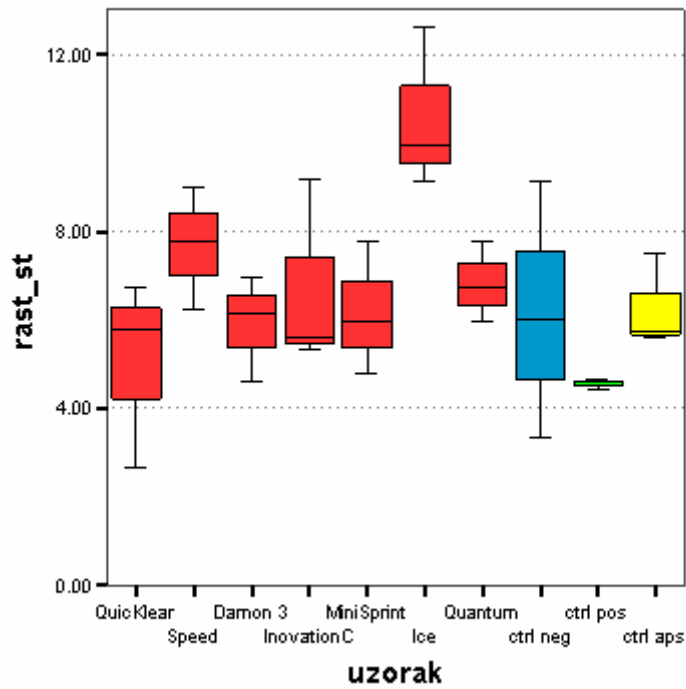
4.2. Prirast stanica

Razlike u prosječnom prirastu broja stanica između inicijalnih i onih nakon 48-satnog izlaganja uzorcima sline između uzoraka statistički su značajne (Tablica 5 i slika 18; $p=0.024$). Skupina Ice bravica ima najveći porast broja stanica (10.6 ± 1.8), statistički značajno veći od skupine QuicKlear (5.1 ± 2.2 ; $p=0.032$) te skupine izložene vodikovom peroksidu kao pozitivnoj kontroli (4.6 ± 0.1 ; $p=0.014$) koja ujedno ima i najmanji porast broja stanica. Razlike između ostalih skupina bravica te kontrola nisu statistički značajne. Razlika u prirastu stanica između tipova bravica i kontrola objašnjava 56.2% varijabiliteta.

Tablica 5. Prosječne vrijednosti promjene broja stanica prije izlaganja agensu i nakon njega

Uzorak	Prosjek*	Std. devijacija	95% interval pouzdanosti donja – gornja granica		Minimum	Maksimum
QuicKlear	5.0667 ^a	2.1461	-0.2646	10.3979	2.65	6.75
Speed	7.6833 ^{ab}	1.3787	4.2584	11.1082	6.25	9.00
Damon 3	5.9000 ^{ab}	1.1948	2.9320	8.8680	4.60	6.95
In-Ovation C	6.7167 ^{ab}	2.1543	1.3652	12.0681	5.35	9.20
MiniSprint	6.1833 ^{ab}	1.5135	2.4235	9.9432	4.80	7.80
Ice	10.5833 ^b	1.8339	6.0276	15.1391	9.15	12.65
Quantum	6.8333 ^{ab}	0.9278	4.5285	9.1381	5.95	7.80
kontr. negativna	6.1667 ^{ab}	2.9036	-1.0463	13.3796	3.35	9.15
kontr. pozitivna	4.5667 ^a	0.1041	4.3081	4.8252	4.45	4.65
kontr. apsolutna	6.2833 ^{ab}	1.0563	3.6593	8.9074	5.60	7.50
Total	6.5983	2.1248	5.8049	7.3918	2.65	12.65

* ANOVA $p=0.024$; $\eta^2=0.562$. Ista slova indiciraju da nema statistički značajnih razlika između uzoraka temeljem Sidakova post-hoc testa.



Slika 18. Usporedba prosječnih vrijednosti prirasta stanica prikazana dijagramom s pravokutnikom

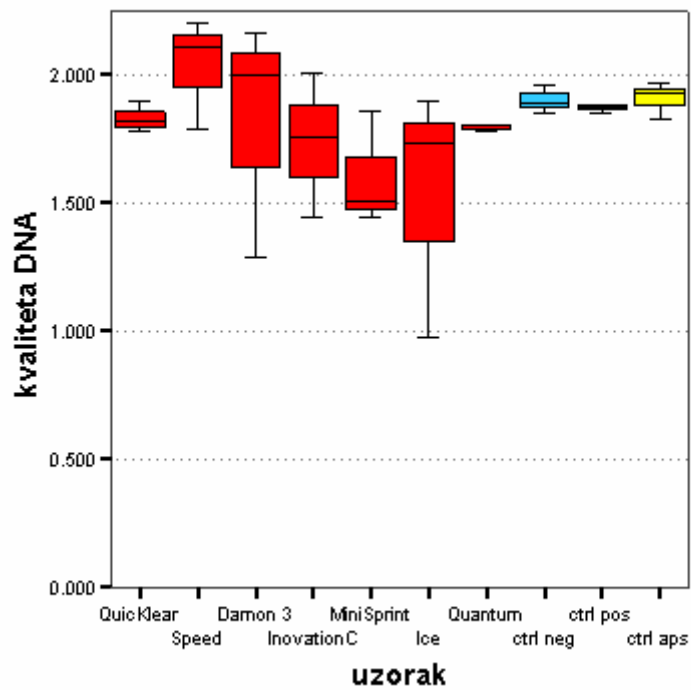
4.3. Kvaliteta DNA

Prosječne vrijednosti kvalitete ekstrahirane DNA kretale su se u rasponu od 1.5 ± 0.5 za Ice i 2.0 ± 0.2 za Speed i nisu se statistički značajno razlikovale između uzoraka (Tablica 6, Slika 19; $p=0.462$).

Tablica 6. Prosječne vrijednosti kvalitete DNA

Uzorak	Prosjek*	Std. devijacija	95% interval pouzdanosti donja – gornja granica		Minimum	Maksimum
QuicKlear	1.83000	0.06121	1.67794	1.98206	1.777	1.897
Speed	2.03433	0.21718	1.49483	2.57383	1.789	2.202
Damon 3	1.81567	0.46759	0.65410	2.97724	1.284	2.163
In-Ovation C	1.73533	0.28301	1.03229	2.43838	1.443	2.008
MiniSprint	1.60267	0.22250	1.04995	2.15539	1.444	1.857
Ice	1.53233	0.49223	0.30958	2.75509	0.972	1.895
Quantum	1.79533	0.01079	1.76854	1.82213	1.783	1.803
kontr. negativna	1.90167	0.05551	1.76377	2.03956	1.851	1.961
kontr. pozitivna	1.86933	0.01595	1.82972	1.90895	1.851	1.880
kontr. apsolutna	1.90733	0.06892	1.73612	2.07855	1.831	1.965
Total	1.80240	0.25540	1.70703	1.89777	0.972	2.202

* ANOVA $p=0.462$.



