

# Procjena oštećenja bukalnih stanica usne šupljine uzrokovanih fluoridima

---

**Puizina Mladinić, Ema**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:933481>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-15**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**EMA PUIZINA MLADINIĆ, dr. med.**

**PROCJENA OŠTEĆENJA BUKALNIH STANICA USNE**  
**ŠUPLJINE UZROKOVANIH FLUORIDIMA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2024.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**EMA PUIZINA MLADINIĆ, dr. med.**

**PROCJENA OŠTEĆENJA BUKALNIH STANICA USNE**  
**ŠUPLJINE UZROKOVANIH FLUORIDIMA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2024.**

Ova doktorska disertacija izrađena je pri Katedri za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu te pri Laboratoriju za molekularnu biologiju i genetiku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta u Splitu.

**Voditelj rada:** Izv. prof. dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. Antoniji Tadin na potpori, stručnom vođenju i strpljenju tijekom izrade disertacije.*

*Zahvaljujem djelatnicima Galenskog laboratorija Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije na suradnji.*

*Zahvaljujem kolegi Dinku Martinoviću na podršci i pomoći prilikom izrade disertacije.*

*Zahvaljujem majci Jasni i očuhu Goranu na podršci svih ovih godina.*

*Zahvaljujem Loti i Vitu što su svojoj mami glavna motivacija i pokretačka sila, bez vas ništa ne bi imalo smisla.*

## SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1. Usna šupljina .....  | 2         |
| 1.2. Zubni karijes.....   | 5         |
| 1.3. Procjena oralnog zdravlja i rasprostranjenosti karijesa u populaciji ..... | 6         |
| 1.4. Stavovi, znanja i ponašanje pojedinaca prema oralnom zdravlju.....         | 8         |
| 1.5. Prevencija zubnoga karijesa .....  | 9         |
| 1.6. Fluoridi u prevenciji zubnog karijesa .....                                | 13        |
| 1.7. Toksičnost fluorida.....   | 16        |
| 1.8. Bukalni mikronukleusni citom test.....                                     | 18        |
| <b>2. CILJEVI RADA I HIPOTEZE</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>3. ISPITANICI I POSTUPCI</b> .....   | <b>26</b> |
| 3.1. Dizajn istraživanja .....  | 27        |
| 3.2. Ispitanici.....  | 28        |
| 3.3. Postupci .....   | 32        |
| 3.3.1. Toksikologija oralno - higijenskih pripravaka .....                      | 32        |
| 3.3.2. Anketni upitnik .....  | 35        |
| 3.4. Statistička raščlamba .....  | 36        |
| <b>4. REZULTATI</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>5. RASPRAVA</b> .....  | <b>62</b> |
| <b>6. ZAKLJUČCI</b> .....   | <b>70</b> |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>7. LITERATURA.....</b> | <b>73</b> |
| <b>8. SAŽETAK .....</b>   | <b>87</b> |
| <b>9. SUMMARY .....</b>   | <b>89</b> |
| <b>10. ŽIVOTOPIS.....</b> | <b>92</b> |
| <b>DODATAK I.....</b>     | <b>96</b> |

## POPIS OZNAKA I KRATICA

- BMCyt** bukalni mikronukleus citom test (engl. *Buccal Micronucleus Cytome assay*)
- BMI** indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*)
- BN** binuklearna stanica (engl. *Binuclear Cell*)
- CAST** indeks spektra procjene karijesa i liječenja (engl. *Caries Assessment Spectrum and Treatment Index*)
- CCC** stanica s kondenziranim kromatinom (engl. *Condensed Chromatin Cell*)
- ICDAS** indeks međunarodnog sustava za otkrivanje i procjenu karijesa (engl. *International Caries Detection and Assessment System Index*)
- IHME** Institut za evaluaciju i zdravstvenu metriku (engl. *Institute For Health Metrics and Evaluation*)
- MN** mikronukleus (engl. *Micronucleus*)
- NBUD** stanica s jezgrenim pupoljkom (engl. *Nuclear Bud*)
- KAP** teorija o znanju, stavovima i ponašanju (engl. *Knowledge, Attitudes and Practices*)
- KEP** karijes, ekstrakcija, plomba indeks
- KHC** karioreksa (engl. *Karyorrhexis*)
- KYL** karioliza (engl. *Karyolysis*)
- PN** stanica s piknotičnom jezgrom (engl. *Pycnosis*)
- PPM** dijelova na milijun (engl. *Parts per Million, ppm*)



- PRS** indeks zahvaćenosti pulpe i sepse korijena (engl. *Pulpal Involvement Root Sepsis Index*)
- PUFA** pulpa-ulceracija-fistula-apsces indeks (engl. *Pulp-Ulcer-Fistula-Abscess Index*)
- ROS** reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species, ROS*)
- SiC** indeks značajnog karijesa (engl. *Significant Caries Index*)
- SLS** natrijev lauril sulfat (engl. *Sodium Laruyl Sulphate*)

## **1. UVOD**

Posljednjih stotinjak godina napredak u oralnoj higijeni poboljšao je zdravlje milijuna ljudi diljem svijeta. Međutim, zubni karijes i druge oralne bolesti su generalno u porastu zbog veće dostupnosti šećera kao i povećane konzumacije slatkih gaziranih napitaka (1). Promjene u prehrani dovele su do povećanja erozije zubi kao i bujanja oralne mikrobiološke flore, koja se sastoji od preko 700 vrsta bakterija (2). Određene vrste ovih bakterija stvaraju ljepljive biofilme poznatije kao zubni plak koji se stvara na površini zuba i uz rub gingive (3). Uklanjanje plaka s površine zubi i smanjenje bakterija koje proizvode kiseline odgovorne za omekšavanje cakline te neugodnog mirisa, ključni su za održavanje zdravlja usne šupljine (4).

U svrhu poboljšanja oralnog zdravlja, razvijeni su različiti oralno-higijenski proizvodi, a brzorastuće tržište proizvoda za oralnu higijenu dovelo je do kontinuiranog razvoja i istraživanja formulacija te razvoja novih proizvoda (5).

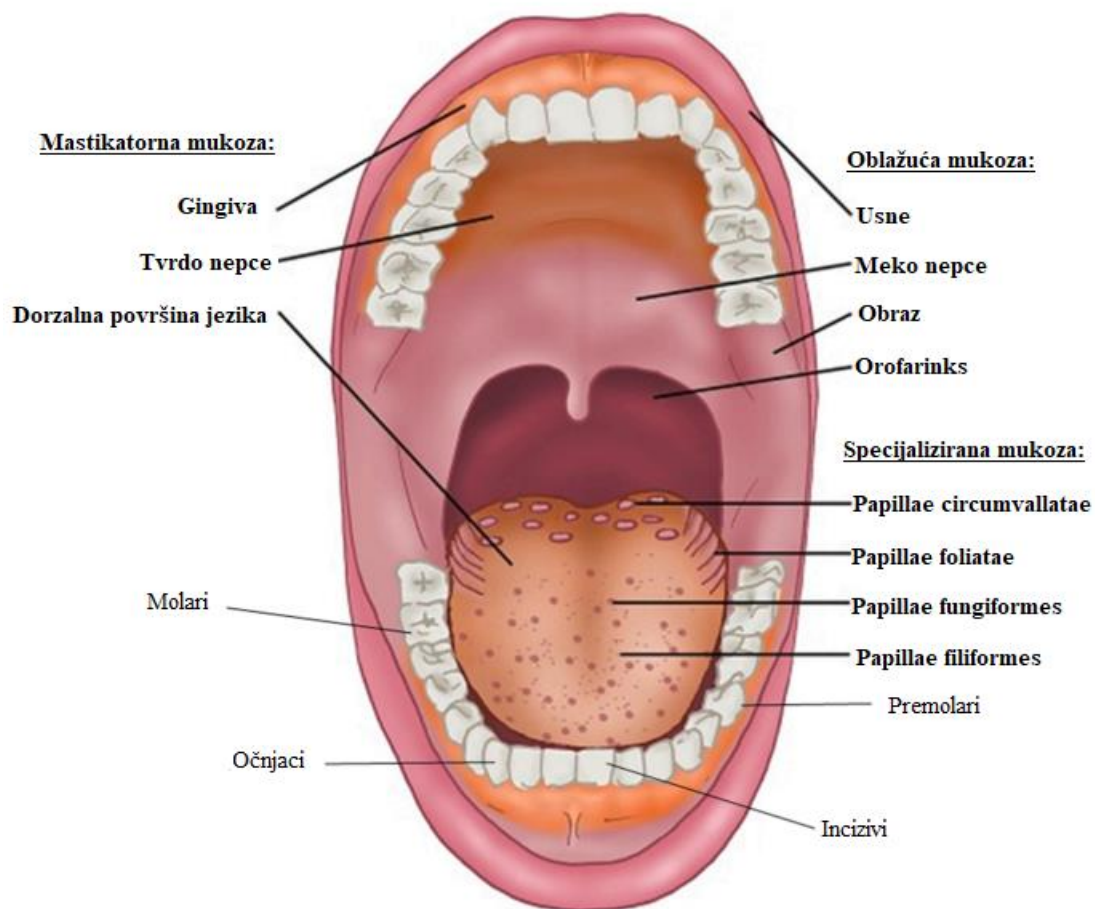
Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO), bolesti usne šupljine predstavljaju globalni javnozdravstveni problem koji značajno utječe na kvalitetu života i ekonomiju. Karijes je najrasprostranjenija nezarazna bolest na svijetu, koja utječe na 2 milijarde ljudi i 540 milijuna djece koja oboljevaju od karijesa mliječne denticije. Bolesti usne šupljine generalno zahvaćaju oko 3,5 milijarde ljudi diljem svijeta, a iako se uglavnom mogu spriječiti, predstavljaju veliki zdravstveni teret za mnoge zemlje i utječu na ljude tijekom cijelog života, uzrokujući bol, nelagodu, unakaženost pa čak i smrt (6).

Liječenje oralnih bolesti je skupo i obično nije dio univerzalne zdravstvene zaštite, što predstavlja značajan problem za siromašniji stanovništvo kojima se na taj način smanjuje dostupnost liječenja, a važno je za spomenuti da većina zemalja s niskim i srednjim dohotkom nema dovoljno dostupnih usluga za prevenciju i liječenje oralnih zdravstvenih stanja (7).

## **1.1. Usna šupljina**

Usna šupljina je dio probavnog trakta koji služi za hranjenje, disanje i vokalizaciju. Obložena je sluznicom koja se sastoji od različitih vrsta stanica, uz žlijezde koje stvaraju slinu. Također uključuje i jezik, važan organ za govorne funkcije i okus. Dio usne šupljine su i zubi, koji pomažu proces žvakanja i usitnjavanja hrane, a pomažu i pri izgovoru određenih glasova (8).

Sama oralna sluznica je ovlažena membrana koja se većinom sastoji od stratificiranog pločastog epitela, a može se podijeliti u tri kategorije prema histologiji i funkciji. Mastikatorna sluznica je keratinizirana te pokriva tvrdo nepce i gingivu, a zbog mehaničkih i abrazivnih procesa koji se odvijaju prilikom žvakanja i hranjenja, ovakva sluznica je otpornija i čvršća od ostatka usne šupljine (9). Oblažuća sluznica nije keratinizirana, a prekriva najveću površinu usne šupljine kao što su labijalna i bukalna sluznica. Specijalizirana mukoza prekriva dorzum jezika, a sadrži živčane završetke za okus i senzorne receptore (10) (Slika 1).



**Slika 1.** Položaj mukoznih površina i 32 zuba prisutna u usnoj šupljini odrasle osobe. Preuzeto i prilagođeno iz Aspinall SR, Parker JK, Khutoryanskiy VV, Oral care product formulations, properties and challenges, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021;200:111567.

Male žlijezde slinovnice secerniraju viskoelastičan sekret koji se sastoji od mucina i vode, a služi zaštititi sluznice protiv abrazija i patogena kao i ovlaživanju za proces žvakanja (11).

Bukalna sluznica *per se* sastoji se od više sluzničkih površina unutarnje strane obraza i dijela usana, koje čine anterolateralne granice vestibuluma usne šupljine. U doticaju je sa sluznicom alveolarnih grebena i dna usne šupljine. U ovoj regiji pronalazimo 800-1000 malih žlijezda slinovnica. Ušće Stensonovog kanala ili izvodnog kanala parotidne žlijezde se nalazi u području parotidne papile koja se nalazi u projekciji drugog maksilarnog kutnjaka. Inervacija bukalne sluznice se sastoji od *n. buccalis*, mandibularne grane trigeminalnog živca, a jedan dio inerviraju labijalne grane infraorbitalnog živca. Limfna drenaža ove regije je složena, a odvija se preko submandibularnih, parotidnih, obraznih ili preaurikularnih limfnih čvorova (12).

Bukalna sluznica obložena je stratificiranim pločastim epitelom koji se sastoji od četiri sloja. *Stratum corneum* ili rožnati sloj je izložen stalnom habanju kao najpovršniji sloj, *stratum granulosum* ili granulozni sloj, *stratum spinosum* ili trnasti sloj koji sadrži populaciju diferenciranih, apoptotičnih i nekrotičnih stanica te *stratum germinativum* ili sloj s bazalnim stanicama i bazalnim matičnim stanicama koje se diobom umnožavaju kako bi očuvale integritet i strukturu oralne mukoze. Vrijeme obnove epitela usne šupljine je vrijeme potrebno za migraciju stanice iz bazalnog do keratiniziranog sloja je od 7 do 21 dan (13).

Bukalna sluznica predstavlja barijeru za potencijalne kancerogene tvari koje svojim metabolizmom stvaraju potencijalno reaktivne produkte (14). S obzirom da je 90 % svih tumora epitelnog podrijetla, bukalna sluznica se može koristiti za praćenje nastanka rane genotoksičnosti (15).

Ceppi i sur. pronašli su jaku korelaciju genotoksičnog oštećenja u oljuštenim bukalnim stanicama s onim u limfocitima, što implicira da sustavni genotoksični učinci unutar krvotoka mogu biti vidljivi u bukalnim stanicama (16). Nadalje, dosadašnja saznanja o izloženosti različitim toksičnim agensima i genetskim varijablama koje utječu na učestalost mikronukleusa u limfocitima može se potencijalno primijeniti u određenoj mjeri na bukalne stanice, uključujući povezanost mikronukleusa s rizikom od raka (17). Ovaj patobiološki događaj ima nekoliko bioloških implikacija jer su genetska oštećenja usko povezana s nekoliko degenerativnih bolesti kao i s nastankom malignih oboljenja (18).

Procjenjuje se da je propusnost bukalne sluznice je 4 - 4000 puta veća od propusnosti kože jer je sluznica dobro opskrbljena vaskularnom i limfnom drenažom, a ukoliko se tim načinom primijeni npr. lijek, izbjegava se metabolizam prvog prolaza kroz jetru i eliminacija u gastrointestinalnom traktu (19).

