

Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Matej Par, Ivona Profeta

Genotoksični učinak preparata za izbjeljivanje zubi na oralnu sluznicu

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za endodonciju i restaurativnu dentalnu medicinu pod vodstvom prof.dr.sc. Zrinke Tarle, a dijelovi eksperimenta provedeni su na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009./2010.

Lektor hrvatskog jezika: Mirjana Zec

Lektor engleskog jezika: Mladen Šipek

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
2. ISPITANICI I POSTUPCI	4
3. REZULTATI	6
4. RASPRAVA	7
5. ZAKLJUČCI	10
6. ZAHVALE	10
7. POPIS LITERATURE	11
8. SAŽETAK	14
9. SUMMARY	15

1. UVOD

Izbjeljivanje zubi je postupak kojim se tretiraju te u određenom stupnju otklanjaju različite diskoloracije zubi. Postupke izbjeljivanja zubi može se podijeliti na one koje se koriste za izbjeljivanje avitalnih i vitalnih zubi. Kemijska sredstva koja se koriste za izbjeljivanje zubi su vodikov peroksid, karbamid peroksid i natrijev perborat različitih koncentracija.

Točan mehanizam izbjeljivanja zubi još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (1). Vodikov peroksid, koji je aktivni spoj svih sredstava za izbjeljivanje zubi, ima sposobnost stvaranja slobodnih radikala kisika. Slobodni radikali su nestabilne molekule i imaju tendenciju reagirati s drugim tvarima, kako bi postigle svoju stabilnost. Vodikov peroksid, kao i slobodni radikali kisika koji nastaju njegovim raspadom, mogu difundirati kroz tvrda zubna tkiva i pritom reagirati s kromogenim molekulama. To su molekule velike molekulске mase koje sadrže konjugirane dvostruke veze između ugljikovih atoma i prilikom relaksacije emitiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra, što se očituje kao diskoloracija zubi. Slobodni radikali cijepaju te konjugirane dvostruke veze i tako mijenjaju apsorpcijsku energiju kromogenih molekula, koje se razlažu na manje i emitiraju zračenje nižih valnih duljina u nevidljivom dijelu spektra.

Na samu reakciju izbjeljivanja utječu i različiti uvjeti u kojima se ona odvija - temperatura, pH, svjetlosna aktivacija, te prisutnost nekih iona. Na primjer, povećanje temperature za 10°C dvostruko ubrzava reakciju (2).

1.1 Genotoksičnost vodikova peroksida

Sam vodikov peroksid ne oštećuje DNA. Međutim, u stanici on dolazi u kontakt s metalnim ionima (bakar i željezo) i kroz Fentonovu reakciju daje slobodne radikale kisika: superoksidni anion, hidroksilni radikal i perhidroksilni radikal (3). Ovi slobodni radikali mogu oštetiti mnoge stanične tvorbe i makromolekule, uključujući i DNA. Slobodni radikali kisika mogu kemijski promijeniti dušične baze u DNA, što dovodi do pucanja vodikovih veza između baza ili do krivog sparivanja baza te lomova jednog ili oba lanca DNA. Na taj način slobodni radikali kisika sudjeluju u patogenezi tumora, razvoju kroničnih degenerativnih bolesti te procesima starenja. Kako bi se spriječile štetne posljedice takvih oštećenja DNA, stanica posjeduje razne mehanizme popravka, ovisne o vrsti oštećenja. Ukoliko se radi o promjeni jedne ili nekoliko baza, postoji mogućnost izrezivanja takvih, kemijski promijenjenih baza. Lomovi cijelih lanaca DNA mogu se popraviti na dva načina. Jedan od načina je popravak homolognom rekombinacijom pri čemu se molekula DNA s lomom rekombinira s neoštećenom homolognom DNA molekulom. Pri tome lanci homologne DNA služe kao kalup za sintezu kojom se ispunjava dvolančani lom i takav popravak ne ostavlja pogreške. Drugi način je popravak nehomolognom rekombinacijom u kojoj se neposredno spajaju krajevi prelomljenih lanaca, a takav popravak često ostavlja pogreške pri čemu mogu

nastati različite kromosomske nestabilnosti koje za posljedicu imaju mutacije i promjene u funkciji stanica.

Žive stanice i tkiva zaštićeni su od mogućeg oštećenja slobodnim radikalima. Slobodni radikali nastaju svakodnevno u organizmu u mnogim metaboličkim procesima, kao što je oksidativna fosforilacija (4). No unatoč tome, oštećenja ne nastaju jer organizam ima snažne mehanizme zaštite protiv “fizioloških koncentracija” slobodnih radikala. Jedan od mehanizama zaštite je vezivanje slobodnih radikala na ligandne molekule kao što su antioksidansi. U takve prirodne antioksidanse ubrajamo: vitamine K, A, C, E, koenzim Q, tiolne molekule (cistein, cistamin, metionin, glutation), ubikinon te glukozu. Drugi način eliminacije slobodnih radikala iz organizma su enzimске reakcije u kojima se oni pretvaraju u manje toksične ili netoksične molekule. Enzimi koji sudjeluju u tim reakcijama su: superoksid-dismutaza koja pretvara superoksidni anion u vodikov peroksid te katalaza koja pretvara vodikov peroksid u vodu i kisik. Ovi prirodni mehanizmi zaštite iznimno su učinkoviti pri fiziološkim količinama slobodnih radikala u organizmu. Međutim, svaka veća koncentracija endogenih ili egzogenih slobodnih radikala predstavlja potencijalnu opasnost za organizam, povećava mogućnost nastanka oštećenja DNA, a time i mogućnost nastanka mutacija u stanicama.