Slika 19. Usporedba prosječnih vrijednosti kvalitete DNA prikazana dijagramom s pravokutnikom

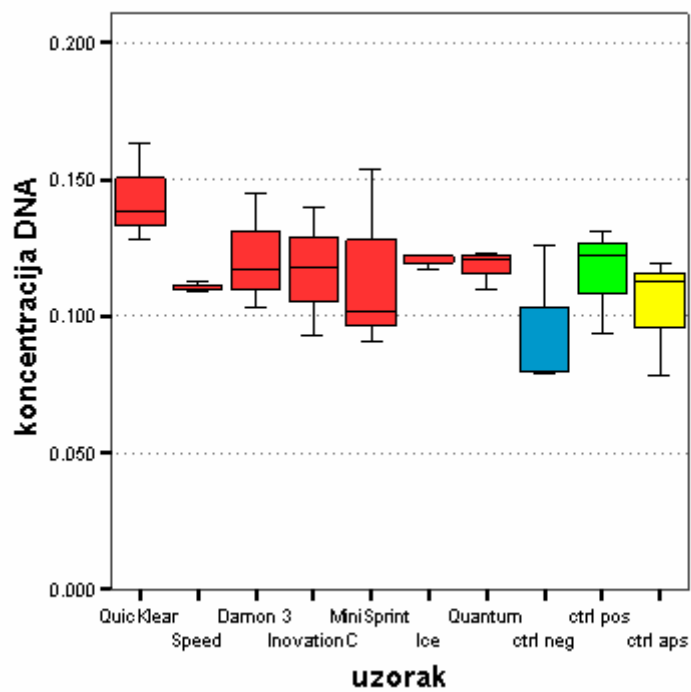
4.4. Koncentracija DNA

Prosječne vrijednosti koncentracija DNA kretale su se u rasponu od 0.1 ± 0.03 za negativnu kontrolu do 0.14 ± 0.02 za QuicKlear i nisu se statistički značajno razlikovale (Tablica 7, slika 20; $p=0.378$).

Tablica 7. Prosječne vrijednosti koncentracije DNA

Uzorak	Prosjek*	Std. devijacija	95% interval pouzdanosti donja – gornja granica		Minimum	Maksimum
QuicKlear	0.14300	0.01803	0.09822	0.18778	0.128	0.163
Speed	0.11067	0.00208	0.10550	0.11584	0.109	0.113
Damon 3	0.12167	0.02139	0.06854	0.17479	0.103	0.145
In-OvationC	0.11700	0.02352	0.05858	0.17542	0.093	0.140
MiniSprint	0.11567	0.03365	0.03207	0.19926	0.091	0.154
Ice	0.12033	0.00289	0.11316	0.12750	0.117	0.122
Quantum	0.11800	0.00700	0.10061	0.13539	0.110	0.123
kontr. negativna	0.09500	0.02685	0.02829	0.16170	0.079	0.126
kontr. pozitivna	0.11567	0.01929	0.06773	0.16360	0.094	0.131
kontr. apsolutna	0.10333	0.02214	0.04832	0.15834	0.078	0.119
Total	0.11603	0.02073	0.10829	0.12378	0.078	0.163

* ANOVA $p=0.378$.



Slika 20. Usporedba prosječnih vrijednosti koncentracija DNA prikazana dijagramom s pravokutnikom

4.5. Koncentracije biljega oksidacijskog stresa

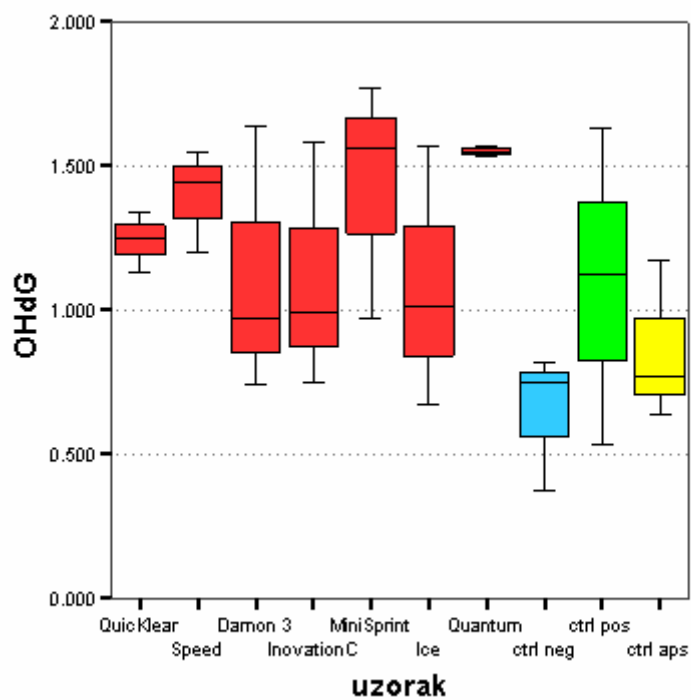
Tablica 8. Prosječne vrijednosti koncentracije biljega oksidacijskog stresa 8-OHdG

Uzorak	Prosjek*	Std. devijacija	95% interval pouzdanosti donja – gornja granica		Minimum	Maksimum
QuicKlear	1.25000 ^{abc}	0.10536	0.97828	1.50172	1.130	1.340
Speed	1.419667 ^{ab}	0.14898	0.95206	1.84127	1.200	1.550
Damon 3	1.11667 ^{abc}	0.41758	-0.04487	2.27821	0.740	1.640
In-OvationC	1.11567 ^{abc}	0.40272	0.04563	2.16770	0.750	1.580
MiniSprint	1.43533 ^{ab}	0.35477	0.40299	2.46368	0.970	1.770
Ice	1.08833 ^{abc}	0.42444	-0.04560	2.21227	0.670	1.570
Quantum	1.56000 ^b	0.02000	1.50032	1.59968	1.530	1.570
kontr. negativna	0.64700 ^c	0.24236	0.04495	1.24905	0.370	0.820
kontr. pozitivna	1.09333 ^{abc}	0.50348	-0.27415	2.46081	0.530	1.630
kontr. apsolutna	0.87000 ^{ac}	0.25622	0.17382	1.54618	0.640	1.170
Total	1.15720	0.39362	1.00572	1.29968	0.370	1.770

* ANOVA $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.437$. Ista slova indiciraju da nema statistički značajnih razlika između uzoraka temeljem Sidakova post-hoc testa.