Usna šupljina i bukalna sluznica predstavljaju prvi kontakt sa sredstvima za održavanje oralne higijene, bilo da se radi o zubnim pastama koje se nanose četkicom ili tekućinama za ispiranje usne šupljine kojima se postižu razna lokalna djelovanja, ovisno o potrebama pojedinca. Najčešće pripravci sadrže različite oblike fluorida zbog protektivnog djelovanja na karijes (20).

Bioraspoloživost fluorida ovisi o različitim čimbenicima kao što su primjena samih fluorida, kemijska formula primijenjenog fluorida i stopa lučenja sline (21). Dodatci sredstvima za održavanje oralne higijene kao što je natrijev lauril sulfat (engl. *Sodium Lauryl Sulphate*, SLS) mogu promijeniti strukturu biofilma samog zubnog plaka, što može imati utjecaj na koncentraciju fluorida u usnoj šupljini (22). Nekoliko studija pokazalo je da se koncentracija fluorida u slini povećava nakon pranja zubi zubnom pastom ili nakon primjene tekućine za ispiranje usne šupljine, ali se vraća na osnovnu razinu dva sata nakon primjene (23).

## **1.2. Zubni karijes**

Zubni karijes je progresivna, multifaktorijalna i jedna od najučestalijih bolesti na svijetu, a podliježu mu pripadnici svake životne dobi (24). Nastanak karijesa uzrokuje prehrana bogata šećerom, zaslađena pića i manjkava oralna higijena. Bolest se može razviti na kruni zuba kao i u korijenu zuba, a može se javiti i kod djece kao karijes mliječnih zubi. Inicijalno je bolest reverzibilna i može se zaustaviti (25).

Karijes je finalni rezultat uzastopnih ciklusa demineralizacije i remineralizacije spoja biofilma i površine zuba, a manifestira se kao lokalizirano oštećenje nastalo zbog kiselih produkata razgradnje ugljikohidrata bakterijskom fermentacijom (26). Bolest započinje stvaranjem bakterijskog biofilma (zubni plak) na površini zuba koji se sastoji organskog matriksa (polisaharidi i proteini), koji pruža zaštitu od isušivanja, obrane domaćina i povećava otpornost na sredstva za oralnu higijenu. Bakterije u biofilmu izlučuju kiseline kao nusprodukt metabolizma fermentacije ugljikohidrata, a kiselina izaziva demineralizaciju zubnih tkiva što u konačnici dovodi do stvaranja kavitacije (27).

Utjecaj na nastanak karijesa imaju i mnogi drugi čimbenici, kao što su promjene u mikrobiologiji biofilma na zubima u smislu velikog broja karijesogenih bakterija – lokalni

mikrobiom, odgovor pojedinca na bakterije u smislu imunosti, neadekvatno lučenje ili sastav sline, brzina eliminacije fluorida, nedovoljna izloženost fluoridima, loša oralna higijena, neprikladni načini hranjenja (konzumacija šećera) i sl. (28).

Klinička detekcija karijesa radi se detaljnim vizualnim pregledom zubi. Iako se oštre zubne sonde još uvijek često koriste, one vrlo malo doprinose dijagnostičkoj koristi, a mogu biti i štetne. Radiološko snimanje zubi ili druge potporne dijagnostičke metode se također koriste u kliničkoj praksi za otkrivanje karijesnih lezija koje se ne mogu vidjeti pregledom, osobito one na aproksimalnim površinama zuba (29).

Poznato je da liječenje karijesa snosi visoke troškove, pa se na taj način otežava dostupnost liječenja, što u konačnici rezultira nastankom boli, infekcije i eventualnim gubitkom zahvaćenog zuba (30). Bez sumnje, gubitak zubi ima velik utjecaj na kvalitetu života jer utječe na prehranu, govor i estetski izgled (25).

### **1.3. Procjena oralnog zdravlja i rasprostranjenosti karijesa u populaciji**

Oboljenja usne šupljine kao što su karijes, bolesti desni i oralni karcinomi većinom se mogu prevenirati, a ipak su vrlo učestala oboljenja u populaciji. Procjena oralnog zdravlja i rasprostranjenosti karijesa u populaciji provodi se kroz nacionalna ili lokalna istraživanja oralnog zdravlja, a njihov cilj je prikupiti podatke o oralnom zdravlju populacije (31).

Prema Institutu za evaluaciju i zdravstvenu metriku (engl. *Institute For Health Metrics and Evaluation*, IHME) otprilike polovina populacije Europe ima neku vrstu oboljenja usne šupljine u 2019. godini. Gledajući na uzroke oboljenja, neliječeni karijes trajnih i mliječnih zubi bila je najčešća oralna bolest u 2019., a nakon njih po učestalosti su parodontalne bolesti i gubitak zubi (32).

Jedna od najvećih baza podataka o oralnom zdravlju u svijetu „Studija o globalnom teretu bolesti 2017.“ (engl. *Global Burden of Disease Study*, GBD) za oralne poremećaje (2020.) izvještava da se životna prevalencija karijesa smanjila u mnogim razvijenim zemljama tijekom posljednja četiri desetljeća. Međutim, neliječeni karijes ostaje problem socioekonomski depriviranih skupina u svim državama članicama Europske unije, a posebno u istočno - europskim zemljama. Najveća prevalencija oralnih bolesti zabilježena je u istočno - europskim

zemljama sa 60,6 % slučajeva u Hrvatskoj i 58,6 % u Sloveniji. S obzirom na današnji produljeni životni vijek pojedinca te zadržavanje svojih zubi do u kasnu starost, oboljenja zubi i usne šupljine imaju značajan utjecaj na kvalitetu života (33).

Za mjerenje i evaluaciju oboljenja od karijesa postoji nekoliko osmišljenih mjernih alata koji su pokušali prevladati ograničenja ili zamijeniti KEP indeks (karijes, ekstrakcija, plomba indeks). Neki od najvažnijih su: SiC indeks (engl. *Significant Caries Index*), ICDAS indeks I i II (engl. *International Caries Detection and Assessment System*), Specifični indeks karijesa (engl. *Specific Caries Index*), PUFA indeks (engl. *Pulp-Ulcer-Fistula-Abscess Index*), PRS indeks (engl. *Pulpal Involvement Root Sepsis Index*) i CAST indeks (engl. *Caries Assessment Spectrum and Treatment Index*). Istraživanja u populaciji pomažu identifikaciji rizičnih skupina te razvoju preventivnih programa koji mogu smanjiti incidenciju karijesa u populaciji kroz planirane javnozdravstvene strategije (34).

Postoji niz različitih mjerenja ishoda za oralne bolesti. KEP indeks je dentalni indeks koji ukazuje na to koliko zubi ima karijes, koliko ih je odstranjeno i koliko liječeno ispunom. Jedna je od najjednostavnijih i najvažnijih metoda za procjenu dentalnog statusa (35). Koristi se kao metoda za mjerenje i analiziranje dentalnog statusa pojedinca i skupine, a važan je čimbenik statističke evaluacije, prikaza prevalencije i incidencije karijesa (36). Primjenjuje se za ispitivanje u trajnoj denticiji, KEP indeks manji od 1,2 se smatra jako niskim, 1,2 – 2,6 niskim, a 2,7 – 4,4 umjerenim te iznad 4,5 ili više je visok KEP indeks (37). Prema istraživanju kretanja karijesa od 1996. do 2016. godine (ORCA, engl. *European Organization for Caries Research*) kod odraslih osoba iz 23 europske zemlje, srednja vrijednost KEP indeksa kretala se od 6,6 do 17,6 (medijan 12,1). Dok je kod građana starije životne dobi iz 21 europske zemlje, srednji rezultat KEP indeks varirao je od 14,7 do 25,5 (medijan 22,0) (38).

KEP indeks se od 1938. godine koristi kao relevantan alat za praćenje trendova karijesa prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (39). Generalno se bilježi pad prevalencije karijesa u svijetu zbog organizirane dentalne zdravstvene zaštite, dostupnosti fluorida i ostalih oralno-higijenskih pripravaka, fluoriranja vode u nekim zemljama te bolje svijesti o ovoj bolesti (40). Međutim, ova metoda ima i svoja ograničenja, naime KEP indeks ne odražava nužno sva oboljenja od karijesa (rane lezije na zubima se ne računaju kao ni karijesne lezije koje su prethodno restaurirane), ne razlikuje gubitak zuba zbog karijesa od gubitka zbog drugih stanja kao što su trauma ili parodontitis, ne koristi se za procjenu karijesa korijena zuba te ne može



pratiti progresiju karijesa (41). Iako je KEP indeks valjan instrument u procjeni oralnog zdravlja s obzirom na njegovu definiciju i jednostavan izračun, vrlo je teško uspoređivati različite zemlje zbog velikih razlika u godinama kada su studije provedene. Osim toga, uspoređivanje stanja oralnog zdravlja između različitih zemalja preko KEP indeksa predstavlja izazov jer se koriste različite nacionalne metode prikupljanja podataka te postoje različite prakse vezane uz trening kliničara koji provode ispitivanje (42). Nedavna studija pokazuje da većina trenutno raspoloživih podataka o karijesu preko KEP indeksa u 12 - godišnje djece nije usporediva diljem Europe, a razlozi su da europske zemlje primjenjuju različite načine uzorkovanja, te imaju različite kriterije za otkrivanje karijesa te kalibraciju ispitivača (43).

#### **1.4. Stavovi, znanja i ponašanje pojedinaca prema oralnom zdravlju**

Očuvano zdravlje usne šupljine esencijalno je za poboljšanje zdravlja i kvalitete života. Bolesti usne šupljine i zubi zanemareno su područje javnog zdravstva u svijetu, a mogu se prevenirati mjerama održavanja oralne higijene i redovnom upotrebom oralno - higijenskih pripravaka koji su široko dostupni (44). Dokazano je da ispravno održavanje higijene usne šupljine pozitivno utječe na pojedinca (45).

Istraživanjem znanja, stavova i ponašanja prema oralnom zdravlju se može ocijeniti pristup pojedinaca prema oralnom zdravlju te u skladu s tim provesti bolju kontrolu bolesti i prevenciju nastanka zubnog karijesa i drugih oralnih stanja. Većinom loše stanje usne šupljine vodi morbiditetu, a ne mortalitetu pa se zbog toga ovo područje nepravredno marginalizira (31).

Teorija o znanju, stavovima i ponašanju (engl. *Knowledge, Attitudes and Practices*, KAP) je teorijski okvir koji se koristi za objašnjenje kako se ljudi ponašaju u određenim situacijama. Ova teorija se često primjenjuje u istraživanjima ponašanja vezanog za zdravlje, kao što su npr. istraživanja o promjeni navika u prehrani ili navikama vezanim uz tjelesnu aktivnost. Prema ovoj teoriji, ljudi se ponašaju u skladu s onim što znaju i što vjeruju. Stoga, poznavanje nekog čimbenika može utjecati na formiranje stavova i ponašanja vezanih za taj čimbenik. Također, stavovi mogu utjecati na ponašanje jer ljudi često djeluju u skladu sa svojim stavovima (46).

Ova teorija pretpostavlja tri glavna čimbenika koji utječu na ponašanje:

1. Znanje – ljudi će se vjerojatnije ponašati na određeni način ukoliko su educirani, pa je stoga informiranje važno za promjenu ponašanja;
2. Stavovi – ljudi često imaju pozitivne ili negativne stavove prema određenim čimbenicima, a stavovi mogu utjecati na ponašanje, kao u primjeru da netko ima negativan stav prema tjelesnoj aktivnosti, manje je vjerojatno da će biti fizički aktivan;
3. Ponašanje – prethodno ponašanje može utjecati na buduće ponašanje, što znači ako je pojedinac imao pozitivno iskustvo s određenim ponašanjem, vjerojatnije je da će se ponovno ponašati na taj način.

Teorija o znanju, stavovima i ponašanju se često koristi u istraživanjima o ponašanju vezanom za zdravlje kako bi se razumjelo zašto ljudi čine određene izbore u vezi s prehranom, tjelesnom aktivnošću, pušenjem i drugim aspektima života koji mogu utjecati na zdravlje (46).

Primjena upitnika kojeg ispitanik sam ispunjava smatra se validnom i prihvaćenom metodom koja je jednostavna za evaluaciju, a rezultati ovakvih upitnika mogu koristiti za unaprjeđenje programa prevencije. Ovaj oblik istraživanja se često koristi u sociologiji, psihologiji, medicini i drugim disciplinama kako bi se prikupili podaci o stavovima, uvjerenjima, navikama i drugim aspektima života (47). Samoispunjavajući upitnik obično se sastoji od niza pitanja na koje ispitanik odgovara samostalno. Pitanja mogu biti otvorenog ili zatvorenog tipa, a mogu se koristiti i različite vrste skala, poput Likertove skale da bi se izmjerili stavovi i mišljenja ispitanika (48).

## **1.5. Prevencija zubnoga karijesa**

Redovita oralna higijena je važna za održavanje zdravih zubi i desni te za prevenciju karijesa, bolesti parodonta i drugih problema usne šupljine. U prevenciji zubnog karijesa veliku ulogu igra vrsta prehrane, pa se tako u sklopu kampanja za prevenciju koriste i preporuke za zdravu dijetu odnosno prehrana bazirana na škrobnoj hrani, voću, povrću, unos većih količina ribe i smanjenje unošenja zasićenih masti i šećera, kao i soli (6).

Među sredstvima za održavanje oralne higijene, fluoridi se izdvajaju svojim višestrukim djelovanjem u prevenciji nastanka karijesa, a najvažniji od njih je sprječavanje demineralizacije

i poticanje remineralizacije (49). U upotrebi su različita sredstva za održavanje oralne higijene koja se mogu koristiti, a neka od najčešćih su četkica za zube, zubni konac, interdentalna četkica, tekućina za ispiranje usne šupljine, čistač jezika i razna topikalna sredstva s djelatnim tvarima. Svrha sredstava za održavanje oralne higijene, a posebno četkanja zubnom četkicom i pastom za zube je sprječavanje formiranja zubnog plaka koji potencijalno vodi prema nastanku karijesa, gingivitisa i parodontitisa.

Plak na površini zuba se primarno treba odstraniti mehanički četkanjem manualnom ili električnom četkicom te interdentalnim pomagalima, kao što su zubni konac, interdentalne četkice ili zubni štapići (50). Tekućine za ispiranje usne šupljine se često koriste kao dodatak osnovnom sredstvu za održavanje oralne higijene u svrhu smanjenja koncentracije mikroorganizama u usnoj šupljini te za izbjegavanje nastanka zadaha. Površina jezika se također može čistiti jezičnim strugačem ili četkicom za zube (51). Djeca koja su koristila drugu vrstu topikalno primijenjenih fluorida, kao što su tekućine za ispiranje usne šupljine ili fluoridirane lakove, imala su značajnu redukciju nastanka karijesa u usporedbi s djecom koja su koristila samo fluoridirane zubne paste (52).