1.2 Istraživanja genotoksičnosti vodikova peroksida u in vitro i in vivo uvjetima

Dosadašnja istraživanja genotoksičnosti vodikova peroksida rađena su u in vitro uvjetima na kulturama stanica i in vivo na animalnim modelima. Genotoksičnost vodikova peroksida je dokazana u kulturama bakterijskih stanica (5,6,7), i u kulturama nekih eukariotskih stanica (8,9). Međutim, dodatkom katalaze spriječen je genotoksični učinak u staničnoj kulturi (10). Genotoksično djelovanje vodikova peroksida in vivo je dvojbeno – brojne studije pokazale su da on nema genotoksično, karcinogeno niti promotorsko djelovanje (11,12,13), dok je u nekoliko studija (nakon dugotrajne oralne ingestije) zabilježena povećana incidencija duodenalne hiperplazije i njena zloćudna preobrazba (14,15,16).

Razlike u rezultatima in vivo i in vitro istraživanja objašnjavaju se različitim uvjetima kojima su eksperimentalne stanice bile izložene. Naime, stanice in vitro dolaze u direktan kontakt s visokim koncentracijama vodikovog peroksida, a uz to im manjkaju zaštitni mehanizmi (katalaza i antioksidansi). Također, DNA bakterijske stanice smještena u citoplazmi puno je podložnija oštećenju slobodnim radikalima nego eukariotska DNA koja je zaštićena jezgriinom membranom, a posjeduje i učinkovite mehanizme popravka. Nadalje, stanice in vivo ne dolaze u direktan kontakt s toliko visokim koncentracijama vodikova peroksida, a imaju i veću aktivnost enzima koji neutraliziraju slobodne radikale. Zbog svega navedenog, stanice su u svojem prirodnom, in vivo okruženju, puno sposobnije oduprijeti se genotoksičnom učinku slobodnih radikala nego one u kulturi.

1.3 Klinička istraživanja genotoksičnosti

Dosadašnja su klinička istraživanja većinom bila usmjerena na nuspojave izbjeljivanja u vidu preosjetljivosti i iritacije gingive, dok podaci o genotoksičnosti i karcinogenosti manjkaju (sažetak u [17]). Iako se iritacija gingive često javlja, ne smatra se rizičnim faktorom za razvoj karcinoma. Budući da je incidencija karcinoma lokaliziranog na gingivi u općoj populaciji manja od 1:100.000, Munro et al smatraju da bi se eventualni karcinogeni učinak preparata za izbjeljivanje očitovao kao zamjetno povećanje incidencije karcinoma u posljednjem desetljeću, uzevši u obzir da je u to vrijeme višestruko porasla njihova primjena. Takav porast incidencije nije zapažen, a do danas ne postoje klinički izvještaji koji bi povezali pojavljivanje karcinoma usne šupljine s primjenom sredstava za izbjeljivanje (17). Također, nije dokazan niti promotorski učinak vodikova peroksida na karcinogenezu u pušača i osoba koje konzumiraju veće količine alkohola (18).

Dakle, dosadašnja malobrojna klinička istraživanja nisu pokazala genotoksični, odnosno karcinogeni učinak vodikova peroksida iz preparata za izbjeljivanje.

U vezi s dostupnim podacima o genotoksičnosti i karcinogenosti vodikova peroksida, International Agency for Research on Cancer (IARC) 1999. donosi sljedeće zaključke:

- postoje ograničeni dokazi o genotoksičnosti i karcinogenosti dobiveni na eksperimentalnim životinjama
- postoje neadekvatni dokazi o genotoksičnosti dobiveni na ljudima.

Sukladno tome, IARC vodikov peroksid klasificira u skupinu 3 – not classifiable as to its carcinogenicity to humans (nemoguće ga je klasificirati prema karcinogenosti za ljude) (19).

1.4 Istraživanje genotoksičnosti mikronukleus testom

Mikronukleus test je minimalno invazivan i relativno jednostavan postupak kojim se mogu detektirati oštećenja DNA in vivo uzrokovana različitim genotoksičnim čimbenicima. U stanici koja je pretrpjela oštećenja genetskog materijala, tijekom mitoze nastaju tvorbe nazvane mikronukleusi (MN). MN nastaju tijekom metafaze i anafaze, a ostaju vidljivi i u interfazi. Mogu ih činiti cijeli kromosomi ili dijelovi acentričnih kromosoma koji nisu migrirali na suprotne polove stanica tijekom anafaze. Takve promjene nastaju zbog prekomjerne izloženosti stanice genotoksičnim tvarima te pogreškama koje se javljaju tijekom mitoze ili popravka DNA (20). Broj MN po stanici varira, ovisno o težini oštećenja DNA, a rezultati se mogu razlikovati i među pojedinim laboratorijima, ovisno o kriteriju brojanja. Smatra se da je za dostatnu preciznost ovog postupka potrebno uzeti u obzir barem 2000 stanica po uzorku (22). Ovaj test može se primijeniti na različite vrste stanica: leukocite, eritrocite, fibroblaste i stanice bazalnog sloja epitela. Uz broj MN određuju se i drugi markeri genotoksičnosti (nukleoplazmatski mostovi, jezgri

pupovi, binuklearne stanice) i citotoksičnosti (karioreksa, karioliza). Određivanjem ovih dodatnih markera moguće je preciznije kvantificirati oštećenja DNA te razlikovati genotoksični od citotoksičnog učinka istraživane tvari. U novije vrijeme (posljednjih 20-ak godina) MN test sve je više korišten i prihvaćen kao pouzdana i osjetljiva metoda za procjenu oštećenja DNA (23,24,25).