Prosječne vrijednosti koncentracija biljega oksidacijskog stresa 8-OHdG statistički su se značajno razlikovale između skupina ($p < 0.001$), a kretale su se u rasponu od 0.7 ± 0.2 ng / mL za negativnu kontrolu do 1.6 ± 0.02 ng / mL za kompozitne Quantum bravice (Tablica 8, slika 21). Statistički značajno veća koncentracija biljega oksidacijskog stresa zabilježena je u potpunih metalnih bravica Speed (1.4 ± 0.2) i MiniSprint (1.4 ± 0.4) te u poliuretanskih Quantum bravica (1.6 ± 0.02) u usporedbi s negativnom kontrolom (0.7 ± 0.2 ; $p < 0.05$). Sve skupine bravica su imale koncentraciju biljega veću od skupine izložene H_2O_2 kao pozitivne

kontrole (1.1 ± 0.5), osim Ice (1.09 ± 0.4) koja je imala nešto nižu. Najnižu razinu oksidacijskog stresa imale su negativna (0.7 ± 0.2) i pozitivna kontrola (1.1 ± 0.5). Razlike u koncentraciji biljega oksidacijskog stresa između tipova bravica objašnjavaju 56.2% varijabiliteta.



Slika 21. Usporedba prosječnih vrijednosti koncentracija biljega oksidacijskog stresa prikazana dijagramom s pravokutnikom

5. RASPRAVA

Materijali koji se koriste u dentalnoj medicini, u oralnom su okruženju predmet elektrokemijskih i kemijskih reakcija te mehaničkih sila žvakanja i trošenja (84). Ortodoncija ima za cilj omogućiti pacijentu dobru estetiku, fonetiku, funkciju žvačnog aparata te zadovoljavajući položaj i odnos zuba i čeljusti. Da bi postigli željena pomicanja zuba, pacijentima se stavljaju u usta razne vrste bravica, lukova i prstenova te se pričvršćuju na zube na prosječno dvije do tri godine, koliko traje ortodontski tretman. Najčešće se koriste bravice od metala, keramike, polikarbonata i kompozita. Svi ovi materijali imaju vlastite fizičke i mehaničke osobine koje se mogu promijeniti pod utjecajem čimbenika u usnoj šupljini. Biokompatibilnost materijala znači odgovarajući odgovor organizma, koji u dentalnoj medicini znači odsustvo štetnih reakcija ili toleriranje štetne reakcije na organizam u prisustvu danog materijala (85). Kako su ortodontske naprave smještene uz različita tkiva na kojima mogu izazvati razne vrste reakcija, potrebno je odrediti nivoe biokompatibilnosti bravica od različitih materijala koje su smještene u promjenljivim uvjetima usne šupljine. Prijašnje studije su pokazale da metalne bravice mogu korodirati u oralnom okruženju te oslobađaju metalne ione (86).

Iako su postojaniji od metala, izgleda da keramika, polikarbonati i umjetni safir, koji se koriste za izradu estetskih komponenti novijih ortodontskih bravica, ipak nisu inertni materijali. Kako genotoksičnosti obuhvaća mutagene i kancerogene procese, ispitivanja i poznavanje genotoksičnih svojstava materijala ortodontskih naprava morale bi biti bitan kriterij za odabir naprave da bi imala siguran biološki učinak za pacijente (81, 82). *In vitro* proučavanja su jednostavna, nisu skupa za provođenje, pružaju značajnu količinu informacija i mogu se provesti pod kontroliranim uvjetima te razjasniti mehanizme stanične toksičnosti. Rezultati dobiveni *in vitro* analizom mogu biti indikativni za efekte zabilježene *in vivo*, iako prisustvo citotoksičnog efekta *in vitro* ne znači da je materijal toksičan za *in vivo* primjenu. Ipak, odsustvo citotoksičnog efekta je jamstvo dobrog kliničkog odgovora (87). Stoga je cilj

ovog istraživanja bio ispitati uzrokuju li ortodontske bravice oksidacijski stres u *in vitro* uvjetima i postoje li razlike između bravica izrađenih od raznih metalnih i estetskih materijala. U ispitivanju su korištene samo nove, nekorištene bravice. Kao model za istraživanje izabrana je linija stanica mišjih fibroblasta koji simuliraju fibroblaste oralne sluznice čovjeka. Prednost korištenja imortaliziranih staničnih linija za istraživanje je ta što se one mogu dijeliti u nedogled u kulturi. Izvođenje analize na primarnim stanicama tkiva donora (npr. stanice humanih gingivnih fibroblasta) nema nekih prednosti i iziskuje brojne etičke dvojbe.

Procjena vijabilnosti stanica je jedan od prvih testova za inicijalno vrednovanje kompatibilnosti materijala prema preporuci Međunarodne organizacije za standardizaciju i Vijeća za dentalne materijale, instrumente i opremu Američke dentalne udruge (*International Organization for Standardization, Council on Dental Materials, Instruments and Equipment of the American Dental Association*) (47). U ovom istraživanju sve testirane bravice izazivaju podjednaku vijabilnost koja se statistički značajno ne razlikuje između tipova bravica, te s negativnom i apsolutnom kontrolom. Metalne bravice su u pogledu vijabilnosti bile slične nemetalnim bravicama koje su napravljene od keramike i polimera. Nedostatak razlika između uzoraka je pokazao da prisustvo metalnih iona u bravicama od nerhđajućeg čelika, izocijanata u polikarbonatnim bravicama te čestica keramike u keramičkim bravicama, nije utjecao na vijabilnost stanica. Stanice izložene djelovanju H₂O₂ kao pozitivnoj kontroli imaju statistički značajno najmanje preživljavanje stanica prema indeksu vijabilnosti (89.93±3.07), od negativne i apsolutne kontrole, te svih skupina bravica (p<0.05), osim QuicKlear bravica (94.93±3.03; p=0.18). Kako se tijelo QuicKlear bravice sastoji od 99,99 % aluminij oksidne keramike, a kvačica od 38-42% kobalta, 15-30% kroma i 14-16% nikla, manja vijabilnost QuicKlear bravica je vjerojatno posljedica otpuštanja navedenih iona iz kvačice. Iako je razina vijabilnosti tih bravica bila slična onoj pozitivne kontrole, ipak se nije statistički

značajno razlikovala od drugih tipova bravica. Dodatak vodikovog peroksida stanicama u kulturi može voditi u prijelaz metalnog iona ovisnog o hidroksil radikalu koji uzrokuje oštećenje DNA, iako se ovo oštećenje brzo popravi, što je omogućeno time da stanice nisu prikazane nevijabilnim u višku H_2O_2 (88).