Pečaćenje fisura jedan je od dodatnih načina zaštite zubi od karijesa, naime 50 % karijesnih lezija u školske djece nastaje na okluzalnim plohama trajnih kutnjaka (53). Materijal za pečaćenje fisura se postavlja u područje usjeklina na zubima te se na taj način onemogućava nastanak karijesa na tim plohama. Ukoliko je dijete imalo karijes na mliječnom zubu, postoji velika šansa da će ga imati i na trajnim zubima pa se prema tome preporuča pečaćenje fisura odmah po nicanju trajnih kutnjaka (54).

### ***Zubne paste***

Zubne paste su nositelj održavanja oralne higijene, a radi se o sredstvima u obliku paste ili gela koji se na zube nanosi četkanjem, u svrhu mehaničke abrazije bakterijskog biofilma i naslaga hrane, kao i za kemijsku kontrolu pH u usnoj šupljini i na površini zuba. Radi se o jednom od najsloženijih medicinskih proizvoda, a sastoje se od abraziva, kao što su kalcijev karbonat, silicijev dioksid, aluminijski hidroksid i fosfati ili smjese u vodenoj vlažnoj fazi na bazi hidrokoloida. U ovakvoj matrici se nalaze surfaktanti, aktivni i terapijski sastojci, sladila, bojila, konzervansi i druge pomoćne tvari (55).

Dodatna sredstva u zubnim pastama su sredstva za pjenjenje kao natrijev lauril sulfat ili kokamidopropilbetain, konzervansi među kojima je najčešći natrijev benzoat, zaslađivači kao sorbitol, ksilitol ili aspartam, aromatične tvari koje dodaju okus i miris – mentol, eukaliptus ili pepermint. Zubne paste postale su spoj različitih aktivnih sastojaka kako bi obuhvatile borbu protiv karijesa, drugih stanja u usnoj šupljini te pružile kozmetičke benefite kao što je osvježanje daha (56).

Prilikom četkanja, zubne paste formiraju pjenastu strukturu u kombinaciji sa slinom i mehaničkim četkanjem. Ova pjenasta struktura potpomaže prodiranje aktivnih sastojaka u sve dijelove usne šupljine, a miješanjem sa slinom i raznim komponentama iz sline kao npr. kalcijem i proteinima, sastavnice zubne paste se aktiviraju i distribuiraju po zubima (55).

Zubne paste otprilike sadrže 1000 ppm (dijelova na milijun, engl. *Parts per Million*, ppm) fluora, što je 1 mg F/mL. *Parts per Million* ili ppm je mjerna jedinica koja se često koristi za mjerenje koncentracije fluorida u vodi za piće ili drugim proizvodima za oralnu higijenu. Koncentracija fluorida izražena u ppm pokazuje koliko miligrama fluorida ima po mililitru vode ili proizvodu za oralnu higijenu. U području Europske unije, fluoridi se tretiraju kao kozmetički proizvod, dopuštena je upotreba ukupno 20 različitih spojeva fluorida u oralno-higijenskim pripravcima, a maksimalna dopuštena koncentracija ne smije prelaziti 1500 ppm-a fluorida (Tablica 1) (57).

Jedan od kontroverznih sastojaka koji se često koristi u zubnim pastama je natrijev lauril sulfat (SLS). Radi se o anionskom površinsko-djelujućem sredstvu koje se koristi kao deterdžent i emulgator u mnogim kozmetičkim, oralno-higijenskim i drugim proizvodima zbog svog svojstva stvaranja pjenušave teksture proizvoda (58). Mogući štetni učinci SLS-a su deskvamacija sluznice usne šupljine, iritacija i upala oralne sluznice, dorzalne površine jezika, ulceracije i toksične reakcije usne šupljine (59).

Zubne paste mogu imati i sredstva protiv plaka i gingivitisa, a najčešći spojevi su triklosan, kositrov klorid/fluorid ili cinkov citrat/klorid. Triklosan se koristi u koncentraciji od 0,3 %, a ima snažnu protuupalnu aktivnost na gingivu (60). Neke zubne paste mogu sadržavati i sredstva za izbjeljivanje, olakšanje dentinske preosjetljivosti, prevenciju erozije zuba, protiv zadaha, protiv plaka i kamenca (55).

**Tablica 1.** Fluoridni spojevi odobreni za upotrebu u kozmetičkim proizvodima u Europskoj uniji. Preuzeto i prilagođeno prema: Lippert F. An introduction to toothpaste - its purpose, history and ingredients. Monogr Oral Sci. 2013;23:1-14.

| Djelatna tvar  | Kemijska formula   |
|--|--|
| Amin fluorid 3-(N-heksadecil-N-2-hidroksietil-amonio) propilbis (2-hidroksi-etil) amonijev dihidrofluorid <sup>1</sup> | C <sub>27</sub> H <sub>59</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> F <sub>2</sub> |
| Aluminijev fluorid <sup>1</sup>  | AlF <sub>3</sub>   |
| Amonijev monofluorofosfat  | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> F                            |
| Amonijev fluorid   | NH <sub>4</sub> F  |
| Amonijev fluorosilikat   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SiF <sub>6</sub>                             |
| Kalcijev fluorid   | CaF <sub>2</sub>   |
| Kalcijev monofluorofosfat  | CaPO <sub>3</sub> F  |
| Kalijev fluorid <sup>1</sup>   | KF   |
| Kalijev fluorosilikat  | K <sub>2</sub> SiF <sub>6</sub>  |
| Kalijev monofluorofosfat   | K <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> F   |
| Kositrov difluorid <sup>1</sup>  | SnF <sub>2</sub>   |
| Heksadecil amonijev fluorid  | C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> NHF  |
| Magnezijev fluorid   | MgF <sub>2</sub>   |
| Magnezijev fluorosilikat   | MgSiF <sub>6</sub>   |
| N,N',N'-tris (polioksietilen)-N-heksadecil-propilendiamin dihidrofluorid   | n/p <sup>2</sup>   |
| Natrijev fluorid <sup>1</sup>  | NaF  |
| Natrijev fluorosilikat   | Na <sub>2</sub> SiF <sub>6</sub>   |
| Natrijev monofluorofosfat <sup>1</sup>   | Na <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> F  |
| Nikometanol hidrofluorid <sup>1</sup>  | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> FNO  |
| Oktadecenil-amonijev fluorid   | n/p <sup>2</sup>   |

<sup>1</sup> Tvari koje se trenutno koriste u pastama za zube koje se prodaju u Europi.  
<sup>2</sup> n/p – nije primjenjivo.

### ***Tekućine za ispiranje usne šupljine***

Tekućine za ispiranje usne šupljine u upotrebi su preko 2000 godina, a komercijalne tekućine za ispiranje u obliku kakvog poznajemo danas su od 1970.-ih godina. Smanjuju količinu bakterija u usnoj šupljini, sprječavaju porast bakterija u zubnom plaku i na taj način preveniraju nastanak gingivitisa i parodontitisa. Vrlo često se koriste zbog socijalnih razloga, kao što je poboljšanje mirisa daha i osvježanje usne šupljine (61).

Na rubovima gingive potrebno je provoditi detaljnu oralnu higijenu jer se u suprotnom stvara zubni plak koji može inicirati nastanak gingivitisa koji kod nekih pojedinaca ili na određenim mjestima u usnoj šupljini može progredirati u periodontitis (62). Terapijsko djelovanje tekućina za ispiranje usne šupljine očituje se ponajviše u djelovanju kao kemijskog inhibitora nastanka zubnog plaka, po čemu se posebno ističe klorheksidin (63).

Studije su pokazale da svakodnevna upotreba tekućine za ispiranje usne šupljine s eteričnim uljem u kombinaciji s četkanjem zubi rezultira smanjenim interdentalnim plakom u usporedbi s pranjem zuba i svakodnevnom čišćenjem zubnim koncem (64). Prema tome, može se zaključiti da tekućina djeluje u prostorima između zubi koji se ne mogu dosegnuti mehaničkim sredstvima kao zubna četkica ili interdentalna četkica. Tekućine za ispiranje s amin fluoridom ili kositrovim fluoridom pomažu smanjiti osjetljivost na bol (56).

Najčešći sastojci tekućina za ispiranje usne šupljine su klorheksidin, amin fluorid, cinkov fluorid i triklosan. Fluorirane tekućine za ispiranje usne šupljine povećavaju fluoridnu rezervu koja se primarno dobiva sa zubnim pastama, a sastoje se najčešće od 0,2 % NaF (natrijev fluorid) i 0,4 % SnF<sub>2</sub> (kositrov difluorid) (61).

## **1.6. Fluoridi u prevenciji zubnog karijesa**

U kontroli nastanka karijesa, najučinkovitiji aktivni sastojak je fluorid, kao najvažnija komponenta proizvoda za oralnu higijenu, koja se koristi za prevenciju zubnog karijesa u različitim oblicima – pasta za zube, tekućine za ispiranje usta, lakovi i gelovi (65).

Jedna od najučinkovitijih metoda prevencije nastanka zubnog karijesa je primjena fluorida, od 1940.-ih godina, kada je započela fluoridacija vode (66). Prva umjetna fluoridacija vode zbog prevencije karijesa učinjena je 1945. i 1946. u Sjedinjenim Američkim Državama i Kanadi. U zadnjih nekoliko desetljeća primijećeno je značajno smanjenje incidencije karijesa za što je u prvom redu zaslužna široko prihvaćena upotreba fluorida topikalno u obliku pasta, tekućina za ispiranje, gelova i ostalih sredstava te sistemska primjena fluorida u nekim zemljama gdje se voda za piće fluoridira ili se fluorid uzima u obliku tableta (67). Sistemska primjena fluorida preko vode za piće, fluoridacije soli ili uzimanja tableta s fluorom uključuje

utjecaj na razvoj zubne cakline prije same erupcije zuba. Fluorid se ugrađuje u caklinske prizme tvoreći fluorapatitni spoj koji je otporniji od hidroksiapatita (68).

Fluoridi su dio prirodnog okoliša i stoga su stalno prisutni u životima ljudi, a konzumiramo ih u malim količinama putem prehrane, disanja i dodataka fluorida (69). S kemijskog gledišta, fluor je najelektronegativniji i najreaktivniji od svih elemenata zbog svog malog atomskog radijusa. Budući da je vrlo reaktivan, obično je vezan kao anorganski fluorid i ne nalazi se u svom elementarnom stanju (57). Nalazi se na 13. mjestu prema zastupljenosti na Zemlji i predstavlja 0,06-0,09 % težine Zemljine kore. Fluor je prisutan u litosferi, atmosferi, hidrosferi i biosferi. Velika količina fluora može se naći u stijenama vulkanskog porijekla. U okoliš ulazi vulkanskim erupcijama, otapanjem stijena i brojnim ljudskim aktivnostima (spaljivanje ugljena, prerada ruda, proizvodnja i uporaba gnojiva, industrijska postrojenja) (70).

U preko 100 zadnjih godina postoji dostupna znanstvena literatura koja opisuje značajnu povezanost dentalne medicine i mnoge moguće primjene fluoridnog aniona kao uspješne terapijske strategije (68). Proizvodi za oralnu higijenu, uključujući zubnu pastu i tekućine za ispiranje usta, klasificirani su kao kozmetički proizvodi koji ne moraju proći tako stroga ispitivanja procjene rizika kao lijekovi (71). Sigurnost fluorida ostaje kontroverzno pitanje, ne samo u pogledu dentalne i skeletne fluoroze kao nuspojava visokih doza fluorida, nego činjenice da su različite studije pokazale značajne genotoksične učinke i *in vivo* i *in vitro* (72).

Glavni način kontrole nastanka karijesa je kroz njegov topikalni učinak. Fluor u niskim koncentracijama u usnoj šupljini tijekom smanjenja vrijednosti pH se apsorbira na površinu kristala apatita, što inhibira demineralizaciju. Kada se pH vrijednost normalizira, tragovi fluorida u otopini potpomažu stvaranje fluorhidroksiapatita, koji ubrzava proces remineralizacije. Minerali koji se formiraju na taj način sadrže više fluorida, manje karbonata te čine caklinu otpornijom na buduća smanjenja pH u usnoj šupljini. Topikalni fluoridi utječu na mikrobiološku aktivnost, tako da smanjuju rast i metabolizam mikroba (73, 74).

Fluorid djeluje kao katalizator za difuziju kalcija i fosfata u zub, koji služe za remineralizaciju kristalnih struktura u caklini. Obnovljene kristalne površine, sastavljene od fluoriranog hidroksiapatita i fluorapatita, mnogo su otpornije na napad kiseline nego što je to izvorna struktura (69).

Četkanje zubi bez primjene fluoridiranih zubnih pasta ima vrlo ograničen učinak na prevenciju karijesa (75). Za potpunu oralnu higijenu, redovno četkanje s fluoridiranim zubnim pastama je esencijalno. Primjena fluoridiranih zubnih pasti pruža prolazno povećanje koncentracije fluorida u usnoj šupljini tj. u slini, ali koncentracija fluorida u biofilmu ostaje povišena duži vremenski period (76).

Protektivni učinak zubne paste s niskim udjelom fluorida (500 ppm F<sup>-</sup>) nije dokazan u preglednim člancima (77). Dokazi upućuju na to da niska razina fluorida (<600 ppm F<sup>-</sup>) zubne paste pruža manju zaštitu od karijesa od standardne (1000 ppm F<sup>-</sup>) ili formulacije visoke koncentracije (1500 ppm F<sup>-</sup>) (78).

Djeca mlađa od četiri godine smatraju se rizičnom skupinom za nastanak dentalne fluoroze trajnih sjekutića i kutnjaka, s obzirom da se u ovom vremenskom periodu događa kalcifikacija i sazrijevanje zubi. Uporaba fluorida se mora pažljivo pratiti i uravnotežiti kako bi se spriječila pojava karijesa u ranom djetinjstvu, a zbog neadekvatne kontrole gutanja, potreban je povećan oprez prilikom četkanja zubi (79). Dopuštene količine fluorida u zubnim pastama ovise o dobnoj skupini te su prikazane u Tablici 2 (79).

Kod karijesa korijena zuba, s obzirom da je dentin više topljiv nego caklina, fluoridirane zubne paste nisu toliko učinkovite za prevenciju kao kod karijesa cakline. U tom slučaju se koriste zubne paste s vrlo visokom koncentracijom fluorida (5000 ppm F<sup>-</sup>) jer su prema kliničkim studijama učinkovitije od konvencionalnih (1000-1500 ppm F<sup>-</sup>) (80).

U slučaju kada se fluoridirane zubne paste koriste s drugim modalitetima aplikacije fluorida s ciljem prevencije karijesa kod visoko rizičnih pacijenata kao što je npr. sindrom suhih usta, dodatni učinak koji se očekuje ovakvom primjenom je ograničen. To se može objasniti sličnim načinom djelovanja fluorida kao što su smanjenje demineralizacije i povećanje remineralizacije neovisno o izvoru fluorida, pa tako povećana količina fluorida iz različitih izvora ne uzrokuje očekivan učinak (81).