1.5 Svrha rada

Svrha ovog rada bila je istražiti mogući genotoksični učinak dvaju preparata za izbjeljivanje vitalnih zubi na oralnu sluznicu u kliničkim uvjetima, uz odgovarajuću primjenu gingivne zaštite.

2. ISPITANICI I POSTUPCI

Istraživanje je provedeno na 12 ispitanika koji su dobrovoljno pristali na postupak izbjeljivanja zubi. Ispitanici su osobe muškog i ženskog spola, pripadnici mlađe dobne skupine (18 – 25 godina), bez kontraindikacija za izbjeljivanje zubi. Nasumično su raspoređeni u dvije skupine po 6 ispitanika, ovisno o preparatu koji se koristio za izbjeljivanje zubi. Korištena su dva preparata na bazi vodikovog peroksida. U prvoj skupini primijenjen je 25% vodikov peroksid potpomognut svjetlosnom aktivacijom, preparat tvorničkog imena Zoom2 (Discus Dental, SAD), a u drugoj skupini primijenjen je 38% vodikov peroksid bez svjetlosne aktivacije, preparat tvorničkog imena Opalescence Boost (Ultradent, SAD). Svakom ispitaniku su u dva odvojena brisa uzeti uzorci stanica s područja gingive (prvi bris) i sluznice unutarnje strane gornje usnice (drugi bris). Brisovi su učinjeni 3 puta: neposredno prije, neposredno nakon, te 72 sata nakon postupka izbjeljivanja zubi.

2.1 ISPITANICI

2.1.1 Prva skupina:

Postupak izbjeljivanja 25% vodikovim peroksidom (Zoom2) potpomognut svjetlosnom aktivacijom

Prije uzimanja brisa, ispitanici su isprali usta vodom. Zatim je sterilnom gazom uklonjen površinski, odumrli sloj stanica s gingive u području prednjih zubi (slika 1) te je sterilnom citološkom četkicom uzet bris (slika 2). Uzorak je pohranjen u sterilnu Eppendorf tubu u kojoj se nalazio pufer (0,1M Na₂EDTA, 0,02M NaCl, 0,01M Tris-HCl; pH 7,0) ohlađen na +4 °C. Eppendorf tube s uzorcima pohranjene su na temperaturu od +4°C do transporta na Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada. Na isti način uzet je bris sluznice s unutarnje strane usnice (slika 3, 4). Zubi su očišćeni profilaktičkom pastom Proxylt (RDA 7) (Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein) (slika 5), nakon čega su usta temeljito isprana vodom. Postavljen je retraktor (slika 6), zubi su osušeni pusterom, a gingiva je izolirana zaštitnim Liquidam gelom (Discus Dental, SAD) (slika 7) koji je osvijetljen pomoću polimerizacijskog

uređaja (Bluephase, Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein). Na labijalne plohe zubi 14-24 i 34-44 nanesen je sloj gela debljine 1-2 mm, pomoću kista iz originalnog pakiranja (slika 8, 9). Zubi su osvijetljeni izvorom svjetlosti tijekom 15 minuta (slika 10). Nakon osvijetljavanja, gel je uklonjen Heidemannovim instrumentom 5/6 i svitcima staničevine. Postupak nanošenja gela je ponovljen tri puta, u trajanju od 15 minuta svaki, koliko traje jedan tretman preparatom Zoom2. Po završetku izbjeljivanja, uklonjen je zaštitni gel i retractor, a usta su isprana vodom. Ponovno su uzeti brisovi s gingive i sluznice unutarnje strane usnice. Ispitanici su naručeni za tri dana, kada su im još jednom uzeti brisovi sa istih mjesta.

2.1.2 Druga skupina:

Postupak izbjeljivanja 38% vodikovim peroksidom (Opalescence Boost) bez svjetlosne aktivacije

Prvi bris s gingive i usnice uzet je na isti način kao i u prethodnoj skupini. Zubi su očišćeni profilaktičkom pastom Proxylt (RDA 7) (Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein), nakon čega su usta temeljito isprana vodom. Postavljen je retractor, zubi su osušeni pusterom, a gingiva je izolirana zaštitnim Opaldam gelom (Ultradent, SAD) (slika 11, 12) koji je osvijetljen pomoću polimerizacijskog uređaja (Bluephase, Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein). Prema uputi proizvođača, pomiješan je osnovni gel (38% vodikov peroksid) s aktivatorom. Tako zamiješani gel nanesen je originalnim nastavkom za aplikaciju na labijalne plohe zubi 14-24 i 34-44, u sloju debljine 0.5-1 mm (slika 13, 14). Nakon 15 minuta, gel je uklonjen Heidemannovim instrumentom 5/6 i svitcima staničevine. Postupak nanošenja gela je ponovljen tri puta, u trajanju od 15 minuta svaki, koliko traje jedan tretman preparatom Opalescence Boost. Po završetku izbjeljivanja, uklonjen je zaštitni gel i retractor, a usta su isprana vodom. Ponovno su uzeti brisovi s gingive i sluznice unutarnje strane usnice. Ispitanici su naručeni za tri dana, kada su im još jednom uzeti brisovi s istih mjesta.