Vitral i sur. (47) pokazali su dobru biokompatibilnost keramičkih bravica u pogledu stanične vijabilnosti, ali polikarbonatne i polioksimetilenske bravice su pokazale smanjenje stanične vijabilnosti u vremenu od 24 do 72 sata u odnosu na kontrolnu skupinu i keramiku, iako ne statistički značajno. Stanična vijabilnost u sve tri grupe bila je veća na kraju nego na početku ispitivanja, što autori pripisuju vremenu koje je potrebno da se stanice priviknu na uvjete u mediju. U našem istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u vijabilnosti između metalnih, keramičkih i polimernih materijala (i njihovih kombinacija), što se slaže s nalazima prijašnjih studija (47, 89). Izgleda da korozijski ekstrakti bravica od nerđajućeg čelika ne utječu na vijabilnost u L929 staničnoj kulturi, no izazivaju smanjivanje staničnog metabolizma (59). To ukazuje da je mitohondrijski metabolizam meta korozijskih proizvoda. Ioni nikla, kada su u trivalentnoj formi, izloženi su mitohondrijskom redoksu metabolizma, što vodi do nastajanja srednje reaktivnih radikala kisika, što je toksično za stanice, a i ioni mangana u bravicama od nehrđajućeg čelika koje ne sadrže nikal mogu također uzrokovati mitohondrijsku disfunkciju koja može dovesti do staničnog oksidacijskog stresa (59).

Budući da smo se u našem istraživanju koristili tripanskim modrilom, tripsinizacija bi mogla utjecati na rezultate vijabilnosti, jer ovisi o integritetu stanične membrane i njezinoj permeabilnosti prema tripanskom modrilu. U slučaju da je tripsin ošteti membranske proteine, mogli smo imati nešto manju vijabilnost stanica, ali to ne bi trebalo značajno utjecati na rezultate i ishod istraživanja, s obzirom na to da su sve stanice bile podjednako izložene djelovanju tripsina te se uspoređivalo s pozitivnom, negativnom i apsolutnom kontrolom koje

su tretirane na isti način. Studije pokazuju da bravice od uvjetno istog sastava mogu pokazati značajno različito korozijsko ponašanje u testu izloženosti umjetnoj slini (56).

Skupina Inspire Ice bravica ima najveći porast broja stanica (10.58 ± 1.83), statistički značajno veći od skupine QuicKlear (5.07 ± 2.15 ; $p=0.032$) te skupine izložene vodikovom peroksidu kao pozitivnoj kontroli (4.57 ± 0.10 ; $p=0.014$) koja ujedno ima i najmanji porast broja stanica. Ovaj se rezultat može objasniti sastavom keramičkih bravica koje se nalaze u prirodi u monokristalnoj i polikristalnoj formi. Prednost proizvodnje monokristala je eliminacija mogućih zagađenja ili nedostataka koji su inducirani stresom (**Pogreška! Izvor reference nije pronađen.**). Keramičke bravice su kemijski inertne prema oralnim tkivima i pokazuju slabu reaktivnost u oralnom okruženju (1). Fizičke osobine keramike su rezultat vezivanja njihovih atoma, koji su povezani zajedno ionskim i kovalentnim vezama, koje su jače nego metalne (90). Neke su studije objavile da najveću inhibiciju rasta pokazuju lukovi od nikal – krom - kobalt legure (89), te je potvrđeno da različite legure imaju različit stupanj citotoksičnosti, što potvrđuje i naše testiranje, gdje je keramička bravica s kobalt – krom - niklovom kvačicom (QuicKlear) pokazala najveću inhibiciju rasta. Od ovih sedam testiranih primjeraka, jedino je Ice bravica potpuno keramička, bez nečistoće i primjesa, i zato je najmanje kočila razmnožavanje stanica te izgleda da zato pokazuje bolju biokompatibilnost od drugih testiranih materijala, što se slaže s nalazima drugih autora koji su isto potvrdili u *in vitro* testovima (1,47).

Svi tipovi bravica su inducirali viši stupanj oksidacijskog stresa od pozitivne kontrole, osim keramičkih Ice bravica, no razlika nije bila statistički značajna. U usporedbi s negativnom kontrolom viši stupanj oksidacijskog stresa izazvale su potpune metalne bravice Speed i MiniSprint te poliuretanske Quantum bravice.

Poznato je da je jedan od glavnih uzročnika oksidacijskog stresa vodikov peroksid, koji pretvoren iz tipa slobodnog radikala curi iz mitohondrija. Izgleda da su sva ili većina ljudskih

tkiva izložene nekom nivou H_2O_2 , s mitohondrijima koje su njegov najbogatiji izvor (87). U našem istraživanju smo očekivali najveći nivo DNA oštećenja oksidacijskim stresom na metalnim bravicama, o čemu je izviješteno od drugih autora (10, 11, 49, 54), ali su najveći oksidacijski stres inducirale poliuretanske estetske bravice Quantum. Neke *in vivo* studije su potvrdile da korozijski produkti iz čistog kobalta i čelika nakon jedne godine proizvode najbrže raspadanje poliuretana (92). Prema proizvođačkim podacima o sigurnosti materijala (MSDS), ove poliuretanske bravice se općenito ne smatraju opasnim za zdravlje u obliku u kojem se isporučuju. Ipak, poliuretani su segmentirani polimeri nastali reakcijom segmenata polieter poliola s izocijanatima te bi dok su hidrolitički stabilni mogli biti predmet oksidacijske degradacije (92). Izocijanati su kemijske tvari koje se u reakciji s poliolima široko koriste za proizvodnju poliuretana. Izocijanati pokazuju visoku biološku aktivnost, mogu uzrokovati razne poremećaje zdravstvenog stanja i uzrokovati negativne efekte na plućni i živčani sustav, cirkulaciju periferne krvi i bubrege. Bronhijalna astma je na prvom mjestu od okolišnih bolesti uzrokovanih izloženosti izocijanatima (93). 4,4 metilen diizocijanat (MDI), spoj koji je naveden u sastavu Quantum bravica najvažniji, izocijanat je u kemijskoj industriji. Nakon izloženosti niskim koncentracijama MDI pojavljuju se dvije glavne promjene u ljudskom organizmu - osjetljivost pluća i astma. Proizvođač Quantum bravica u MSDS navodi da se izocijanat i polieter polioli smatraju opasnim primjesama. Izocijanat može biti nereagiran, pa je zato štetan, a drugi može proći oksidaciju *in vivo* i tako stvoriti reaktivne vrste, kao slobodne radikale koji dalje mogu reagirati s organskim molekulama u fiziološkom okruženju (93). Budući da vrućina i vlaga mogu naškoditi polimerima, poliuretani su se mogli oštetiti sterilizacijom u autoklavu, te tako postati skloniji oksidaciji.