**Tablica 2.** Preporučene količine fluoridirane zubne paste i učestalost četkanja zubi kod djece i odraslih. Preuzeto i prilagođeno prema: Toumba KJ, Twetman S, Splieth C, Parnell C, van Loveren C, Lygidakis N. Guidelines on the use of fluoride for caries prevention in children: an updated EAPD policy document. Eur Arch Paediatr Dent. 2019;20(6):507-16.

| Dob                 | ppm F <sup>-</sup> | Učestalost korištenja | Količina (g) | Veličina                        |
|---------------------|--------------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|
| Prvi zub – 2 godine | 1000               | 2x dnevno             | 0,125        | Zrno riže (~ 5 mm)              |
| 2 - 6 godina        | 1000*              | 2x dnevno             | 0,25         | Grašak (~ 8 mm)                 |
| Preko 6 godina      | 1450               | 2x dnevno             | 0,5-1,0      | Puna duljina četkice (~ 1 cm)   |
| Odrasli             | 1450               | 2x dnevno             | 1,0          | Puna duljina četkice (1 - 2 cm) |

\*Više od 1000 ppm-a fluorida se može koristiti ukoliko postoji visok rizik za nastanak karijesa.

### 1.7. Toksičnost fluorida

Fluoridi se široko primjenjuju u dentalnoj medicini za prevenciju nastanka zubnog karijesa, iako je sigurnost upotrebe fluorida kontroverza. Mnogo epidemioloških, patogenetskih, kliničkih i citogenetskih studija je povezano s toksičnosti fluorida (82).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji dopuštena granica fluorida u vodi za piće je 1,5 ppm (mg/L) (83). Kada je razina fluorida u vodi za piće unutar dopuštenih granica, blagotvorno djeluje na zube sprječavajući karijes, ali kronična izloženost fluoridu iznad dopuštene granice uzrokuje blagi do teški oblik dentalne i skeletne fluoroze, koji se očituje mrljama na zubima i skeletnim deformacijama, osteoporozom i osteosklerozom (84). Osim ovih negativnih pojava, prekomjerna koncentracija fluorida ima štetni učinak na jetru, bubrege, slezenu, gastrointestinalni trakt, reproduktivne organe, endokrinološke organe itd. (85). U kiselom okolišu želuca, ingestirani fluoridi formiraju kompleks s vodikom te se u želucu i

tankom crijevu apsorbiraju jednostavnom difuzijom (86). Fluoridi koji se apsorbira u krv, distribuiraju se po tijelu, a najveći dio apsorbiranog fluorida se taloži u dijelovima koji su bogati kalcijem, kao što su kosti i zubi (dentin i caklina), a ostatak se eliminira urinom. Nažalost, do danas ne postoji učinkovit način za liječenje fluoroze (87).

U kostima i zubima, fluoridi zamijene hidroksilne skupine iz hidroksiapatita te na taj način nastaje fluoroapatit ili fluorohidroksiapatit. Većina fluorida u tijelu, čak 99 % se nalazi u zubima i kostima, a količina se povećava tijekom života (88).

Akutna toksičnost nastaje nakon jednokratnog unosa velike količine fluorida. Količina oralno uzeta koja je smrtonosna jest 35 - 70 mg fluorida po kilogramu tjelesne mase, a minimalna doza koja bi mogla izazvati simptome akutne toksičnosti je 5 mg/kg tjelesne mase (68). Odrasla osoba prosječne tjelesne težine od 70 kg bi trebala uzeti 5 - 10 g NaF, a dijete teško 15 kg bi trebalo uzeti 1 - 2 g NaF. Simptomi akutnog otrovanja fluoridom su mučnina, povraćanje, abdominalna bol, a može se pojaviti i prekomjerna salivacija ili suzenje, mukozni iscjedak iz grla i usta, generalizirana slabost, paraliza mišića za gutanje, karpopedalni spazam, tetanija i generalizirane konvulzije. Kako bi se smanjila apsorpcija fluorida, potiče se povraćanje i unošenje velike količine kalcija u obliku otopine  $\text{Ca(OH)}_2$  ili mlijeka. Korisno može biti i poticanje diureze u svrhu eliminacije fluorida (85).

Kronična izloženost fluoridu iznad dopuštene granice pogoršava razinu inteligencije djece. U endemskim područjima fluorida, gdje pitka voda sadrži povećanu koncentraciju fluorida, djeca izložena takvoj vodi ( $2,47 \pm 0,79$  ppm) pokazali su značajno smanjenu razinu kvocijenta inteligencije u usporedbi s djecom čija je razina fluorida u vodi za piće unutar dopuštene granice ( $0,36 \pm 0,15$  ppm) (89). Fluoroza kod djece nastaje kao posljedica povišene količine fluorida tijekom stvaranja cakline prije izbijanja zuba. Povišene koncentracije fluorida mogu dovesti do oštećenja cakline u rasponu od bijelih točkica ili pruga pa sve do grubih i rupičastih površina (90).

Fluoridi su dokazano citotoksični i izazivaju upalni odgovor kod ljudi. Korištenje zubnih pasta s fluoridom povećava koncentraciju fluorida u slini i zubnom plaku, ali također prodire u epitel stanice (21). Iznad dopuštene granice, fluoridi stvaraju reaktivne kisikove spojeve (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) oštećenjem funkcije mitohondrija (84). Fluoridi na molekularnoj osnovi također zaustavljaju sintezu proteina i stanični ciklus (91), izazivaju

apoptozu kod epitelnih stanica pluća i alveolarnih makrofaga, ali citotoksični mehanizam fluorida u samom parodontalnom tkivu još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (92).

Rezervoari fluorida u usnoj šupljini mogu se sastojati od oralne sluznice, zubnog kamenaca, zubnog biofilma i karijesnih lezija (93). Većina studija o toksičnosti fluorida pokazuje potentnu genotoksičnu prirodu fluorida, razjašnjeni su i neki molekularni načini kako do toga dolazi, međutim većina molekularnih puteva ostaje enigma. Prema sustavnom preglednom članku Dey Bhownika i Chattopadhyaya koji je obuhvatio većinu članaka o *in vitro* i *in vivo* toksičnosti fluorida na sisavcima iz 2018. godine, najizgledniji način djelovanja fluorida je stvaranje slobodnih radikala ili raskidanje aminske grupe povezane s deoksiribonukleinskom kiselinom (DNK), a uključenost samog endogenog glutationa u genotoksičnost fluorida podupire tezu o uništavanju DNK slobodnim radikalima (94).

Do danas su brojne *in vitro* studije analizirale učinke fluorida na različite stanice sisavaca kao što su oralne stanice (odontoblasti, ameloblasti i gingivalni fibroblasti), koštane stanice (osteoblasti), krvne stanice (mijelomske periferne krvne stanice i stanice leukemije), moždane, reproduktivne i jetrene stanice (95), uz *in vivo* studije o oralnom sustavu (96), kostima, krvi, jetri, slezeni, reproduktivnom sustavu, središnjem živčanom sustavu i stanicama bubrega (94).

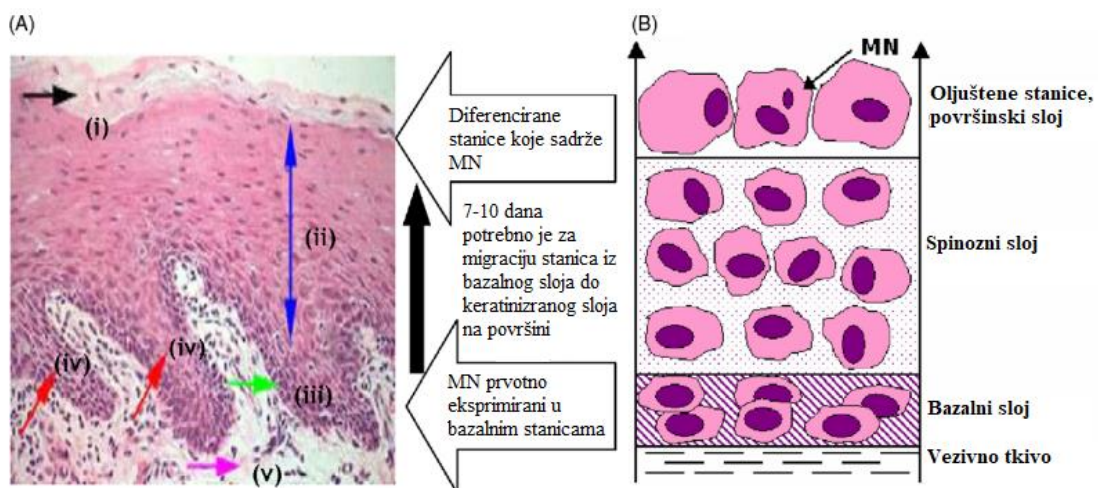
Rose i sur. sugerirali su da je fluorid u oralnoj sluznici vezan za površinu epitelnih stanica (97). S obzirom na jake dokaze za odnos između genetskog oštećenja i karcinogeneze, te razjašnjavanje mehanizama genotoksičnosti izazvane fluoridom, važno je izmjeriti stupanj rizika kako bi se ublažili potencijalni rizici za ljudsku populaciju (98).

## **1.8. Bukalni mikronukleusni citom test**

Tijekom posljednjeg desetljeća pojavio se bukalni mikronukleusni citom test (engl. *Buccal Micronucleus Cytome assay*, BMCyt) kao minimalno invazivna metoda za istraživanje oštećenja DNK, kromosomske nestabilnosti, stanične smrti i regenerativnog potencijala ljudske bukalne sluznice. Korištenje ove metode se povećava kod molekularnih epidemioloških studija za istraživanje utjecaja prehrane, čimbenika životnog stila, izloženosti genotoksinima i genotipa na oštećenje DNK, kromosomsku nestabilnost i staničnu smrt. Analiza mikronukleusa iz

bukalnih stanica predstavlja biomarker povezan s ubrzanim starenjem, karcinomima i neurodegenerativnim bolestima. Glavne prednosti testa su njegova jednostavnost i lako dostupno tkivo za bezbolnu i neinvazivnu analizu (99).

Mikronukleus (engl. *Micronucleus*, MN) potječe od kromosomskih fragmenata ili cijelih kromosoma koji zaostaju tijekom anafaze staničnog ciklusa odnosno podjele same jezgre. Ovakvo oštećenje može nastati zbog izloženosti genotoksičnim tvarima, defekta u procesu mitoze ili neuspjeha popravka DNK (100). Mikronukleusi se mogu evaluirati u eritrocitima, limfocitima ili oljuštenim epitelnim stanicama (usne šupljine, urotela ili nosnog epitela) kako bi se procijenila šteta učinjena na staničnom genomu *in vivo* (101). Upotreba MN kao biomarkera u zadnje vrijeme sve više uzima maha zbog povezujućih dokaza između učestalosti MN kao markera oštećenja genoma i povezanosti s karcinogenima, životnim stilom (pušenjem), genetskim profilom, karcinomima i drugim bolestima (Slika 2) (102).



**Slika 2.** U dijelu (A) prikazan je histološki presjek zdrave oralne sluznice sa različitim slojevima stratificiranog pločastog epitela koji se sastoji od (i) keratiniziranog sloja; (ii) spinozni sloj; (iii) bazalni sloj; (iv) rete pegs; (v) lamina propria ili vezivno tkivo. U dijelu (B) slike prikazan je shematski prikaz oralne sluznice sa slojevima i „turn-over“ u trajanju od 7 -10 dana. Preuzeto i prilagođeno iz Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, i sur., The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, *Mutat Res*, 2008;659(1-2):93-108.

Godine 1997. započet je internacionalni projekt „Ljudski mikronukleus projekt“ (engl. *The Human Micronucleus Project*, HUMN) kako bi se standardizirao protokol izrade mikronukleus testa u svrhu unaprjeđenja korištenja ovog biomarkera kao prediktivnog čimbenika za nastanak karcinoma (103). U početku se koristio za limfocite, međutim, u kasnijim istraživanjima se pokazao koristan i kao biomarker u bukalnim i drugim epitelnim stanicama. Osnovna vrijednost MN stanica u normalnim stanicama koje nisu izložene posebnim toksičnim agensima iznosi između 0,5 i 2,5 MN na 1000 stanica.

U svom članku, Moore i sur. prikazuju 16-struko povećanje u učestalosti MN kod pacijenata sa karcinomom usne šupljine nakon terapije fotonima. Biološko značenje drugih staničnih i jezgrinih anomalija, osim MN, u stanicama oralne sluznice još nije do kraja definirano, ali postoje različita tumačenja iz znanstvenih studija te povezanosti sa starenjem ili neurodegenerativnim procesima (104).

Bazalne stanice se nalaze u *stratum basale* i sadrže matične stanice koje mogu očitovati genetičko oštećenje u obliku MN ili jezgrinog pupoljka (engl. *Nuclear Bud*, NBUD) (105).

Diferencirane stanice uključuju stanice u tranziciji koje prelaze u terminalno diferencirane kao i terminalno diferencirane stanice. Veće su od bazalnih stanica, mogu sadržavati MN ili NBUD (106).

Stanice s kondenziranim kromatinom (engl. *Condensed Chromatin*, CC) se prepoznaju po prugastom uzorku jezgre koji se intenzivno boja. Ovakva vrsta stanica se povezuje s apoptozom (107).

Stanicu s piknotičnom jezgrom (engl. *Pycnosis*, PN) se može prepoznati po smanjenoj, intenzivno obojanoj jezgri, veličine najčešće do dvije trećine normalne jezgre. Promjena predstavlja ireverzibilnu kondenzaciju kromatina u stanici koja je apoptotična, a smatra se da prethodi karioreksiji (108).

Stanice s karioreksijom (engl. *Karyorrhexis*, KHC) karakterizira intenzivnije nakupljanje jezgrinog kromatina u usporedbi s CC stanicama. Jezgra takvih stanica ima „pjegav“ uzorak što je znak jezgrine dezintegracije tipične za posljednje faze apoptoze (109).