2.2 POSTUPCI

2.2.1 Postupak tretiranja uzoraka stanica

Na dan uzimanja brisa, uzorci su dostavljeni na Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Po dostavi na Institut, centrifugirani su na 2000 okretaja 4 minute. Supernatant je uklonjen, a talog stanica resuspendiran u svježem puferu istog sastava. Postupak centrifugiranja i ispiranja ponovljen je 2 puta. Resuspendirani talog stanica nanesen je na predmetna mikroskopska stakla ugrijana na 37 °C. Preparati su sušeni na 37 °C tijekom 15 minuta te potom fiksirani u metanolu (80% v/v) na +4 °C 20 minuta. Fiksirani preparati, osušeni na sobnoj temperaturi, bojani su 5%-tnom otopinom Giemsa-e 10 minuta. Obojeni preparati analizirani su svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 1000x. U stanicama se utvrđuje broj mikronuklea. Broje se stanice s jednim, dva i više od tri MN-a. U obzir dolaze

stanice u kojima je MN odvojen od jezgre u potpunosti ili je dotiče, ali se jasno nazire rub jezgre, također da je promjer MN manji od 1/3 promjera jezgre, te da se boji isto kao i jezgra (21). Za svako uzorkovanje analizirano je 2000 stanica. U analizu nisu bile uključene oštećene stanice i stanice s morfološkim promjenama jezgre. Takve stanice bilježene su zasebno.

2.2.2 Statistička analiza

Na temelju dobivenih vrijednosti pojedinih markera genotoksičnosti izračunate su srednje vrijednosti prije izbjeljivanja, neposredno nakon izbjeljivanja i 72 sata nakon izbjeljivanja. Budući da podaci nisu bili normalno distribuirani, za usporedbu srednjih vrijednosti korišten je neparametrijski hi-kvadrat test, uz razinu značajnosti od 0.05.

Nul-hipoteza bila je da u uzorcima stanica uzetim neposredno prije, neposredno nakon i 72 sata nakon izbjeljivanja nema razlike s obzirom na markere genotoksičnosti. Alternativna hipoteza bila je da se uzorci razlikuju prema barem jednom od navedenih markera.

3. REZULTATI

Srednje vrijednosti markera genotoksičnosti u uzorcima uzetim neposredno prije, neposredno nakon i 72 sata nakon izbjeljivanja prikazane su u tablicama i na grafikonima. Tablice 1 i 2 te slike 15 i 16 prikazuju rezultate dobivene uporabom preparata Zoom2. Tablice 3 i 4 te slike 17 i 18 prikazuju rezultate dobivene uporabom preparata Boost. Sve vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost pojedinog markera na 2000 stanica.

U uzorcima stanica uzetih s gingive ispitanika koji su prošli postupak izbjeljivanja preparatom Zoom2, zabilježen je statistički značajan ($p < 0.01$) porast broja MN 72 sata nakon izbjeljivanja, u odnosu na uzorke uzete neposredno prije i neposredno nakon postupka izbjeljivanja (slika 16a). U uzorku s gingive uzetom 72 sata nakon izbjeljivanja zapažen je i statistički značajan porast broja stanica s morfološkim promjenama jezgre: karioreksom ($p < 0.05$) i kariolizom ($p < 0.01$) u odnosu na uzorke uzete neposredno prije i neposredno nakon postupka izbjeljivanja (slika 16f,g). U uzorcima sa sluznice usnice, uzetim 72 sata nakon izbjeljivanja, nije zabilježen statistički značajan porast niti jednog od navedenih markera (slika 15a-j). U uzorku s usnice i u uzorku s gingive zabilježen je porast broja stanica s jezgrenim pupovima 72 sata nakon izbjeljivanja, ali on nije bio statistički značajan (slika 15j, 16j). U uzorku s usnice uzetom neposredno nakon izbjeljivanja uočen je statistički značajno ($p < 0.01$) niži broj MN u odnosu na uzorak uzet prije izbjeljivanja (slika 15a).

Kod ispitanika koji su prošli postupak izbjeljivanja preparatom Boost, statistički je bio značajan ($p < 0.01$) porast broja MN u uzorcima s gingive i usnice uzetim 72 sata nakon izbjeljivanja, a u odnosu na uzorke uzete neposredno prije i neposredno nakon postupka izbjeljivanja (slika 17a, 18a). Također je

zapažena i razlika u razdiobi MN, pri čemu je broj stanica s više od 3 MN statistički značajno ($p < 0.05$) povećan u uzorku s gingive uzetom 72 sata nakon postupka izbjeljivanja u usporedbi s uzorcima uzetim neposredno prije i neposredno nakon izbjeljivanja (slika 18e). Ostali markeri genotoksičnosti nisu bili statistički značajno promijenjeni.