Istraživanja ukazuju da i neke druge polimerne estetske bravice mogu otpuštati štetne tvari (94). Watanabe i sur. proučavali su degradaciju polikarbonatnih bravica te stvaranje i

otpuštanje bisfenola A (BPA) *in vivo* (bravice postavljene u oralnoj šupljini tijekom 18 – 40 mjeseci) i *in vitro* (bravice, baza proteze i privremene krunice od polikarbonata potopile su se u vodu na 37°C u razdoblju od 34 mjeseca). Sadržaj BPA i molekularna težina bravica *in vivo* pokazala je tendenciju rasta od 38 - 60 µg/g do 324 - 694 µg/g bravice i smanjenje od 49×10^3 - 54×10^3 µg/g na 43×10^3 - 45×10^3 µg/g tijekom 18 - 40 mjeseci. Sadržaj i ukupno otpuštanje BPA *in vitro* nakon 34 mjeseca bili su 472 i 37.4 µg/g za bravice. Autori potvrđuju da su bravice proizvele veću količinu BPA i otpustili 13-17 puta više BPA nego privremene krunice i baze proteze. Ovo se objašnjava time da baze proteze i privremene krunice ne sadrže staklena punila i aditive, koje sadrže bravice. Izgleda da se više BPA otpustilo u slinu nego što se očekivalo iz *in vitro* podataka, iako je estrogenski učinak bio vrlo slab. Izvijesteno je da je dodavanje staklenih punila u polikarbonat promoviralo stvaranje BPA. Dodavanje aditiva može usporiti hidrolizu i stvaranje BPA ili njihove oligomere, te pročistiti BPA, reagirajući s već stvorenim BPA. Ipak, ovi autori su sugerirali da dugotrajna upotreba polikarbonatnih bravica u ustima ne može biti poželjna, što se slaže s rezultatima dobivenim u ovom ispitivanju. Međutim, Phiton i sur. ukazuju da polikarbonatne bravice ne uzrokuju citotoksičnost na kulturi stanica L929 nakon potapanja bravica u kulturu medija na 1, 2, 3 i 7 dana (95). Prvo istraživanje je mjerilo samo količinu otpuštenog BPA, no ne i njegov biološki učinak, dok je drugo mjerilo biološki učinak, ali ne i količinu i vrstu potencijalno toksične supstancije. Također, prvo je simuliralo dužinu ortodontskog tretmana i ostavljeno je dovoljno vremena da se vidi otpuštanje BPA. Naše istraživanje je trajalo kraće, no ipak je ukazalo na to da polimerne bravice izazivaju najviši stupanj oksidacijskog stresa, veći nego metalne. Potrebne su daljnje studije da se točno vrednuje biokompatibilnost bravica izrađenih od polimernih materijala.

Naši rezultati upućuju da su sve bravice izvor oksidacijskog stresa i da metalne Speed i MiniSprint vjerojatno zbog metalnih iona (željeza, kroma i nikla) imaju veći stupanj stresa, ali

da najveći ima Quantum, vjerojatno zbog polieter poliola. Oksidacijski stres uzrokovan izloženošću metalima, osobito niklu, posredovan je indukcijom laktat dehidrogenaze, lipidne peroksidacije i indukcijom Fentonove reakcije. Ovaj zadnji proces uključuje reakciju O_2 sa oksidacijskim tragovima metala i stvaranjem O_2 , koji na kraju reagira s vodikovim peroksidom te formira hidroksilni radikal i OH^\cdot (9). Heksavalentni krom je potvrđeni karcinogeni agens, za koji je dokazano da potiče nastanak 8-OHdG i puknuća DNA uzrokovana formaminopirimidinskom DNA glikozilazom u ljudskim bijelim krvnim stanicama *in vitro*. Budući da kobalt posjeduje slične kemijske osobine kao željezo, to je razlog za pretpostavku da kobalt uzrokuje mehanizme poput Fentonske reakcije za stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (21).

Nedavna *in vitro* studija nije uspjela dokazati prisustvo DNA oštećenja komet testom nakon tretmana korozivskim produktima iz bravica od nehrđajućeg čelika u eksperimentalnom razdoblju od 0 do 70 dana (96). Slično je uočeno i kada je napravljen komet test na kulturi ljudskih bazalnih stanica s gingive koje su 14 dana bile izložene djelovanju ortodontskih lukova (97). Ipak, neki autori su primjetili genotoksično oštećenje potaknuto ortodontskom terapijom *edgewise* napravom na stanicama ljudske obrazne sluznice *in vivo*, koristeći komet test (54) na 55 ortodontskih pacijenata i 30 kontrolnih ispitanika koji su praćeni u dvije do tri godine. Pokazali su da ioni nikla, kroma i kobalta mogu potaknuti oštećenje DNA stanica bukalne sluznice. Međutim, smatra se da stanice bukalne sluznice, koje su ljuskastog i rožnatog tipa, formiraju zaštitnu barijeru oko stanica koja ih štiti od negativnog okruženja u ustima i odgovorna je za visoku otpornost na lezije. Nakon što su enzimima obogatili vijabilne stanice i nakon imunogene separacije epitelnih stanica, kritičari ove studije sugerirali su da su većina stanica oralne sluznice, koje stvaraju komete, vjerojatno leukociti, te da stanice oralne sluznice nisu podobne za komet testiranje (97).

Westphalen i sur. testirali su genotoksične efekte ortodontskih naprava koristeći komet (CA) i mikronukleus test (MN) na grupi od 20 zdravih pacijenata koji su u ortodontskom tretmanu konvencionalnom metalnom *edgewise* napravom (53). Kombinacija ovih dvaju testova preporuča se jer se komet koristi da detektira primarna DNA oštećenja (koja se mogu popraviti) u kratkom roku, a MN test otkriva oštećenja kromosoma u idućoj fazi. U ovoj studiji vrijeme uzimanja uzoraka bilo je 10 dana nakon postavljanja naprave u usta za CA test, i 20 dana poslije za MN test. Rezultati komet testa su potvrdili da ortodontske naprave nisu izazvale genetska oštećenja. Rezultati mikronukleus testa su pokazali porast MN stanica 30 dana nakon stavljanja naprave u usta. Razlike između ovih studija koje se odnose na genetska oštećenja mogu se objasniti činjenicom da je studija Faccioni i sur. bila presječna studija s većim brojem analiziranih ispitanika koji su koristili naprave u dužem razdoblju (2-3 godine). Iako je količina metalnih iona koji se otpuštaju iz ortodontskih aparata značajno ispod prosječnog dnevnog unosa, i ne dostiže toksične koncentracije, ne može se isključiti činjenica da i to može biti dovoljno da potakne biološke efekte u stanicama oralne sluznice (54).

Uvođenje metalnih iona u organizam predstavlja dodatni rizik za zdravlje, što može voditi sistemskim i lokalnim efektima (74). Epidemiološki podatci pokazuju da se broj ljudi osjetljivih na nikal povećao na oko 20% (54).

Nedavna studija, koja je proučavala citotoksičnost legura srebra na fibroblaste, potvrdila je njihovu visoku toksičnost (70). Rezultati su pokazali inhibiciju stanične proliferacije i rasta, što vodi lizi i staničnoj smrti. Legura koja je proučavana u toj studiji predstavljala je sljedeći postotak metala: srebro 55%-57%, bakar 21%-23%, cink 15-19% i kositar 4%-6%. Razmatrajući veću koncentraciju srebra, bakra i cinka, i uzimajući u obzir veću nestabilnost bakra i cinka, moguće sudjelovanje ovih iona u razvoju staničnih promjena može se uzeti u obzir. Legure s većom količinom bakra imaju snažniju oksidaciju i veću toksičnost u usporedbi s legurama s manje bakra, na što je uputio veći dokaz stanične iritacije. K tome, *in*

vitro studije su pokazale da kapacitet bakra započinje riskantne oksidirajuće događaje koji mogu utjecati na važne stanične aktivnosti. Ovo se događa zato što bakar, kada je slobodan, može katalizirati stvaranje visoko toksičnih hidroksilnih radikala koji mogu uzrokovati neurodegenerativne promjene. U laboratorijskoj studiji Manz i sur. analizirali su toksičnost bakra i primijetili su hepatotoksičnost ovog iona s posljedičnim smanjenjem stanične vijabilnosti (97).