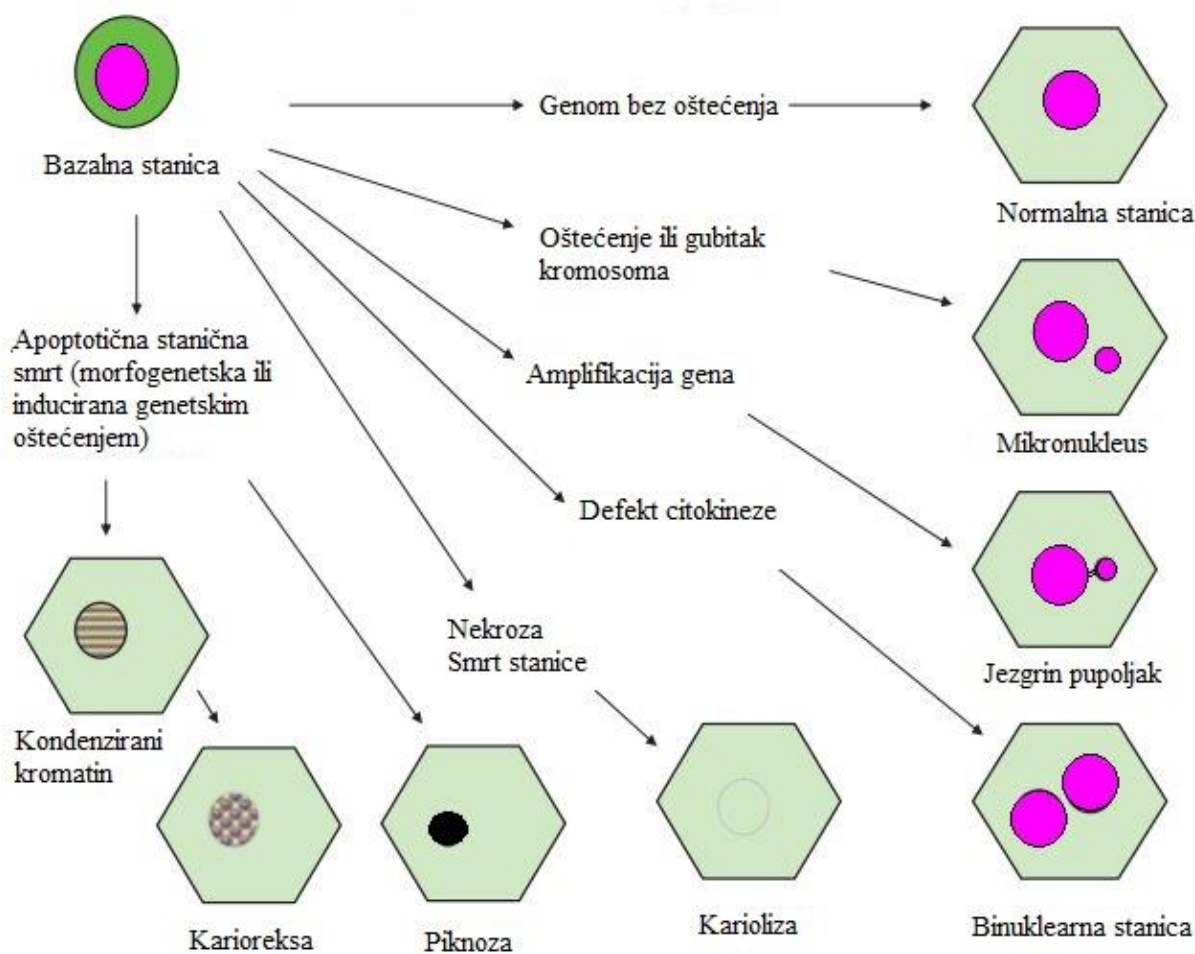
Karioliza (engl. *Karyolysis*, KYL) označava terminalno diferencirane stanice koje nemaju jezgru, dakle potpuno su bez sadržaja DNK i zbog tog razloga se ne boje Feulgen bojom

(boja specifična za DNK). Označava kompletnu dezintegraciju DNK i nastaje u kasnoj fazi nekroze ili apoptoze (110).

Binuklearne stanice (engl. *Binuclear Cell*, BN) imaju dvije jezgre jednake veličine, morfologije, teksture i intenziteta bojanja, koje se najčešće nalaze jedna blizu druge. Mehanizmi za koji se pretpostavlja da dovode do nastanka ovakvih stanica su defekti u procesu citokineze, najčešće zbog pogrešne formacije mikrofilamentnog prstena ili zaustavljanja u staničnom ciklusu zbog pogrešnog odvajanja ili disfunkcije telomera (111). Pojedinci koji imaju Downov sindrom pokazuju dva puta veću učestalost binuklearnih stanica među bukalnim stanicama u usporedbi s normalnim kontrolama (112).

Stanice s mikronukleusom se prezentiraju kao stanice koje uz glavnu jezgru imaju jedan ili više manjih tjelešaca okruglog ili ovalnog oblika, po teksturi i bojanju jednako kao glavna jezgra. Promjer mikronukleus tjelešaca je između jedne trećine i jedne šestine promjera glavne jezgre. Mogu se pronaći u bazalnim, prijelazno diferenciranim ili diferenciranim stanicama (113).

Stanice s jezgrenim pupoljkom (pupom) sadrže jezgrina tjelešca koja su povezana s glavnom jezgrom s nukleocitoplazmatskim mostom. Ova tjelešca također imaju istu boju i teksturu kao glavna jezgra. Struktura jezgrinog pupoljka označava proces pupanja suvišnog jezgrinog materijala kao što su neriješeni kompleksi za popravak DNK ili amplificirana DNK koja se odvojila u periferiji jezgre. Postoje i veća nuklearna tjelešca tj. pupovi koji se nazivaju „slomljenim jajetom“ (engl. *Broken Egg*) zbog svog nejasnog podrijetla ili mehanizma nastanka se svrstavaju u kategoriju jezgrinih pupoljaka (114). Shematski prikaz različitih tipova stanica koji se proučavaju bukalnim mikronukleus testom nalazi se na Slici 3.



**Slika 3.** Prikaz različitih tipova stanica koje se promatraju prilikom BMCyt testa. Analiza različitih tipova stanica se radi na temelju sheme koju su predložili Tolbert i sur. (115) uz dodatak nedavnih opažanja u drugim sličnim studijama. Preuzeto i prilagođeno prema: Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, i sur. Buccal micronucleus cytome assay. Nat Protoc. 2009;4(6):825-37.

Dosadašnjim pregledom literature nije pronađena nijedna *in vivo* studija provedena na ljudima gdje se procjenjivala genotoksičnosti zajedničke uporabe fluoridiranih zubnih pasta i tekućina za ispiranje usne šupljine na stanice bukalne sluznice (116). Povećanjem svakodnevne cjeloživotne uporabe proizvoda za oralnu higijenu (117), postavlja se pitanje o potencijalno štetnom učinku upotrebe više od jednog proizvoda s fluoridima. Budući da nema ograničenja u

korištenju proizvoda za oralnu higijenu, a dobro je poznato da tkivo oralne sluznice služi kao dugoročni rezervoar fluorida, moguće štetne učinke treba provjeriti odgovarajućom *in vivo* studijom (76).



## **2. CILJEVI RADA I HIPOTEZE**

U skladu s problematikom istraživanja, glavni cilj ove disertacije je:

1. Procijeniti potencijalni citotoksični i genotoksični učinak kombiniranog korištenja fluoridiranih zubnih pasta i tekućine za ispiranje usne šupljine s fluoridom mjerenjem pojavnosti mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija u stanicama bukalne sluznice mikronukleus testom.

Sporedni ciljevi su:

1. Procijeniti potencijalni citotoksični i genotoksični učinak zubnih pasta s različitim koncentracijama fluorida na pojavnost mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija u stanicama bukalne sluznice mikronukleus testom;
2. Ispitati znanja, stavove i ponašanja ispitanika prema oralnom zdravlju.

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. Više citogenetskih oštećenja pronaći će se u uzorcima bukalnih stanica među ispitanicima koji su uz fluoridirane zubne paste koristili i tekućinu za ispiranje usne šupljine s fluoridom u usporedbi s onima koji su koristili tekućinu za ispiranje usne šupljine bez fluorida;
2. Više citogenetskih oštećenja pronaći će se u uzorcima bukalnih stanica u ispitivanim vremenskim točkama kada su se koristile zubne paste s većom koncentracijom fluorida;
3. Utvrdit će se razlika u znanju, stavovima i ponašanju ispitanika vezano uz oralno zdravlje u ovisnosti o KEP indeksu.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

U oba dijela istraživanja koristili su se primarni izvori koji su dobiveni prikupljanjem vlastitih podataka. Istraživanje je provedeno na Katedri za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju studija Dentalne medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, od ožujka do listopada 2021. godine.

Protokol studije pregledao je i odobrio Etički odbor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu po principima Helsinške deklaracije Svjetskoga medicinskog udruženja i etičkim vrijednostima (Klasa: 003-08/20-03/0005, Ur. br.: 2181-198-03-04-20-0103) uz dodatak odobrenja za dopunu postojećeg odobrenja protokola studije (Klasa: 003-08/22-03/0003, Ur. br. : 2181-198-03-04-22-0083). Nadalje, istraživanje je provedeno prema Konsolidiranim standardima izvješćivanja o ispitivanjima (CONSORT) smjernice (72) i registrirani u kliničkim ispitivanjima (ClinicalTrials.gov, ID broj studije: NCT04801576).

Sudjelovanje je bilo dobrovoljno, uz potpisani pristanak koji je dobiven od svih sudionika nakon objašnjenja svrhe istraživanja. Svi podaci su anonimni i tretirani kao povjerljivi prema važećem hrvatskom Zakonu o postupanju s osjetljivim podacima.

### **3.1. Dizajn istraživanja**

Disertacija se sastoji od dvostruko slijepog, randomiziranog kontroliranog istraživanja (engl. *Randomized Controlled Trial*, RCT) s dvije paralelne skupine kojom se analizirala citotoksičnost i genotoksičnost fluorida iz zubnih pasta i tekućina za ispiranje usne šupljine na bukalne stranice i presječnog istraživanja o znanju, stavovima i ponašanju prema oralnom zdravlju.

Cilj je bio procijeniti učestalost biomarkera koji ukazuju na oštećenje DNK (mikronukleusi i nuklearni pupoljci), potencijal stanične proliferacije (stanice s binuklearima) i staničnu smrt (kondenzirani kromatin, karioreksa, piknoza i karioliza), a u presječnoj studiji prikazati znanja, stavove i ponašanje ispitanika prema oralnom zdravlju.

### 3.2. Ispitanici

U ovom istraživanju sudjelovao je ukupno 41 ispitanik koji su bili pacijenti na Katedri za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju studija Dentalne medicine, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (Slika 4).

Za izračunavanje minimalne potrebne veličine uzorka korišten je učinak veličine uzorka (Cohenov  $d$ ) dobiven *in vivo* procjenom primjene fluorida i natrijevog lauril sulfata iz zubnih pasti na toksičnost u bukalnim epitelnim stanicama (71). Iz razlike u broju pojavljivanja mikronukleusa u stanicama oralne sluznice nakon uporabe paste bez fluorida ( $0,55 \pm 0,51$ ) i upotrebe paste s fluorom ( $1,15 \pm 0,88$ ) dobiveni učinak veličine uzorka (Cohenov  $d$ ) bio je 0,835. Dakle, uz razinu značajnosti  $\alpha = 0,05$ , snagu testa od 80 % i navedeni utjecaj veličine uzorka, potrebna veličina uzorka je 19 ispitanika po ispitnoj skupini. Zbog potencijalnog odustajanja ili gubitka ispitanika, uzorak se povećao za 10 % ( $n = 21$ ).

Kriteriji uključenja bili su:

1. Zdravi ispitanici bez sistemskih oboljenja;
2. Minimalno 20 zuba u obje čeljusti;
3. Dob iznad 18 godina;
4. Oba spola.

Kriteriji isključenja bili su:

1. Korištenje antibiotika, kortikosteroida i/ili protuupalnih lijekova u posljednjih šest mjeseci prije početka istraživanja;
2. Oštećenja i bolesti sluznice usne šupljine;
3. Bolesti parodonta;
4. Fiksni ili mobilni protetski nadomjesci ili ortodontski aparatić;
5. Trudnoća;
6. Zračenje u području glave i vrata;

## 7. Alergija na pojedine sastojke oralno-higijenskih preparata.

Ulazni podaci ispitanika na početku istraživanja bili su stomatološka i medicinska anamneza prema upitniku o zdravlju Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), zatim KEP indeks (broj karijesnih, ekstrahiranih i plombiranih zuba), informirani pristanak, upitnik s demografskim čimbenicima (dob, spol), životnim navikama (pušenje, konzumacija alkohol itd.), osobnim čimbenicima (zdravstveno stanje, uporaba lijekova, izloženost zračenju) i prehrambenim navikama te upitnik o znanjima, stavovima i ponašanju prema oralnom zdravlju. Prije početka istraživanja u svih ispitanika su uklonjene meke i tvrde zubne naslage te je napravljena dentalna profilaksa.

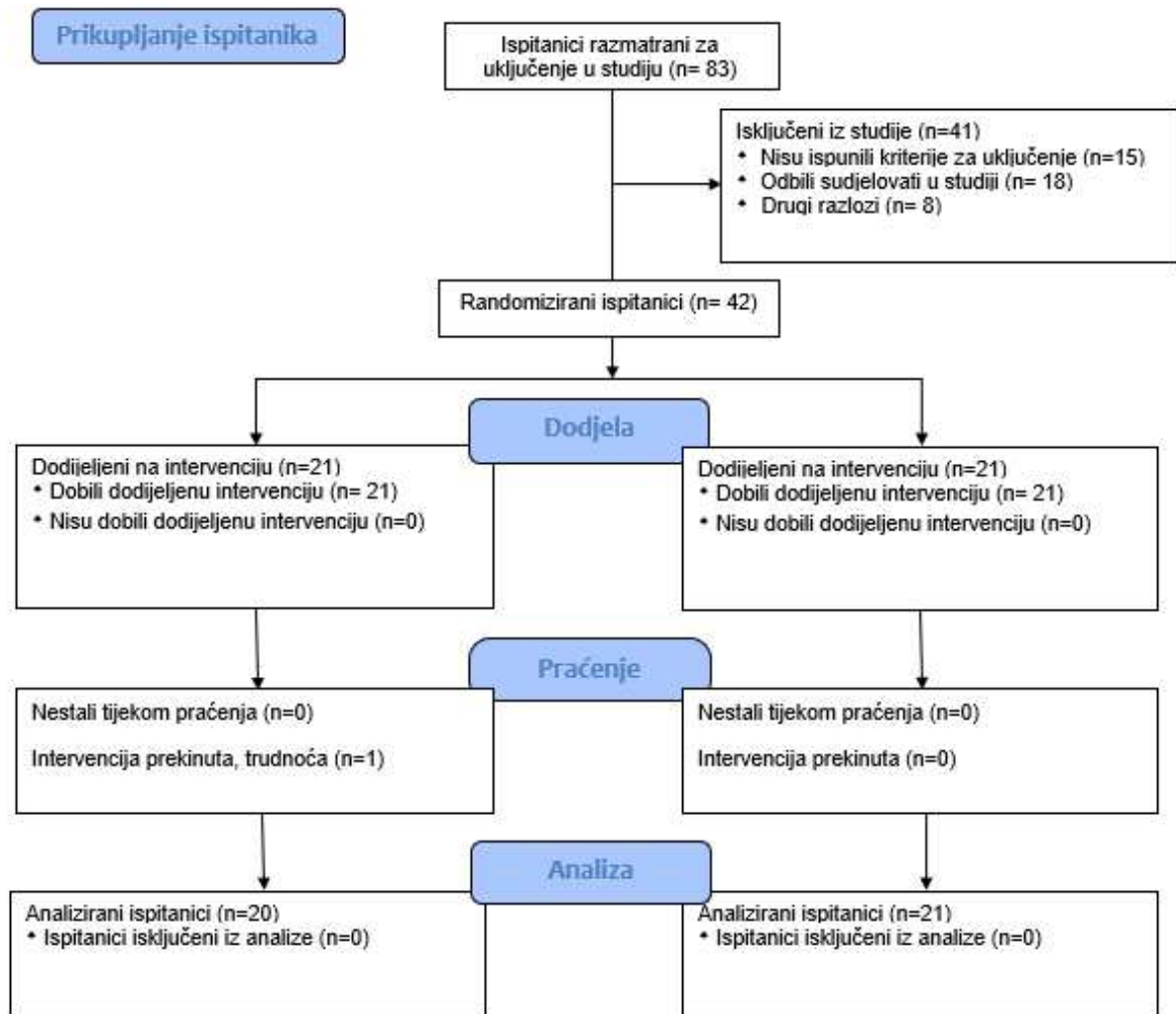
Dva tjedna prije intervencije, u pripremnom periodu (engl. “*Wash-out Period*”) svi ispitanici dobili su na korištenje zubnu pastu bez fluorida (Biomed Calcimax, Splat, Moskva, Rusija) i mekanu zubnu četkicu (Colgate Slim Soft, Colgate - Palmolive Company, New York, SAD), te oralne upute o održavanju oralne higijene kako bi svi imali na početku intervencije istu početnu poziciju. Za vrijeme trajanja studije, ispitanicima nije bilo dopušteno koristiti druge proizvode za održavanje oralne higijene osim ispitivanih s posebnim naglaskom da se izbjegnu dodatne količine fluorida.