4. RASPRAVA

Nakon postupka izbjeljivanja uzeta su dva uzorka stanica: prvi neposredno nakon i drugi 72 sata nakon postupka izbjeljivanja. To vrijeme je potrebno stanicama sluznice da prođu kroz diobu, odnosno da se genotoksični učinak primijenjenih preparata očituje kao povećanje broja MN. Naime, za nastanak MN kao morfološke manifestacije oštećenja genoma, stanica mora proći barem jedan stanični ciklus. Uzorak uzet neposredno nakon izbjeljivanja služio je kao kontrola, budući da je uzet oko sat vremena nakon početka primjene preparata za izbjeljivanje, a to vrijeme nije dostatno da se oštećenja DNA manifestiraju u obliku MN. Prema tome, bilo je za očekivati da će do eventualnog porasta broja MN doći tek u uzorku uzetom 72 sata nakon izbjeljivanja, dok u uzorku uzetom neposredno nakon izbjeljivanja razlike neće biti.

U uzorku uzetom s gingive 72 sata nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2 zapažen je statistički značajan ($p < 0.01$) porast ukupnog broja MN u odnosu na uzorke uzete prije i neposredno nakon izbjeljivanja. Porast broja MN nije zapažen u uzorku uzetom s usnice. U uzorku stanica uzetih s usnice neposredno nakon izbjeljivanja uočen je statistički značajno ($p < 0.01$) niži broj MN u odnosu na uzorak uzet prije izbjeljivanja. Ovo odstupanje moglo bi se objasniti kao posljedica tehničke izvedbe uzorkovanja. Naime, prilikom uzimanja prvog brisa (prije izbjeljivanja) sakupljene su stanice neposredno ispod keratiniziranog sloja koje su izloženije učinku sastojaka konzumirane hrane i pića te su starije od stanica iz dubljih slojeva. Stoga one imaju povećanu genomsku nestabilnost, što se očituje kao veći broj MN u odnosu na stanice iz dubljih slojeva (22). U drugom brisu, uzetom neposredno nakon izbjeljivanja, sakupljene su stanice iz dubljih slojeva koje su mlađe i imaju stabilniji genom, a time i manje MN.

Razdioba broja MN po stanicama (broj stanica s 1, 2 ili više od 3 MN) nije pokazala statistički značajnu razliku između pojedinih uzoraka ni u stanicama sakupljenim s gingive ni u stanicama sakupljenim s usnice. Ovo upućuje na činjenicu da oštećenja detektirana porastom ukupnog broja MN nisu zahvaćala veći postotak genoma.

U uzorcima stanica praćena je i prisutnost morfoloških promjena jezgre koje bi upućivale na pokretanje molekularnih mehanizama umiranja stanica – kariorekse i kariolize. Karioreksa se smatra markerom apoptoze, a karioliza je morfološka manifestacija nekroze (26). Oba tipa anomalija zabilježena su sa statistički značajno povećanom učestalošću u uzorku stanica s gingive uzetim 72 sata nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2. Porast učestalosti karioliza bio je značajnije ($p < 0.01$) izražen u odnosu na porast učestalosti karioreksa ($p < 0.05$). Treba napomenuti da nekroza može djelomično biti potaknuta i

mehaničkim oštećenjima stanica prilikom uzimanja brisa. Povećani broj karioreksa upućuje na indukciju apoptoze (27). Stanična smrt apoptozom uzrokovana je različitim čimbenicima u stanici i izvan stanice, a između ostalog, može biti posljedica oštećenja genetskog materijala i oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres pak dovodi do oštećenja genetskog materijala. Povećan broj apoptotičnih stanica, zajedno s povećanim brojem MN, upućuje na zaključak da je nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2 u stanicama uzorka s gingive došlo do oksidacijskog stresa i oštećenja genoma.

Broj binuklearnih stanica je indikator toksičnog djelovanja na proteinske strukture u stanici, ponajprije citoskelet, u slučaju kojeg se zbog nemogućnosti pravilnog odvijanja citokineze pojavljuju stanice s dvije jezgre (28). Ni u jednom od uzoraka nije zabilježen porast broja binuklearnih stanica, stoga se može zaključiti da postupak izbjeljivanja nije imao učinka na proteinske strukture u stanici. Nadalje, povećani broj binuklearnih stanica značio bi da su, uz ostale proteinske tvorbe, oštećenjem zahvaćeni i mikrotubuli diobenog vretena. Uslijed toga bi došlo do zaostajanja čitavih kromosoma u anafazi, a oni bi formirali MN. Budući da to nije slučaj, možemo zaključiti da uočeni MN potječu od fragmenata DNA, a ne od čitavih kromosoma, odnosno da preparati za izbjeljivanje izravno oštećuju molekulu DNA uzrokujući lomove što rezultira formiranjem MN (28).

Nukleoplazmatski mostovi najčešće nastaju fuzijom kromosoma oštećenih u predjelu telomera, zbog čega je onemogućeno njihovo pravilno raspoređivanje u anafazi (21). Njihova pojava predstavlja značajnije narušavanje integriteta genoma – promjenu strukture i organizacije kromosoma te mehanizama popravaka. Kako ni u jednom od uzoraka uzetih nakon izbjeljivanja nije došlo do povećane pojavnosti nukleoplazmatskih mostova, zaključujemo da integritet genoma nije ozbiljnije narušen.

Jezgreni pupovi su morfološka manifestacija izdvajanja amplificiranog ili teško oštećenog dijela genoma iz jezgre. Pup sadrži izdvojeni dio genetskog materijala, a odvajanjem od jezgre oblikuje MN koji putuje prema staničnoj membrani gdje se ponovnim pupanjem izbacuje iz stanice (21). Porast broja jezgrenih pupova uočen je 72 sata nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2 u uzorku s usnice i u uzroku s gingive, međutim, nije bio statistički značajan. Ipak, ovaj nalaz upućuje na činjenicu da dio zapaženih MN ne potječe od fragmenata molekule DNA iz anafaze, već nastaje izdvajanjem težih oštećenja nastalih tijekom interfaze.