No i sama manipulacija kulturom stanica (presađivanje uz tripsinizaciju te mijenjanje medija) mogla je utjecati na vijabilnost i rezultate stanične proliferacije te potaknuti oksidacijski stres. Zbog toga negativna i apsolutna kontrola, iako imaju najnižu koncentraciju biljega oksidacijskog stresa, nemaju i statistički značajno nižu koncentraciju od bilo kojeg tipa bravica, ali ni od pozitivne kontrole.

Poznato je da se slobodni radikali neprestano stvaraju u organizmu i uzrokuju oksidacijsko oštećenje biomolekula, no oksidacijsko – redukcijaska ravnoteža se kontrolira mnogobrojnim antioksidansima i reparatornim sustavima (12). Tvari iz ortodontskih bravica ne moraju nužno biti direktni inicijatori stresa, već mogu biti medijatori reakcije s drugim makromolekulama i procesima kao posljedica kojih se inducira oksidacijski stres.

Bitno je naglasiti da ne postoji samo jedan test koji može zabilježiti sve mehanizme kojima sastojci potiču oštećenja DNA. Zato, za donošenje zaključka o štetnosti nekog materijala ili njegova sastojka, potrebno je učiniti cijeli niz testova koji će ovu tezu potvrditi, uključujući i one koji ocjenjuju metafazne kromozomske lomove, mikronukleus test razmjene sestrinskih kromatida i aktivacije stanice domaćina (96). Važnost daljeg istraživanja o ovom području u *in vivo* uvjetima s većim brojem ispitanika i dužim praćenjem odgovorit će nam na pitanja o genotoksičnom potencijalu otpuštanja iona iz ortodontskih naprava, kao i potvrdu rizika kojem su naši pacijenti izloženi. U daljnja istraživanja bi svakako trebalo uključiti i mjerenje koncentracije otpuštenih iona teških metala (Fe, Cu, Co, Cr, Ni, Ti) te kemijskih supstancija

polimera u dužem razdoblju te ovisnost njihove koncentracije o razini biljega oksidacijskog stresa. Mnoge studije su potvrdile štetne efekte koje proizlaze iz otpuštanja nikla, kroma i kobalta iz metalnih bravica, ali se malo zna o štetnim učincima polimernih bravica, koje se u ovom istraživanju opisalo, a naročito su nepoznati mehanizmi koji se razvijaju u ustima u dvije i više godina tretmana. Poznato je da su poliuretani dobiveni kemijskim putem od izocijanata i poliola, supstancija koje se smatraju opasnim za zdravlje, potrebno je izvijestiti i ortodonte i pacijente o riziku kojim su izloženi ortodontskim tretmanom te utjecati na proizvođače da vode brigu o rizičnim posljedicama svojih proizvoda.

Rezultati ovog istraživanja upotpunjuju dosadašnja saznanja iz područja biokompatibilnosti materijala i naprava korištenih u ortodonciji. Iako izgleda da su sve vrste bravica izvor oksidacijskog stresa, ipak keramičke bravice imaju najveći stupanj biokompatibilnosti u usporedbi s polimernim i metalnim bravicama, te onima izrađenima od kombinacije navedenih materijala.

6. ZAKLJUČCI

Bez obzira na gradbeni material svi tipovi ortodontskih bravica izvor su oksidacijskog stresa *in vitro*.

Najveći oksidacijski stres induciraju potpune metalne i poliuretanske bravice.

Keramičke bravice pokazuju najviši stupanj biokompatibilnosti u usporedbi s polimernim i metalnim bravicama te onima načinjenima od kombinacije tih materijala.

Rezultati ovog istraživanja upotpunjuju dosadašnja saznanja iz područja biokompatibilnosti materijala i naprava korištenih u ortodonciji i sugeriraju da odabirom keramičkih bravica za provođenje ortodontske terapije smanjujemo neželjeno štetno djelovanje *edgewise* naprave na stanice.

7. LITERATURA

1. 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.
2. Grimaudo NJ. Biocompatibility of nickel and cobalt dental alloys. *Gen Dent* 2001;49:498-503.
3. 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.
4. Eliades T, Athanasiou AE. In vivo aging of orthodontic alloys: implications for corrosion potential, nickel release, and biocompatibility. *Angle Orthod* 2002;72:222-37.
5. Russell JS. Aesthetic orthodontic brackets. *J Orthod* 2005;32:146-63.
6. Chen SS, Greenlee GM, Kim JE, Smith CL, Huang GJ. Systematic review of self-ligating brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:726.e1-726.e18.
7. Fleming PS, Johal A. Self-ligating brackets in orthodontics. A systematic review. *Angle Orthod* 2010;80:575-84.
8. Rosvall MD, Fields HW, Ziuchkovski J, Rosenstiel SF, Johnston WM. Attractiveness, acceptability, and value of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:276.e1-12.
9. Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res* 2008;11:51-6.
10. Matos de Souza R, Macedo de Menezes L. Nickel, chromium and iron levels in the saliva of patients with simulated fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2008;78:345-350.

11. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12:1161-1208.
12. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London: Oxford University Press, 2007.
13. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc* 1934;147:332-51.
14. Wardmann P. Radiation chemistry: basic strategic or tactical science. *Int J Radiat Biol* 1989;55:179-90.
15. Halliwell B, Guteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
16. Pilger A, Rüdiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;80:1-15.
17. Halliwell B, Free radicals, oxygen toxicity and aging. U: Sohal RS, ur. *Age pigments*. Amsterdam: Elsevier-North; 1981, str. 1-62.
18. Hassan HM. Superoxid dismutase: an antioxidant defense enzyme. U: Armstrong D, Sohal RS, Cutler RS, Slater TF, ur. *Free radicals in molecular biology, aging and disease*. New York: Raven Press; 1984, str. 77-85.
19. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 2010;345:91-104.
20. Hanaoka T, Tsugane S, Yamano Y i dr. Quantitative analysis of 8-hydroxyguanine in peripheral blood cells: an application for asbestosis patients. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65:S215-S217.