Ispitanici su bili nasumično podijeljeni u dvije skupine sljedeći postupak randomizacije blokova pomoću računalnog softvera (118). Ovom se metodom se osigurala ravnoteža u veličini uzorka među skupinama. Popis kodova sudionika unio se u softver i distribuirao u dvije unaprijed određene skupine s obzirom na korištenje vodice za ispiranje s fluoridom i bez fluorida ( $n = 21$ ) (Slika 2). Budući da je glavni provoditelj istraživanja (onaj koji je uzimao briseve) bio zaslijepljen, imenovao se koordinator ispitivanja odgovoran za randomizaciju i dodjelu intervencije.

Obje skupine koristile su zubne paste slijedom: (1) zubna pasta bez fluorida, (2) zubna pasta s 1050 ppm NaF i (3) zubna pasta s 1450 ppm NaF. Svaka ispitivana zubna pasta koristila se 28 dana ili 4 tjedna s obzirom da je u literaturi važeći podatak o izmjeni stanica oralne sluznice u trajanju od sedam dana (13).

Sastav ispitivanih zubnih pasta bio je isti, osim u koncentraciji fluorida (NaF). Ispitanici su istovremeno tijekom tri mjeseca trajanja istraživanja koristili i tekućinu za ispiranje usne

šupljine, prilikom čega je skupina A koristila tekućinu za ispiranje usne šupljine bez dodatka fluorida (0 ppm NaF), a skupina B tekućinu s fluoridom (450 ppm NaF).



**Slika 4.** Dijagram tijeka regrutiranja ispitanika i praćenja.

Zubne paste i tekućine za ispiranje usne šupljine posebno su osmišljene za ovo istraživanje u suradnji s Galenskim laboratorijem Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, Split, Hrvatska (Tablica 3). Ispitivane zubne paste koristile su se 2 puta dnevno po 1 g ( $\approx 2$  cm) ujutro i uvečer, kroz 3 minute koristeći modificiranu Bassovu metodu četkanja, a nakon četkanja se koristila tekućina za ispiranje usne šupljine u količini od 10 mL i trajanju od 30 sekundi.

**Tablica 3.** Sastav zubnih pasti i vodica za ispiranje usne šupljine napravljenih za potrebe ovog istraživanja.

| <b>Proizvod</b>  | <b>Proizvođač</b>  | <b>Sastojci</b>   |
|--|--|---|
| <b>Biomed<br/>Calcimax</b>   | Splat,<br>Moskva,<br>Rusija                                    | Voda; hidrogenirani škrobni hidrolizat; dikalcij fosfat dihidrat; hidratizirani silicij; glicerol; natrijev kokosulfat; celulozna guma; natrijev klorid; aroma; cink citrat; natrijev bikarbonat; benzil alkohol; tetranatrijev glutamat diacetat; ekstrakt <i>Laminaria digitata</i> ; ekstrakt <i>Fucus vesiculosus</i> ; Spirulina maxima ekstrakt u prahu; kaolin; ksantan guma; mentol; hidroksiapatit; arginin; mentil laktat; ekstrakt lista <i>Betula verrucosa</i> ; ekstrakt trputca major; ekstrakt <i>Thymus serpyllum</i> ; ekstrakt <i>Stevia rebaudiana</i> ; natrijev benzoat; kalijev sorbat; geraniol; linalool; D-limonen. |
| <b>Zubna pasta<br/>1 – 0 ppm<br/>NaF</b>                                 | Galenski<br>laboratorij<br>Ljekarne<br>SDŽ, Split,<br>Hrvatska | Voda; hipermeloza; kalcijev karbonat; kokamidopropil betain; glicerol; natrijev saharin; eterično ulje paprene metvice.   |
| <b>Zubna pasta<br/>2 – 1050 ppm<br/>NaF</b>                              | Galenski<br>laboratorij<br>Ljekarne<br>SDŽ, Split,<br>Hrvatska | Voda; hipermeloza; kalcijev karbonat; kokamidopropil betain; glicerol; natrijev saharin; eterično ulje paprene metvice; natrijev fluorid (1050 ppm).  |
| <b>Zubna pasta<br/>3 – 1450 ppm<br/>NaF</b>                              | Galenski<br>laboratorij<br>Ljekarne<br>SDŽ, Split,<br>Hrvatska | Voda; hipermeloza; kalcijev karbonat; kokamidopropil betain; glicerol; natrijev saharin; eterično ulje paprene metvice; natrijev fluorid (1450 ppm).  |
| <b>Tekućina za<br/>ispiranje<br/>usne šupljine<br/>A –<br/>0 ppm NaF</b> | Galenski<br>laboratorij<br>Ljekarne<br>SDŽ, Split,<br>Hrvatska | Voda; sorbitol; glicerol; Cremophor RH 40; natrijev citrat; eterično ulje paprene metvice; Cl 42090.  |
| <b>Tekućina za<br/>ispiranje<br/>usne šupljine<br/>B –</b>               | Galenski<br>laboratorij<br>Ljekarne<br>SDŽ, Split,<br>Hrvatska | Voda; sorbitol; glicerol; Cremophor RH 40; natrijev citrat; eterično ulje paprene metvice; Cl 42090; natrijev fluorid (450 ppm).  |



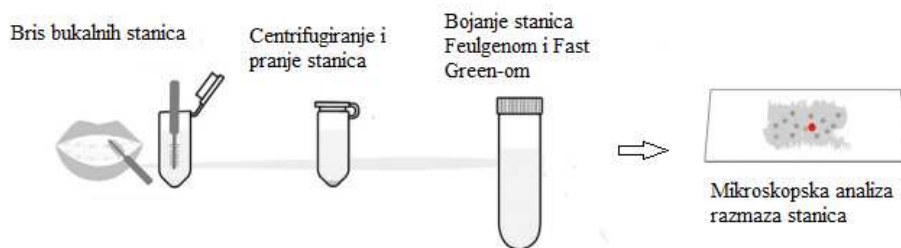
Promatrajući razlike kroz tri različite intervencije podizanja razine fluorida u zubnim pastama unutar ispitivane skupine A koja koristi tekućinu bez fluorida, promatrali smo rezultat utjecaja zubnih pasta s različitom koncentracijom fluorida na bukalnu sluznicu. Uspoređujući skupinu A (koja je koristila samo fluoridirane zubne paste i tekućinu za ispiranje bez fluorida) i skupinu B (koja je koristila fluoridirane zubne paste i fluoridiranu tekućinu za ispiranje usne šupljine) promatrali smo kumulativni učinak istovremenog korištenja fluoridirane tekućine za ispiranje usne šupljine i zubne paste na bukalnu sluznicu.

### **3.3. Postupci**

#### 3.3.1. Toksikologija oralno - higijenskih pripravaka

Uzorkovanje stanica bukalne sluznice u obje skupine obavljeno je na početku (T0) i nakon 4 (T1), 8 (T2) i 12 tjedana (T3) upotrebe testiranih zubnih pasta i tekućina za ispiranje usne šupljine. U svim vremenskim točkama uzorkovanja, uzorci su prikupljeni kroz jutro. Sat vremena prije uzorkovanja, ispitanici su bili zamoljeni da se suzdrže od konzumiranja bilo kakve hrane i pića. Usna šupljina bi se temeljito isprala vodovodnom vodom neposredno prije uzimanja uzorka kako bi uklonili oralnu mikrofloru i oljuštene stanice. Brisevi su uzeti nježnim kružnim pokretima četkanjem bukalne sluznice obostrano citokoškom četkicom (Cytobrush Plus, GmbH, Dietramszell-Linden, Njemačka).

Četkice su zatim umočene u epruvete koje su sadržavale pufer za bukalne stanice (1,6 g/L Tris-HCl, 38,0 g/L EDTA i 1,2 g/L natrijevog klorida, pH 7,0) i opetovano rotirane kako bi se stanice izbacile i otpustile u pufer. Na kraju su svi uzorci kodirani i transportirani u molekularni laboratorij na daljnju obradu i analizu (Laboratorij za molekularnu genetiku, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Splitu, Split) (Slika 5).



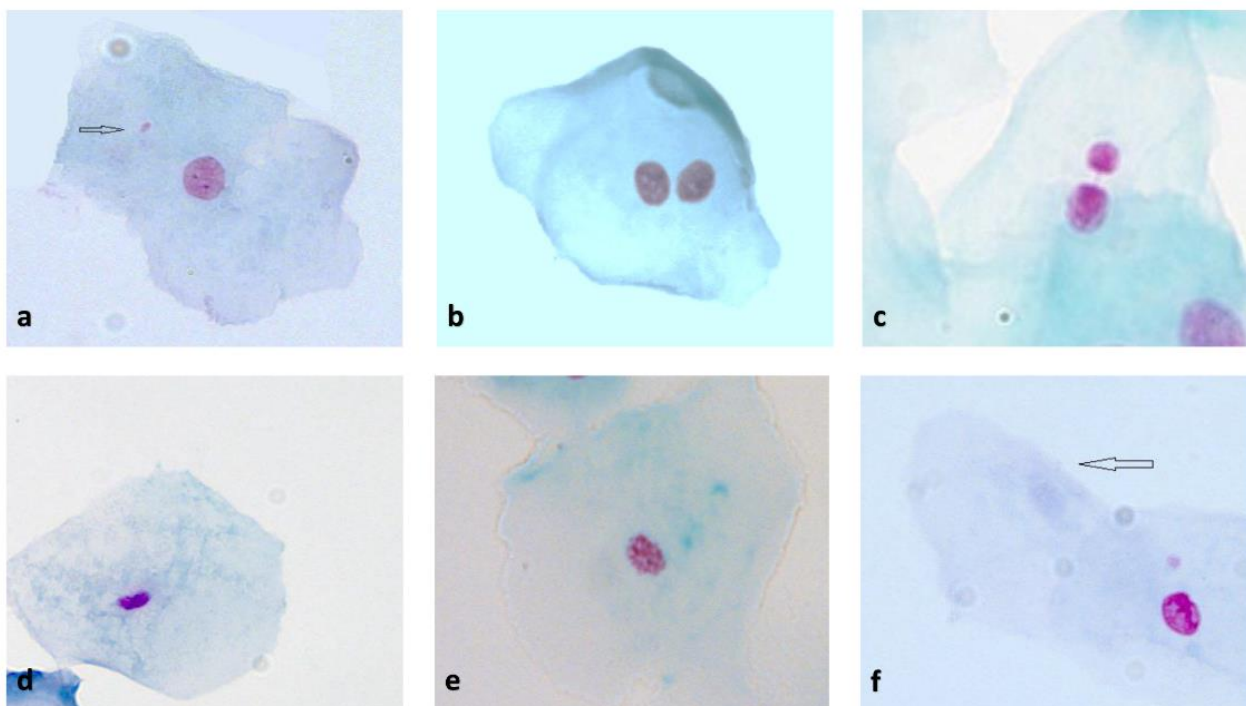
**Slika 5.** Shematski prikaz eksperimentalnog protokola istraživanja bukalnim mikronukleusnim citom testom. Preuzeto i prilagođeno prema: Apiwantanakul N, Chantarawatit PO. Cytotoxicity, genotoxicity, and cellular metal accumulation caused by professionally applied fluoride products in patients with fixed orthodontic appliances: A randomized clinical trial. J World Fed Orthod. 2021;10(3):98-104.

Bukalni mikronukleusni citom test proveden je prema postupku koji su opisali Thomas i Fenech (105). Za svakog ispitanika pripremljena su dva stakalca razmazivanjem 100  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije na prethodno očišćena stakalca (približno  $1 \times 10^5$  stanica/stakalcu). Stanice su zatim obojene primjenom metode Feulgen i Fast Green. Ukratko, stakalca su fiksirana u etanolu, po 1 minutu u 50 % i u 20 % etanolu, isprana destiliranom vodom i obrađena u 5 M HCl u trajanju od 30 minuta. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi, stakalca su ocijeđena i zatim obojena Schiffovim reagensom u trajanju od 60 minuta. Stakalca su dalje isprana destiliranom vodom i zatim obojena 20 sekundi 0,2 % Fast Greenom. Na zraku osušena stakalca na kraju su montirana DePex medijem za montiranje.

Korišteni su Schiffov reagens i Fast-Green, konvencionalna mikroskopska stakalca i pokrovna stakalca (Biognost, Hrvatska), a svi ostali korišteni reagensi (etanol, octena kiselina, fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS) bili su analitičke čistoće.

Kodirana stakalca čitana su naslijepo prema shemi bodovanja koju su predložili Thomas i Fenech u „Nature“ protokolu (105). Stakalca su analizirana pri povećanju od 1000x pomoću

svijetlog polja (Zeiss Axioimager M1, Carl Zeiss, Beč, Austrija) opremljenog mikroskopskom CCD kamerom visoke rezolucije (Carl Zeiss AxioCam MR Rev3, Beč, Austrija) i korištenjem Axio Vision Rel. 4.7 softvera (Carl Zeiss, Beč, Austrija). Stakalca su mikroskopirana kako bi se odredila učestalost anomalija povezanih sa staničnom smrću, a nuklearne abnormalnosti koje ukazuju na kromosomsku nestabilnost ili oštećenje DNK klasificirane su prema utvrđenim HUMNxl kriterijima (engl. *Human micronucleus exfoliated cell*, HUMNxl) (106) u najmanje 1000 stanica. Stanice s dvije jezgre (binuklearne stanice, BN) ukazuju na defekt citokineze (citotoksičnost); stanice kondenziranog kromatina (CC), kariorektilne (KHC), piknotičke (PYK) i kariolitičke (KYL) stanice smatraju se markerima ranih do kasnih stadija apoptoze i stanične smrti (17). Stakalca ispitanika su zatim evaluirana za pronalazak stanica s mikronukleusom (MN) i jezgrenim pupoljcima (NBUD) među najmanje 2000 diferenciranih stanica (1000/stakalcu) kao odgovarajuće mjere oštećenja kromosoma i DNK (Slika 6).