Nakon primjene preparata Zoom2 nisu zapažene statistički značajno povišene vrijednosti nijednog markera u stanicama s usnice, već samo u stanicama s gingive. Stoga se može zaključiti da je tijekom postupka izbjeljivanja sluznica usnice bila dobro zaštićena od genotoksičnog učinka preparata za izbjeljivanje. Zapaženi genotoksični učinak na gingivu može biti posljedica izravnog djelovanja preparata uslijed neadekvatno postavljene zaštite, ili može nastati djelovanjem vodikova peroksida i produkata njegove razgradnje koji se otpuštaju iz tvrdih zubnih tkiva po završenom postupku izbjeljivanja (29). Ovo

drugo je vjerojatnije, jer tijekom postupka izbjeljivanja kod nijednog ispitanika nije zapaženo propuštanje gingivne zaštite.

Postupak izbjeljivanja preparatom Boost pokazao je nešto veću genotoksičnost u odnosu na Zoom2. Ukupan broj MN statistički je značajno povećan nakon 72 sata u uzorku uzetom i s gingive i s usnice. Za razliku od uzorka s usnice, u uzorku s gingive zabilježene su promjene u razdiobi MN. Došlo je do statistički značajnog ($p < 0.05$) porasta broja stanica koje sadrže 3 ili više MN, što upućuje na zaključak da je primjenom preparata Boost veći postotak genoma zahvaćen oštećenjima. Za razliku od izbjeljivanja preparatom Zoom2, primjena preparata Boost nije dovela do porasta broja karioreksa ni karioliza, što znači da nije inducirao staničnu smrt. Također nisu zabilježene ni promjene u broju nukleoplazmatskih mostova niti jezgrenih pupova što upućuje na zaključak da je ukupni broj MN porastao isključivo uslijed genotoksičnog učinka koji uzrokuje lomove DNA, a ne izdvajanjem teže oštećenog genetskog materijala tijekom interfaze. U uzorku stanica s gingive došlo je do neznatnog porasta broja binuklearnih stanica što bi moglo upućivati na visoku razinu oksidacijskog stresa koji dovodi do oštećenja citoskeleta, ali ne u dovoljnoj mjeri da bi to dovelo do smetnji u odvijanju staničnog ciklusa. Kao i u slučaju izbjeljivanja preparatom Zoom2, nakon primjene preparata Boost genotoksični je učinak bio jače izražen u stanicama s gingive.

Zapažena je velika varijabilnost vrijednosti praćenih markera genotoksičnosti među pojedinim ispitanicima. Velike razlike pojavile su se u sva tri uzorkovanja (neposredno prije, neposredno nakon i 72 sata nakon postupka izbjeljivanja), a zajedno s malim brojem ispitanika ($n=6$ u svakoj skupini) razlog su izrazito velikoj standardnoj devijaciji. Ovakva varijabilnost vjerojatno je posljedica izlaganja ispitanika različitim genotoksičnim faktorima u svakodnevnom životu, što se zbog izrazite osjetljivosti MN testa očituje kao porast navedenih markera. U svojoj meta-analizi, Ceppi et al. su analizirali 63 studije koje koriste MN test za određivanje genotoksičnog učinka različitih kemijskih spojeva u profesionalnoj ili slučajnoj izloženosti (22). U kontrolnim skupinama zabilježena su izrazito velika odstupanja među ispitanicima, a i srednje vrijednosti MN se jako razlikuju između pojedinih studija. Stoga vjerujemo da je velika varijabilnost zapažena u ovom istraživanju neizbježna, budući da već u bazalnim uvjetima postoje velike razlike u broju MN među ispitanicima. Kako u kliničkim uvjetima nije moguće smanjiti varijabilnost praćenih markera među ispitanicima, smatramo da bi za precizniju procjenu bilo poželjno povećati broj ispitanika.

Kako u dostupnoj literaturi nisu pronađena istraživanja koja za procjenu genotoksičnosti preparata za izbjeljivanje u kliničkim uvjetima koriste MN test, dobivene rezultate nije moguće usporediti s onima drugih autora. Ovo istraživanje pokazalo je da preparati za izbjeljivanje uzrokuju oštećenja genetskog materijala stanica oralne sluznice, ali nije moguće procijeniti kakve implikacije zapažena oštećenja imaju na eventualnu malignu transformaciju stanica. Naime, zapaženi porasti markera

genotoksičnosti su, iako statistički značajni, bili relativno mali s obzirom na veliku individualnu varijabilnost koja postoji već u bazalnim uvjetima (22). Budući da se radi o stanicama s kratkim životnim vijekom, jednokratna izloženost ovako blago genotoksičnoj noksi vjerojatno ima neznatan karcinogeni potencijal. Stoga su potrebna daljnja istraživanja koja će procijeniti genotoksičnost i eventualnu karcinogenost preparata za izbjeljivanje u kliničkim uvjetima.

5. ZAKLJUČCI

Oba preparata za izbjeljivanje pokazala su genotoksični učinak na stanice oralne sluznice. Kod primjene preparata Boost genotoksični učinak bio je nešto izraženiji: zapažen je na sluznici usnice i gingivi, a kod preparata Zoom2 zapažen je samo na gingivi.