21. Pilger A, Germanik D, Schaffer A- i sur., 8-hydroxyguanosine in leukocyte DNA and urine of quartz exposed-workers and patients with silicosis. *Int Arch Occup Environ Health* 2000;73:305-10.
22. Kisby GE, Muniz JF, Scherer J i sur. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. *J Agromedicine* 2009; 14:206-14.
23. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. A systematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants. *Crit Rev Toxicol* 2008; 38:645-74.
24. Pilger A, Ivancit S, Germadnik D, Rudinger HW. Urinary excretion of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B* 2002;778:393-401.
25. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjonneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxyguanosin excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 1992;13:2241-7.
26. Martelli E. Radiation dose at bronchial bifurcation of smokers from indoor exposure to radon progeny. *J Nat Canc* 2006;12:23-29.
27. Prieme H, Loft S, Klarlund M, Gronbaek K, Tonesen P, Poulsen HE. Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine excretion. *Carcinogenesis* 1998;19:347-51.
28. Assami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tomioka Y, Itoh H, Kasai H. Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res* 1996;56:2546-9.
29. Van Zeeland AA, de Groot AJL, Hall J, Donato F. 8-hydroxyguanosine in DNA from leukocytes of healthy adults: relationship with cigarette smoking, environmental tobacco smoke, alcohol and coffee consumption. *Mutat Res* 1999; 439:249-57.

30. Lagorio S, Tagesson C, Forastiere F, Iavarone I, Axelson O, Carere A. Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative DNA damage. *Occup Environ Med* 1994;51:739-43.
31. Liu L, Zhang Q, Fenf J i sur. The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutat Res* 1996;370:145-150.
32. Marczynski B, Rozynek P, Kraus T, Schlosser St, Raithel HJ, Baur X. Levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in DNA of white blood cells from workers highly exposed to asbestos in Germany. *Mutat Res* 2000;468:195-202.
33. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009;27:120-39.
34. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95.
35. Kasai H. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) by oxygen radicals. *Environ Mutagen Research* 1988;10:73-5.
36. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9697-9701.
37. Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanism of formation. *Free Radic Res Comm* 1986;1:163-172.
38. Dizdaroglu M, Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 1993;315:1-6.
39. Hamberg M, Zhang LY. Quantitative determination of 8-hydroxyguanine and guanine by isotope-dilution mass spectrometry. *Analyt Biochem* 1995;229:336-344.

40. Halliwell B, Dizdaroglu M. The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Rad Res Comm* 1992;16:75-88.
41. Randerath K, Yang PF, Danna TF, Reddy R, Watson WP, Randerath E. Bulky adducts detected by ³²P-postlabeling in DNA modified by oxidative damage in vitro. Comparison with rat lung I-compounds. *Mutat Res* 1991;250:135-144.
42. Podmore K, Farmer PB, Herbert KE, Jones GDD, Martin EA. ³²P Postlabeling approaches for the detection of 8-Oxo-2'-deoxyguanosine-3-monophosphate in DNA. *Mutat Res* 1997;178:139-149.
43. Dusinska M, Collins A. Detection of oxidized purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cell, by inclusion of lesion specific enzymes in the comet assay. *ATLA* 1996;24:405-411.
44. Epe B, Hegler J. Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprint. *Meth Enzymol* 1994;234:122-131.
45. Hartwig A, Dally H, Schlepegrell R. Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett* 1996;88:85-90.
46. 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;79:102-10.
47. Vitral JC, Fraga MR, deSouza MA, Ferreira AP, Vitral RW. In-vitro study of cellular viability and nitric oxide production by J774 macrophages stimulated by interferon gamma with ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene bracket. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:665-70.

48. Singh DP, Sehgal V, Pradhan KL, Chandna A, Gupta R. Estimation of nickel and chromium in saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *World J Orthod* 2008;9:196-202.
49. Gursoy UK, Sokucu O, Uitto VJ, Aydin A, Demirer S, Toker H, Erdem O, Sayal A. The role of nickel accumulation and epithelial cell proliferation in orthodontic treatment-induced gingival overgrowth. *Eur J Orthod* 2007;29(6):555-8.
50. Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Device Technol* 2003;14:10-3.
51. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29:2941-53.
52. Black J, Hastings GW, ur. *Handbook of biomaterials properties*. London: Chapman and Hall; 1998.
53. 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;7:1259-66.
54. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:687-93.
55. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens and mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2281-5.
56. Maijer R, Smith DC. Biodegradation of the orthodontic bracket system, *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1986;90:195-198.
57. Kusy RP. Orthodontic biomaterials: From the past to the present. *Angle Orthod* 2002;72:501-512

58. Oh KT, Choo SU, Kim KM, Kim KN. A stainless steel bracket for orthodontic application. *Eur J Orthod* 2005;27:237-244.
59. Costa M T, Lenza MA, Gosch CS, Costa I, Ribeiro D. In vitro evaluation of corrosion and cytotoxicity of orthodontic brackets. *J Dent Res* 2007;86:441-445.
60. Eliades T, Bourauel C. Intraoral aging of orthodontic materials: the picture we miss and its clinical relevance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;127:403-412.
61. Von Fraunhofer JA. Corrosion of orthodontic devices. *Semin Orthod* 1997;3:198-205.
62. Agaoglu G, Arun T, Izgu B, Yarat A. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2001;71:375-379.
63. Gautam P, Valiathan A. Ceramic brackets: In search of an ideal. *Trends Biomater Artif Organs* 2007; 20(2):pp000-000.
64. Menezes LM, Quintao CA, Bolognese AM: Urinary excretion levels of nickel in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2007;131:635-638
65. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A, Kullman A. Cytotoxic effect of orthodontic appliances. *Eur J Orthod* 1992;14:47-53
66. House K, Sometz F, Dymock D, Sandy JR, Ireland A. Corrosion-should we care. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2008;133:584-92.
67. Grimsdottir MR, Gjerdet NR, Hensten-Pettersen A. Composition and in vitro corrosion of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1993;103:8-14.
68. Demirović D. Osnovi fiksne tehnike u ortodonticiji. Sarajevo, Stomatološki fakultet: Arka press, 2005, str 131.
69. Sestini S, Norarentonio L, Cerboni B. i dr. In vitro cytotoxicity evaluation of silver soldering, electrical resistance, and laser welding of orthodontic wires. *Eur J Orthod* 2006;28:567-572.

70. Freitas MPM, Oshima HMS, Menezes LM, Machado DC, Viezzer C. Citotoxicity of silver solder employed in orthodontics. *Angle Orthod* 2009;79:939-945.
71. Hanson M, Lobner D. In vitro neuronal citotoxicity of latex and nonlatex orthodontic elastics. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2004;126:65-70.
72. Terhune WF, Sydiskis RJ, Davidson WM. In vitro citotoxicity of orthodontic bonding materials. *Am J Orthod* 1983;83(6):501-6.
73. Barret R, Bishara SE, Quinn JK. Biodegradation of orthodontic appliances, Part I, Biodegradation of nickel and chromium in vitro. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1993;103:8-1465.
74. Bishara SE, Barrett RD, Selim MI. Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1993;103:115-119.
75. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical Biology and Medicine* 1995;18:321-336.
76. Proffit WR, Fields HW Jr, Sarver DM. *Ortodoncija, Naklada Slap, Hrvatsko izdanje* 2010; str 418.
77. Tsaousi A, Jones E, Case CP. The in vitro genotoxicity of orthopaedic ceramic (Al₂O₃) and metal (CoCr alloy) particles. *Mutat Res* 2010;697:1-9.
78. Pithon MM, dos Santos RL, Martins FO. Citotoxicity of polycarbonate orthodontic brackets. *Braz J Oral Sci* 2009;8:84-7.
79. vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 2005;113:926-33.
80. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13056-61.