**Slika 6.** Slike različitih vrsta stanica dobivenih BMCyt testom, obojenih Feulgenom i Fast Greenom, gledano pod propusnim svjetlom, sve snimljeno pri povećanju od  $\times 1000$ : (a) stanica s mikronukleusom (strelica pokazuje na mikronukleus); (b) binuklearna stanica; (c) stanica s jezgrinim pupoljkom; (d) piknotična stanica; (e) kariorektička stanica; (f) kariolitička stanica (strelica pokazuje na kariolitičku stanicu).

### 3.3.2. Anketni upitnik

U ovom djelu istraživanja koristio se standardizirani i validirani upitnik (15 pitanja) o znanjima, stavovima i ponašanju naspram oralnog zdravlja ispitanika (119).

Prije pristupanja provođenju istraživanja, anketni upitnik je preveden s engleskog jezika na hrvatski jezik. Potom je anketni upitnik na hrvatskom jeziku predan stručnjaku iz područja biomedicine i zdravstva s izvrsnim poznavanjem engleskog jezika da provede prijevod anketnog upitnika s hrvatskog na engleski jezik kako bi se potvrdila valjanost anketnog upitnika na hrvatskom jeziku. Osoba koja je provodila prijevod anketnog upitnika s hrvatskog na engleski jezik, nije bila upoznata s detaljima istraživanja niti s izgledom originalnog anketnog

upitnika na engleskom jeziku. S obzirom na to da nije bilo značajnijih odstupanja u prijevodu anketnog upitnika s hrvatskog na engleski jezik, zaključeno je da je prijevod anketnog upitnika valjan.

Anketni upitnik se sastojao od tri dijela kojim se ispituju znanje, stavovi i ponašanje ispitanika vezano uz oralno zdravlje. Znanje se ispitivalo kroz 11 pitanja vezana uz etiologiju, kliničke manifestacije, liječenje i simptome oralnih bolesti i stanja te preventivne mjere uz očuvanje oralnog zdravlja. Ispitanici su mogli odgovoriti zaokruživanjem ponuđenih odgovora da/ne/ne znam, za točan odgovor dobili bi 1 bod, a za netočan ili odgovor „ne znam“ 0 bodova. Stavovi pojedinaca prema oralnom zdravlju temeljeni su na modelu uvjerenja o zdravlju kroz osam tvrdnji na pet-stupanjskoj Likertovoj ljestvici slaganja (5 – potpuno se slažem, 4 – slažem se, 3 – niti se slažem, niti se ne slažem, 3 - ne slažem se, 1 – u potpunosti se ne slažem). Ponašanje ispitanika prema oralnom zdravlju ispitalo se kroz sedam tvrdnji kroz pitanja učestalosti (1 – nikada, 2 – rijetko, 3 – povremeno, 4 – jako često, 5 – uvijek) različitih postupaka prema oralnoj higijeni koji mogu imati dobar ili loš učinak na oralno zdravlje. Anketni upitnik nalazi se u Dodatku I.

### **3.4. Statistička raščlamba**

Statistička analiza provedena je pomoću softverskog paketa SPSS (IBM Corp., Armonk, New York, SAD). Raspodjela varijabli ispitana je Kolmogorov–Smirnovljevim testom.

Primarni statistički parametri (srednja vrijednost, standardna devijacija, minimum, maksimum, medijan i interkvartilne vrijednosti raspona) određene su pomoću deskriptivne statističke analize. Razlike u demografskim podacima ispitanika testirane su neovisnim t-testom. Razlike u broju mikronukleusa i drugih jezgrinih anomalija između različitih vremena uzorkovanja za svaku skupinu testirana su Kruskal-Wallisovim testom. The Mann–Whitney U test testirao je razlike u broju mikronukleusa i ostalih jezgrinih abnormalnosti između skupina u isto vrijeme uzorkovanja. Opći regresijski model (GRM) iz metode linearnog/nelinearnog modeliranja korišten je za procjenu utjecaja prediktorskih varijabli (dob, spol i prehrambene navike) na ovisne varijable (broj mikronukleusa, broj stanica s dvije jezgre, jezgrini pupoljci, piknoza, kondenzirani kromatin, karioliza i karioreksa). Rezultati GRM-a iskazani su u obliku Pareto dijagrama t-vrijednosti.

Podatci dobiveni anketnim upitnikom analizirani su deskriptivno. Sbermanovom korelacijom ispitana je povezanost između KEP indeksa i znanja ispitanika o oralnom zdravlju. Multivarijabilnim logističkim regresijskim modelom ispitana je povezanost znanja o oralnom zdravlju i socio-demografskih podataka ispitanika. Razina značajnosti postavljena je na 0,05 za sve testove.

## **4.    REZULTATI**

U studiju je bio uključen četrdeset i jedan ispitanik prosječne dobi od  $35,00 \pm 11,79$  godina. Osnovne demografske i karakteristike dentalnog statusa ispitanika dvije istraživačke skupine prikazane su u Tablici 4. Nije bilo značajnih razlika između dvije skupine u smislu težine, visine, spola, dobi ili dentalnog statusa u pogledu kompozitnog ispuna.

**Tablica 4.** Demografske i karakteristike dentalnog statusa ispitanika.

| <b>Karakteristike</b>       | <b>Skupina A<br/>(n = 20)</b> | <b>Skupina B<br/>(n = 21)</b> | <b><i>p – vrijednost</i></b> |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <b>Dob</b>                  | 34,35 ± 11,61                 | 35,67 ± 12,19                 | 0,675                        |
| <b>Težina</b>               | 73,63 ± 13,16                 | 77,06 ± 15,01                 | 0,497                        |
| <b>Visina</b>               | 176,35 ± 7,48                 | 177,89 ± 7,52                 | 0,557                        |
| <b>Indeks tjelesne mase</b> | 23,44 ± 3,24                  | 24,21 ± 3,39                  | 0,684                        |
| <b>Kompozitni ispuni</b>    | 4,35 ± 3,33                   | 6,24 ± 3,60                   | 0,097                        |
| <b>Spol</b>                 |                               |                               |                              |
| <b>Ženski</b>               | 13 (65,0 %)                   | 11 (52,3 %)                   |                              |
| <b>Muški</b>                | 7 (35,0 %)                    | 10 (47,6 %)                   | 0,412                        |

Podaci se prikazuju kao cijeli brojevi i postotci ili srednja vrijednost (SD).

Neovisni t-test za kontinuirane vrijednosti, hi-kvadrat za test kategoričkih vrijednosti,  $p \leq 0,05$ .

Deskriptivna statistika za parametre mikronukleus testa po ispitivanim kombinacijama oralno-higijenskih sredstava prikazana je u Tablicama 5-8.



**Tablica 5.** Deskriptivna statistika za jezgrina oštećenja: mikronukleus, jezgrin pup i binuklearne stanice za ispitivanu skupinu A (tekućina za ispiranje usne šupljine s 0 ppm NaF).

| Citogenetsko oštećenje     | Varijabla                 | Vremenski period |       |       |       |      |
|----------------------------|---------------------------|------------------|-------|-------|-------|------|
|                            |                           | T0               | T1    | T2    | T3    |      |
| <b>Mikronukleus</b>        | Srednja vrijednost        | 0,50             | 0,50  | 0,50  | 0,50  |      |
|                            | 95 % Interval pouzdanosti | Donja granica    | 0,26  | 0,11  | 0,14  | 0,11 |
|                            |                           | Gornja granica   | 0,74  | 0,89  | 0,86  | 0,89 |
|                            | Medijan                   | 0,50             | 0,00  | 0,00  | 0,00  |      |
|                            | Standardna devijacija     | 0,51             | 0,82  | 0,76  | 0,82  |      |
|                            | Minimum                   | 0                | 0     | 0     | 0     |      |
|                            | Maksimum                  | 1                | 2     | 2     | 2     |      |
|                            | Interkvartilni raspon     | 1,00             | 1,00  | 1,00  | 1,00  |      |
| <b>Jezgrin pup</b>         | Srednja vrijednost        | 1,25             | 2,35  | 4,25  | 4,90  |      |
|                            | 95 % Interval pouzdanosti | Donja granica    | 0,95  | 1,42  | 2,92  | 3,38 |
|                            |                           | Gornja granica   | 1,55  | 3,28  | 6,08  | 6,42 |
|                            | Medijan                   | 1,00             | 2,00  | 4,50  | 5,50  |      |
|                            | Standardna devijacija     | 0,63             | 1,98  | 4,43  | 3,24  |      |
|                            | Minimum                   | 0                | 0     | 0     | 0     |      |
|                            | Maksimum                  | 2                | 6     | 11    | 10    |      |
|                            | Interkvartilni raspon     | 1,00             | 2,00  | 5,50  | 6,00  |      |
| <b>Binuklearna stanica</b> | Srednja vrijednost        | 11,85            | 11,70 | 14,45 | 7,50  |      |
|                            | 95 % Interval pouzdanosti | Donja granica    | 9,81  | 9,34  | 11,40 | 5,41 |
|                            |                           | Gornja granica   | 13,89 | 14,06 | 17,50 | 9,59 |
|                            | Medijan                   | 12,00            | 12,00 | 14,00 | 6,00  |      |
|                            | Standardna devijacija     | 4,36             | 5,04  | 6,50  | 4,46  |      |
|                            | Minimum                   | 2                | 0     | 6     | 2     |      |
|                            | Maksimum                  | 20               | 20    | 26    | 18    |      |
|                            | Interkvartilni raspon     | 5,00             | 5,00  | 12,75 | 7,00  |      |

Skraćenice: T0 – početak (pasta Biomed Calcimax); T1 – 4 tjedna (zubna pasta 1 – 0 ppm NaF); T2 – 8 tjedana (zubna pasta 2 – 1050 ppm NaF); T3 – 12 tjedana (zubna pasta – 1450 ppm NaF).

**Tablica 6.** Deskriptivna statistika za jezgrina oštećenja: piknozu, zgusnuti kromatin, kariolizu i karioreksu za ispitivanu skupinu A (tekućina za ispiranje usne šupljine s 0 ppm NaF).

| Citogenetsko oštećenje    | Varijabla                 | Vremenski period   |        |        |        |        |
|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|
|                           |                           | T0                 | T1     | T2     | T3     |        |
| <b>Piknoza</b>            | Srednja vrijednost        | 2,95               | 3,70   | 3,70   | 3,75   |        |
|                           | 95 % Interval pouzdanosti | Donja granica      | 2,07   | 2,66   | 2,55   | 2,65   |
|                           |                           | Gornja granica     | 3,83   | 4,74   | 4,85   | 4,80   |
|                           | Medijan                   | 3,00               | 3,50   | 3,00   | 3,00   |        |
|                           | Standardna devijacija     | 1,87               | 2,22   | 2,45   | 2,24   |        |
|                           | Minimum                   | 0                  | 0      | 0      | 0      |        |
|                           | Maksimum                  | 7                  | 8      | 9      | 8      |        |
|                           | Interkvartilni raspon     | 2,00               | 2,75   | 3,00   | 2,75   |        |
|                           | <b>Zgusnuti kromatin</b>  | Srednja vrijednost | 18,25  | 18,75  | 11,45  | 10,35  |
| 95 % Interval pouzdanosti |                           | Donja granica      | 14,78  | 15,45  | 8,53   | 8,08   |
|                           |                           | Gornja granica     | 21,72  | 22,05  | 14,37  | 12,75  |
| Medijan                   |                           | 20,00              | 18,00  | 11,00  | 10,00  |        |
| Standardna devijacija     |                           | 7,41               | 7,05   | 6,24   | 5,96   |        |
| Minimum                   |                           | 5                  | 4      | 0      | 2      |        |
| Maksimum                  |                           | 32                 | 36     | 23     | 21     |        |
| Interkvartilni raspon     |                           | 5,50               | 4,75   | 10,75  | 10,75  |        |
| <b>Karioliza</b>          |                           | Srednja vrijednost | 178,45 | 193,40 | 155,95 | 200,45 |
|                           | 95 % Interval pouzdanosti | Donja granica      | 148,74 | 169,51 | 128,74 | 169,86 |
|                           |                           | Gornja granica     | 208,16 | 217,29 | 188,68 | 231,89 |
|                           | Medijan                   | 180,00             | 186,00 | 140,00 | 200,0  |        |
|                           | Standardna devijacija     | 63,48              | 51,04  | 78,58  | 162,80 |        |
|                           | Minimum                   | 53                 | 120    | 83     | 95     |        |
|                           | Maksimum                  | 277                | 290    | 324    | 295    |        |
|                           | Interkvartilni raspon     | 125,00             | 86,00  | 83,25  | 139,75 |        |
|                           | <b>Karioreksa</b>         | Srednja vrijednost | 52,45  | 67,30  | 63,70  | 65,75  |
| 95 % Interval pouzdanosti |                           | Donja granica      | 36,45  | 49,53  | 47,96  | 46,68  |
|                           |                           | Gornja granica     | 68,45  | 85,07  | 79,44  | 80,96  |

|                       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Medijan               | 43,00 | 62,50 | 67,00 | 68,00 |
| Standardna devijacija | 34,19 | 37,97 | 33,69 | 32,50 |
| Minimum               | 6     | 20    | 12    | 18    |
| Maksimum              | 118   | 140   | 125   | 124   |
| Interkvartilni raspon | 68,00 | 61,75 | 66,25 | 58,25 |

---

Skraćenice: T0 – početak (pasta Biomed Calcimax); T1 – 4 tjedna (zubna pasta 1 – 0 ppm NaF); T2 – 8 tjedana (zubna pasta 2 – 1050 ppm NaF); T3 – 12 tjedana (zubna pasta – 1450 ppm NaF).