Kod izbjeljivanja preparatom Zoom2 došlo je do pokretanja stanične smrti apoptozom i nekrozom, a preparat Boost uzrokovao je opsežnija oštećenja genoma.

Ovakvi nalazi navode na zaključak da provedeni postupci izbjeljivanja zubi imaju određeni genotoksični učinak na stanice oralne sluznice, ali je teško procijeniti koliko je on klinički značajan. Zbog nedostatka sličnih istraživanja nije moguće raspravljati o eventualnom karcinogenom potencijalu preparata za izbjeljivanje, iako je on vjerojatno zanemariv u usporedbi sa svakodnevnom izloženošću drugim genotoksičnim čimbenicima. Potrebna su daljnja istraživanja s ciljem kvantifikacije zapaženih genotoksičnih učinaka i njihovih dugoročnih posljedica na stanice oralne sluznice.

6. ZAHVALE

Zahvaljujemo našoj mentorici, prof.dr.sc. Zrinki Tarle na pomoći pri realizaciji ovog rada. Također od srca zahvaljujemo Evi Klarić, dr.med.dent. na nesebičnoj pomoći pri izvođenju kliničkog dijela istraživanja te na podršci u najtežim trenucima. Neizmjereno joj hvala što nas je vodila i usmjeravala kada nismo znali kako dalje nastaviti te što je uvijek je bila tu za nas. Zahvaljujemo i dr.sc. Davoru Želježiću i dr.sc. Nevenki Kopjar s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu na pomoći pri izvođenju mikronukleus testa i statističkoj obradi podataka. Rad je izrađen u okviru projekta MZOŠ „Nanostruktura restaurativnih materijala i interakcije s tvrdim zubnim tkivima“ br. 065-0352851-0410.

7. POPIS LITERATURE

1. Kwon SR, Ko SH, Greenwall LH. Tooth whitening in esthetic dentistry: principles and technique. London: Quintessence Pub; 2009.
2. Joiner A. The bleaching of teeth: A review of the literature. J Dent 2006;34:412-9.
3. Waris G, Haseeb A. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. J Carcinogen 2006;5:14-21.
4. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z et al. Patofiziologija. 6th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2005.
5. Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA, Ames BN. A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:7445-9.
6. DeFlora S, Camoirano, A, Zanicchi P, Bennicelli C. Mutagenicity testing with TA97 and TA102 of 30 DNA-damaging compounds, negative with other Salmonella strains. Mutat. Res. 1984;134:159-65.
7. Glatt H. Mutagenicity spectra in Salmonella typhimurium strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species. Mutagenesis 1989;4:221-7.
8. Ziegler-Skylakakis K, Andrae U. Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. Mutat Res 1987;192:65-7.
9. Kruszewski M, Green MHL, Lowe JE, Szumiel I. DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4°C and 37°C in L5178Y sublines. Mutat Res 1994;308:233-41.
10. Tsuda H. Chromosomal aberrations induced by hydrogen peroxide in cultured mammalian cells. Jpn J Genet 1981;56:1-8.
11. Li Y, Noblitt T, Zhang A, Origel A, Kafrawy A, Stookey G. Effect of long-term exposure to a tooth whitener. J Dent Res 1993;72:248
12. Regnier JF, Clare C, de Gerlache J, Malinverno G, Mayr W, Weiner ML, Trochimowicz H. Ex vivo and in vitro unscheduled DNA synthesis (UDS) assays in rat liver with hydrogen peroxide (H₂O₂). Mutat Res 1997;379:168-9.
13. Regnier JF, Molinier B, Bentley KS, de Gerlache J, Malinverno G, Mayr W, Weiner ML, Trochimowicz H, Brock W. Micronucleus tests in mice with hydrogen peroxide. Fund Appl Toxicol Suppl 1996;30:233.
14. Ito A, Naito M, Watanabe H. Implication of chemical carcinogenesis in the experimental animal - tumorigenic effect of hydrogen peroxide in mice. Nenpo 1981;22:147-58.

15. Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y. Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide. *GANN* 1981;72:174-5.
16. Ito A, Naito M, Naito Y, Watanabe H. Induction and characterization of gastro-duodenal lesions in mice given continuous oral administration of hydrogen peroxide. *GANN* 1982;73:315-22.
17. Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R. Tooth whitening products and the risk of oral cancer. *Food Chem Tox* 2006;44:301-15.
18. Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP). Hydrogen peroxide and hydrogen peroxide releasing substances in oral health products. 1999; SCCNFP/0058/98.
19. International Agency on Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. 1999;71.
20. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.*2008;659:93-108.
21. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003;534(1-2):65-75.
22. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutat Res: Rev Mutat Res.* In press, 2010, doi: 10.1016/j.mrrev. 2009. 11. 001
23. Sarto F, Tomanin R, Giacomelli L, Canova A, Raimondi F, Ghiotto C, Fiorentino MV. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antitumoral therapy. *Mutat Res.* 1990;228:157-69.
24. Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 1999;442:29-35.
25. Mayer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage in chemopreventive trials. *Mutat Res.* 2001;489:147-72.
26. Majno G, Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis - An Overview of Cell Death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):16-9.