81. Kusy RP, Whitley JQ. Degradation of plastic polyoxymethylene brackets and the subsequent release of toxic formaldehyde. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2005;127(4):420-7.
82. Montanaro L, Cervellati M, Campoccia D, Prati C, Breschi L, Arciola CR. No genotoxicity of a new nickel-free stainless steel. *Int J Artif Organs* 2005;28:58-65.
83. ISO. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization 1990: ISO document 10993-5, str 1-7.
84. Kao CT, Ding SJ, Min Y, Hsu TC, Chou MY, Huang TH. The citotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. *Eur J Orthod* 2007;29:198-203.
85. Schmalz G, Browne RM. The biological evaluation of medical devices used in dentistry: the influence of the European Union on the preclinical screening of dental materials. *Int Dent J* 1995;45(4) :275-8.
86. Huang TH, Yen CC, Kao CT. Comparison of ions released between new and recycled stainless steel brackets. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2001;120:68-75.
87. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* 1994;15:175-90
88. Halliwell et al. *FESB Letters*. 2000;(1):486
89. Mockers O, Deroze D, Camps J. Citotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. *Dent Mater* 2002;18:311-7.
90. Gautam P, Valiathan A. Ceramic brackets: in search of an ideal! *Trends Biomater Artif Organs* 2007;20:122-126.
91. Jena AK, Duggal R, Mehrotra AK. Physical properties and clinical characteristics of ceramic brackets: a comprehensive review. *Trends Biomater Artif Organs* 2007;20:201-10.

92. Stokes K, McVenes R. Polyurethane elastomer biostability. *J Biomater Appl* 1995;9(4):321-354.
93. Tanzi MC, Fare S, Petrini P. In vitro stability of polyether and polycarbonate urethanes. *J Biomater App* 2000;14:325-348
94. Watanabe M, Hase T, Imai Y. Degradation and formation of bisphenol A in polycarbonate used in dentistry. *J Med Sci* 2004;51:1-6
95. Pithon MM, dos Santos RL, Martins FO, Ruellas ACO, Nojima LI, Nojima MG, Romanos MTV. Citotoxicity of polycarbonate orthodontic brackets. *Braz J Oral Sci* 2009;8:2:84-87.
96. Angelieri F, Marcondes JPC, de Almeida DC, Salvadori DMF, Ribeiro DA. Genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic bracket in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;139:4:504-9
97. Tomakidi P, Koke U, Kern R, Erdinger L, Kruger H, Kohl A, Komposch G. Assessment of acute cyto-and genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic materials using monolayer cultures of immortalized human gingival keratinocytes. *J Orofac Orthop* 2000;61:2-19
98. Manzl , Enrich J, Ebner H, Dallinger R, Krumschnabel G. Cooper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology* 2004;196:57-64.

POPIS SKRAĆENICA

H₂O₂ -vodikov peroksid

OH[•] - hidroksil radikal

Fe²⁺- ion željeza

Cu⁺ - ion bakra

[•]O₂ - singlentni kisik

UV zračenje- ultravioletno zračenje

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

8-OHdG - 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin

FPG- formamidopirimidin DNA N-glikozilaze

dG – deoksigvanozin

AISI – Američki institut za željezo i čelik (eng. American Iron Steel Institute)

NF-kappa B – Nuklearni čimbenik kapa (eng. Nuclear factor kappa B)

AP-1- Aktivacijski protein (eng. Activator Protein)

p53- protein 53

TNF α - Tumorski nekrotični čimbenik alfa (eng. Tumor Necrosis Factor α)

HPLC - Visoko-djelotvorna tekućinska kromatografija

EC- Elektrokemijska detekcija

CG-MS- Plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom

ELISA- enzimski imunovezujući test (eng. enzyme-linked immunosorbent assay)

Cl⁻ - ion klora

MSDS- proizvođačka izjava o sigurnosti materijala (eng. Material Safety Data Sheet))

CA test- Komet test

MN test- Mikronukleus test

ŽIVOTOPIS

Zorana Ivanković Buljan

Stožanačka 39 b

21312 Podstrana, Split

Tel. 00 385 21 333 658

E - mail: zorana.ivankovic@hotmail.com

Zorana Ivanković je rođena 27. listopada 1967. u Mostaru gdje je završila osnovnu školu i Gimnaziju "Aleksa Šantić". Stomatološki fakultet Univerziteta u Sarajevu upisala je 1986. i diplomirala 12. veljače 1992. godine, neposredno uoči ratnih sukoba u Mostaru. Odmah se prijavila na liječnički staž, ali ga nije mogla u miru obavljati, nego je radila u Domu zdravlja Mostar kao radni obveznik od 3. travnja 1992. godine. Nakon godine dana stažiranja u ratnim uvjetima Kliničke bolnice u Mostaru, prijavljuje državni ispit koji je uspješno položila u travnju 1993. pred Ispitnim povjerenstvom Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske. Radi braka preselila se u Split i otvorila privatnu ordinaciju koju i sada posjeduje. Majka je 14-godišnjeg sina koji pohađa školu u mjestu stanovanja. Poslijediplomski znanstveni studij Biomedicina upisala je akademske godine 2001./2002 na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Godine 2002. dobila je specijalizaciju iz ortodoncije koju je obavila na klinikama i zavodima Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu te položila specijalistički ispit u listopadu 2005. godine.

Budući da posjeduje zakonom propisane uvjete, na temelju odobrenja Povjerenstva za magisterije i doktorate Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, omogućen joj je završetak poslijediplomskog studija izradom i obranom doktorskog rada.

Sudjelovala je u radu brojnih simpozija i kongresa kod nas i u svijetu. Posebice su značajni kongresi Europskog ortodontskog društva u Berlinu (Njemačka), Lisabonu (Portugal) i Istanbulu (Turska), Damon seminari (Beograd, Zagreb, Opatija, Dubrovnik, Sarajevo), na kojima je sudjelovala s ciljem svladavanja novosti iz struke. Član je Hrvatske komore dentalne medicine, Europskog ortodontskog društva i Matice hrvatske. Osim u znanstvenim i stručnim časopisima (četiri znanstvena rada u časopisima indeksiranim u Current Contents te četiri u časopisima u drugim indeksacijama), objavljuje članke u tiskovinama radi populacije stomatologije.