27. Cerqueira EMM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res.* 2004;562:111-7.
28. Torres-Bugarín A, Ventura-Aguilar A, Zamora-Perez BC, Gómez-Meda ML, Ramos-Ibarra G, Morgan-Villela A, Gutiérrez-Franco G. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res* 2003;539:177-86.
29. Lai SC, Tay FR, Cheung GS, Mak YF, Carvalho RM, Wei SH et al. Reversal of compromised bonding in bleached enamel. *J Dent Res* 2002;81(7):477-81.

Genotoksični učinak preparata za izbjeljivanje zubi na oralnu sluznicu

8. SAŽETAK

Za izbjeljivanje zubi koriste se preparati na bazi vodikova peroksida, karbamid peroksida i natrijevog perborata. Aktivni spoj svih preparata za izbjeljivanje je vodikov peroksid koji pokazuje genotoksični učinak in vitro. Genotoksičnost je dokazana u kulturama bakterijskih stanica i u kulturama nekih eukariotskih stanica. Genotoksično djelovanje vodikova peroksida in vivo je dvojbeno – brojne studije pokazuju da on nema genotoksično, karcinogeno niti promotorsko djelovanje, dok je u nekoliko studija zabilježena povećana incidencija duodenalne hiperplazije i njena zloćudna preobrazba. Dosadašnja klinička istraživanja većinom su usmjerena na nuspojave izbjeljivanja u vidu preosjetljivosti i iritacije gingive, dok podaci o genotoksičnosti i karcinogenosti manjkaju. Svrha ovog rada bila je istražiti mogući genotoksični učinak dvaju preparata za izbjeljivanje vitalnih zubi u kliničkim uvjetima, uz strogo pridržavanje uputa proizvođača o njihovoj uporabi. Istraživanje je provedeno na 12 ispitanika koji su podijeljeni u dvije skupine po 6 ispitanika, u prvoj skupini primijenjen je preparat tvorničkog imena Zoom2 (Discus Dental, SAD), a u drugoj Opalescence Boost (Ultradent, SAD). Svakom ispitaniku su u dva odvojena brisa uzeti uzorci stanica s područja gingive i sluznice gornje usnice. Brisovi su uzeti tri puta: neposredno prije, neposredno nakon te 72 sata nakon postupka izbjeljivanja zubi. Uzorci su analizirani mikronukleus testom i procijenjena je genotoksičnost upotrijebljenih preparata na epitelne stanice oralne sluznice. Za svako uzorkovanje analizirano je 2000 stanica. Srednje vrijednosti pojedinih markera genotoksičnosti uspoređene su neparametrijskim hi-kvadrat testom, uz razinu značajnosti od 0.05. Statistički značajno povećanje ukupnog broja mikronuklea te učestalosti karioreksa i karioliza pronađene su u uzorcima uzetim s gingive 72 sata nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2. Postupak izbjeljivanja preparatom Boost pokazao je nešto veću genotoksičnost: ukupni broj mikronuklea bio je statistički značajno povećan u uzorku s gingive, ali i u uzorku s usnice koji su uzeti 72 sata nakon izbjeljivanja, a dodatno je u uzorku s gingive bio statistički značajno povećan i broj stanica s više od 3 mikronuklea.

Ključne riječi: izbjeljivanje zubi, vodikov peroksid, genotoksičnost, mikronukleus test

Genotoxic effect of tooth bleaching preparations on the oral mucosa

9. SUMMARY

For tooth bleaching, preparations are used which are based on hydrogen peroxide, carbamide peroxide and sodium perborate. The active compound of all bleaching products is hydrogen peroxide which shows a genotoxic effect in vitro. Genotoxicity has been proven in bacterial cell cultures as well as in cultures of some eukaryotic cells. The genotoxic effect of hydrogen peroxide in vivo is questionable – numerous studies show that it has neither genotoxic nor carcinogenic nor promoting effect, while in a couple of studies increased incidence of duodenal hyperplasia and its malignant transformation was noted. The vast majority of present clinical research focuses on the side effects of tooth bleaching manifesting itself in hypersensitiveness and irritation of the gingiva, while data on genotoxic and carcinogenic effects are lacking. The purpose of this study was to investigate a possible genotoxic effect of two bleaching products under clinical conditions, while strictly adhering to the manufacturer's directions for their use. The research was conducted on 12 test subjects which were divided into two groups of 6 test subjects each. Group 1 was treated with a product under the factory name Zoom2 (Discus Dental, SAD), while Group 2 was treated with Opalescence Boost (Ultradent, SAD). From each test subject specimens were taken, in two separate swabs, of the gingival area and the upper lip mucosa. Swabs were taken three times: just before, immediately after and 72 hours after the tooth bleaching procedure. The specimens were analyzed using micronucleus test, and an evaluation was made of the genotoxicity of the used preparations on the oral mucosa's epithelial cells. For each sampling, 2000 cells were analyzed. The mean values of the individual genotoxicity markers were compared using the nonparametric chi-square test, at a significance level of 0.05. Statistically significant increase of the total number of micronuclei and of the karyorrhexis and karyolysis frequency were found in specimens taken from the gingiva 72 hours after bleaching by means of the Zoom2 preparation. The bleaching by means of the Boost preparation showed a somewhat increased genotoxicity: the total number of micronuclei showed a statistically significant increase in the specimen taken from the gingiva, but also in the specimen taken from the lip 72 hours after the bleaching procedure. In addition, the specimen taken from the gingiva also showed a statistically significant increase of cells with more than 3 micronuclei.

Key words: tooth bleaching, hydrogen peroxide, genotoxicity, micronucleus test