---

**Tablica 7.** Deskriptivna statistika za jezgrina oštećenja: mikronukleus, jezgrin pup i binuklearna stanica za ispitivanu skupinu B (tekućina za ispiranje usne šupljine s 450 ppm NaF).

| Citogenetsko oštećenje     | Varijabla             | Vremenski period |       |       |       |      |
|----------------------------|-----------------------|------------------|-------|-------|-------|------|
|                            |                       | T0               | T1    | T2    | T3    |      |
| <b>Mikronukeus</b>         | Srednja vrijednost    | 0,52             | 0,62  | 0,86  | 0,71  |      |
|                            | 95 % Interval         |                  |       |       |       |      |
|                            | pouzdanosti           | Donja granica    | 0,29  | 0,28  | 0,56  | 0,30 |
|                            |                       | Gornja granica   | 0,76  | 0,96  | 1,16  | 1,13 |
|                            | Medijan               |                  | 0,00  | 0,00  | 1,00  | 0,00 |
|                            | Standardna devijacija |                  | 0,51  | 0,74  | 0,65  | 0,90 |
|                            | Minimum               |                  | 0     | 0     | 0     | 0    |
|                            | Maksimum              |                  | 1     | 2     | 2     | 3    |
|                            | Interkvartilni raspon | 1,00             | 1,00  | 1,00  | 1,00  |      |
| <b>Jezgrin pup</b>         | Srednja vrijednost    | 1,19             | 4,90  | 4,10  | 4,86  |      |
|                            | 95 % Interval         |                  |       |       |       |      |
|                            | pouzdanosti           | Donja granica    | 0,77  | 2,75  | 2,75  | 3,44 |
|                            |                       | Gornja granica   | 1,61  | 7,06  | 5,48  | 6,28 |
|                            | Medijan               |                  | 1,00  | 3,00  | 3,00  | 3,00 |
|                            | Standardna devijacija |                  | 0,92  | 4,74  | 3,03  | 3,11 |
|                            | Minimum               |                  | 0     | 0     | 0     | 0    |
|                            | Maksimum              |                  | 3     | 16    | 12    | 12   |
|                            | Interkvartilni raspon | 2,00             | 7,00  | 3,50  | 4,00  |      |
| <b>Binuklearna stanica</b> | Srednja vrijednost    | 11,71            | 9,95  | 10,86 | 7,48  |      |
|                            | 95 % Interval         |                  |       |       |       |      |
|                            | pouzdanosti           | Donja granica    | 9,15  | 6,83  | 8,64  | 5,23 |
|                            |                       | Gornja granica   | 14,28 | 13,07 | 13,08 | 9,72 |
|                            | Medijan               |                  | 12,00 | 7,00  | 10,00 | 6,00 |
|                            | Standardna devijacija |                  | 5,63  | 6,85  | 4,88  | 4,92 |
|                            | Minimum               |                  | 2     | 0     | 3     | 0    |
|                            | Maksimum              |                  | 22    | 23    | 20    | 18   |
|                            | Interkvartilni raspon | 9,00             | 10,50 | 8,50  | 9,50  |      |

Skraćenice: T0 – početak (pasta Biomed Calcimax); T1 – 4 tjedna (zubna pasta 1 – 0 ppm NaF); T2 – 8 tjedana (zubna pasta 2 – 1050 ppm NaF); T3 – 12 tjedana (zubna pasta – 1450 ppm NaF).

**Tablica 8.** Deskriptivna statistika za jezgrina oštećenja: piknozu, zgusnuti kromatin, karioliza i karioreksa za ispitivanu skupinu B (tekućina za ispiranje usne šupljine s 450 ppm NaF).

| Citogenetsko oštećenje    | Varijabla                 | Vremenski period   |        |        |        |        |
|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|
|                           |                           | T0                 | T1     | T2     | T3     |        |
| <b>Piknoza</b>            | Srednja vrijednost        | 3,19               | 4,05   | 3,81   | 5,24   |        |
|                           | 95 % Interval pouzdanosti | Donja granica      | 2,22   | 2,40   | 2,57   | 3,32   |
|                           |                           | Gornja granica     | 4,16   | 5,69   | 5,04   | 7,16   |
|                           | Medijan                   | 2,00               | 4,00   | 3,00   | 3,00   |        |
|                           | Standardna devijacija     | 2,13               | 3,61   | 2,71   | 4,21   |        |
|                           | Minimum                   | 0                  | 0      | 0      | 0      |        |
|                           | Maksimum                  | 8                  | 17     | 10     | 17     |        |
|                           | Interkvartilni raspon     | 3,00               | 2,50   | 1,50   | 3,50   |        |
|                           | <b>Zgusnuti kromatin</b>  | Srednja vrijednost | 18,05  | 18,71  | 9,81   | 8,81   |
| 95 % Interval pouzdanosti |                           | Donja granica      | 15,11  | 13,23  | 7,71   | 6,19   |
|                           |                           | Gornja granica     | 20,99  | 24,20  | 11,91  | 11,43  |
| Medijan                   |                           | 20,00              | 15,00  | 9,00   | 8,00   |        |
| Standardna devijacija     |                           | 6,45               | 12,04  | 4,62   | 5,75   |        |
| Minimum                   |                           | 5                  | 7      | 4      | 2      |        |
| Maksimum                  |                           | 30                 | 48     | 23     | 30     |        |
| Interkvartilni raspon     |                           | 9,50               | 16,50  | 4,00   | 4,00   |        |
| <b>Karioliza</b>          |                           | Srednja vrijednost | 175,38 | 199,48 | 202,33 | 214,10 |
|                           | 95 % Interval pouzdanosti | Donja granica      | 145,27 | 158,95 | 176,01 | 185,27 |
|                           |                           | Gornja granica     | 205,49 | 240,00 | 228,66 | 242,92 |
|                           | Medijan                   | 184,00             | 191,00 | 204,00 | 21,00  |        |
|                           | Standardna devijacija     | 66,14              | 89,03  | 57,83  | 63,31  |        |
|                           | Minimum                   | 53                 | 49     | 83     | 82     |        |
|                           | Maksimum                  | 300                | 409    | 304    | 332    |        |
|                           | Interkvartilni raspon     | 87,00              | 73,00  | 134,00 | 131,00 |        |
|                           | <b>Karioreksa</b>         | Srednja vrijednost | 50,76  | 96,14  | 93,24  | 102,71 |
| 95 % Interval pouzdanosti |                           | Donja granica      | 34,83  | 78,25  | 79,42  | 85,61  |
|                           |                           | Gornja granica     | 66,69  | 114,04 | 107,06 | 119,82 |

|                       |       |       |       |        |
|-----------------------|-------|-------|-------|--------|
| Medijan               | 40,00 | 99,00 | 89,00 | 100,00 |
| Standardna devijacija | 35,00 | 39,31 | 30,35 | 37,58  |
| Minimum               | 26    | 36    | 50    | 26     |
| Maksimum              | 128   | 200   | 151   | 168    |
| Interkvartilni raspon | 52,00 | 56,00 | 53,50 | 50,50  |

Skraćenice: T0 – početak (pasta Biomed Calcimax); T1 – 4 tjedna (zubna pasta 1 – 0 ppm NaF); T2 – 8 tjedana (zubna pasta 2 – 1050 ppm NaF); T3 – 12 tjedana (zubna pasta – 1450 ppm NaF).

Rezultati analize citoma bukalnog mikronukleusa kao markera stanične proliferacije (BNC), markera oštećenja kromosoma i DNK (MN i NBUD) i markera stanične smrti/apoptoze (CCC, KHC, PYK i KYL), prikazani su u Tablicama 9 i 10. Prema Mann–Whitneyjev U testu, jedine značajne razlike usporedbe dviju skupina s istovremenim vremenom uzorkovanja, bile su u broju stanica s jezgrinim pupoljcima u vremenskoj točki T1 ( $p = 0,048$ ) i kariorekse u vremenskim točkama T1 ( $p = 0,020$ ) i T3 ( $p = 0,003$ ).

Prema Kruskal–Wallisovom testu uočena je statistički značajna razlika u broju stanica s dvije jezgre i stanica s kondenziranim kromatinom u obje skupine ( $p \leq 0,001$ ). Broj stanica s dvije jezgre u skupini A i skupini B značajno se smanjio od druge (T2) do treće (T3) vremenske točke ( $p = 0,020$  odnosno  $p = 0,008$ ).

Ovisnost rezultata citogenetskog oštećenja o svim prediktorskim varijablama određena je višestrukom regresijskom analizom i prikazana u obliku Pareto dijagrama (Slike 5-8). Na broj stanica s kariolizom (KYL) statistički značajno utječe konzumacija mesa ( $\beta = 41,263$ , SE = 11,437,  $p = 0,001$ ), dok na broj stanica s karioreksom utječe spol ( $\beta = 27,493$ ; SE = 12,182,  $p = 0,032$ ).

**Tablica 9.** Medijan (interkvartilni raspon) parametara oštećenja DNK (mikronukleus, jezgrin pup, binuklearna stanica) u stanicama bukalne sluznice dviju testiranih grupa ispitanika u različitim vremenskim točkama.

| <b>Citogenetsko oštećenje</b> | <b>Vrijeme</b>                                      | <b>Skupina A<br/>(tekućina za ispiranje<br/>0 ppm F)<br/>(n = 20)</b> | <b>Skupina B<br/>(tekućina za ispiranje<br/>450 ppm F)<br/>(n = 21)</b> | <b><i>p</i> –<br/>vrijednost</b> |
|-------------------------------|---|---|---|----------------------------------|
| <b>Mikronukleus</b>           | T0 – početak<br>(Biomed Calcimax)                   | 0,5 (1)   | 0 (1)   | 0,880                            |
|                               | T1 – četiri tjedna<br>(zubna pasta 1 – 0 ppm F)     | 0 (1)   | 0 (1)   | 0,436                            |
|                               | T2 – osam tjedana<br>(zubna pasta 2 – 1050 ppm F)   | 0 (1)   | 1 (1)   | 0,066                            |
|                               | T3 – dvanaest tjedana<br>(zubna pasta – 1450 ppm F) | 0 (1)   | 0 (1)   | 0,354                            |
|                               | <i>p</i> - vrijednost                               | 0,888   | 0,471   |                                  |
| <b>Jezgrin pup</b>            | T0 – početak<br>(Biomed Calcimax)                   | 1 (1) <sup>a</sup>  | 1 (2) <sup>b,c,d</sup>  | 0,672                            |
|                               | T1 – četiri tjedna<br>(zubna pasta 1 – 0 ppm F)     | 2 (2) <sup>A</sup>  | 3 (7) <sup>A,b</sup>  | 0,048*                           |
|                               | T2 – osam tjedana<br>(zubna pasta 2 – 1050 ppm F)   | 4,5 (5,5)   | 3 (3,5) <sup>c</sup>  | 0,813                            |
|                               | T3 – dvanaest tjedana<br>(zubna pasta – 1450 ppm F) | 5,5 (6) <sup>a</sup>  | 3 (4) <sup>d</sup>  | 0,733                            |
|                               | <i>p</i> - vrijednost                               | ≤0,001*   | ≤0,001*   |                                  |
| <b>Binuklearne stanice</b>    | T0 – početak<br>(Biomed Calcimax)                   | 12 (5)  | 12 (9) <sup>f</sup>   | 0,844                            |
|                               | T1 – četiri tjedna<br>(zubna pasta 1 – 0 ppm F)     | 12 (5)  | 7 (10,5)  | 0,210                            |
|                               | T2 – osam tjedana<br>(zubna pasta 2 – 1050 ppm F)   | 14 (12,75) <sup>e</sup>   | 10 (8,5) <sup>g</sup>   | 0,084                            |
|                               | T3 – dvanaest tjedana                               | 6 (7) <sup>e</sup>  | 6 (9,5) <sup>f, g</sup>   | 0,813                            |

(zubna pasta – 1450 ppm

F)

*p* – vrijednost

0,016\*

0,014\*

Podaci su prikazani kao vrijednost medijana i interkvartilnog raspona.

\*Statistička značajnost testirana je Mann-Whitney U testom (između skupina u istom vremenu uzorkovanja) i Kruskal-Wallisovim testom (za svaku skupinu između različitih vremena uzorkovanja). Isto veliko slovo u gornjem indeksu označavalo je statističku razliku između skupina u istom vremenu uzorkovanja (<sup>A</sup>*p* = 0,048). Isto malo slovo u gornjem indeksu označavalo je statističku razliku u istim skupinama između različitih vremena uzorkovanja na temelju analize parova (<sup>a,b,c,d</sup>*p* ≤ 0,001, <sup>e</sup>*p* = 0,020, <sup>f</sup>*p* = 0,030, <sup>g</sup>*p* = 0,043).

**Tablica 10.** Medijan (interkvartilni raspon) citotoksičnih parametara (karioiza, karioreksa, zgnusnuti kromatin i piknoza)u stanicama bukalne sluznice dviju testiranih skupina sudionika u različitim vremenskim točkama.

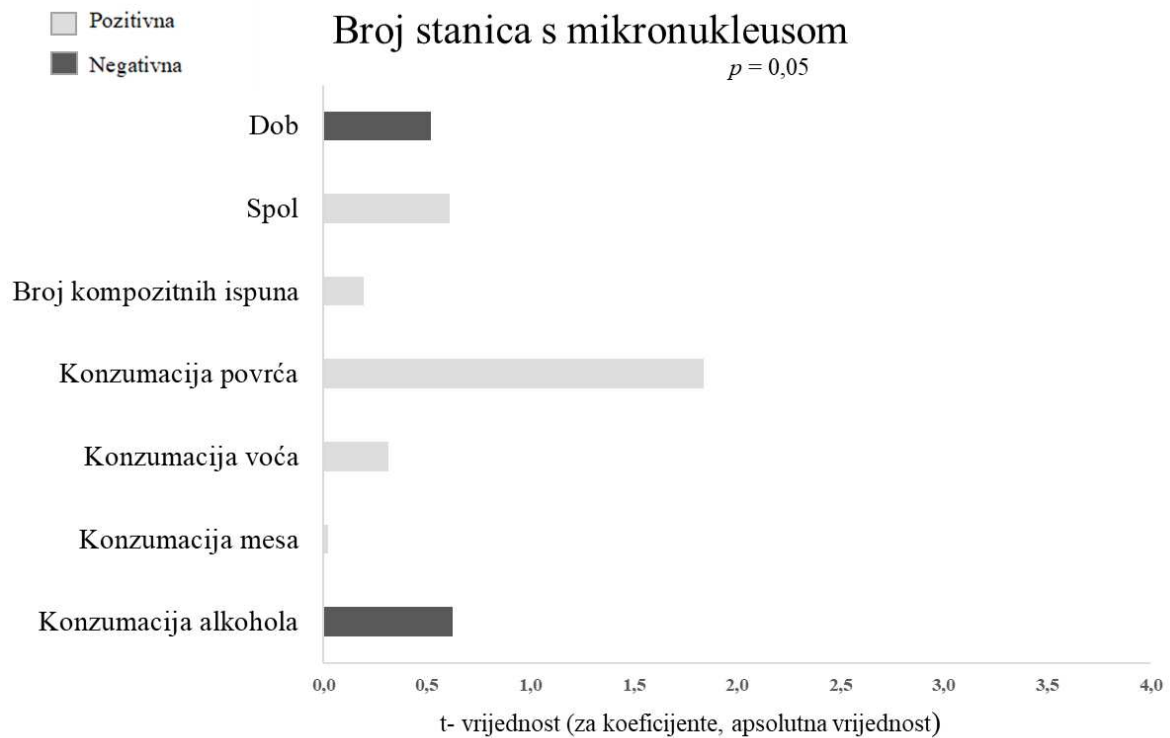
| Citogenetsko oštećenje | Vrijeme  | Skupina A                                | Skupina B                                  | <i>p</i> – vrijednost |
|------------------------|--|--|--|-----------------------|
|                        |  | (tekućina za ispiranje 0 ppm F) (n = 20) | (tekućina za ispiranje 450 ppm F) (n = 21) |                       |
| <b>Karioliza</b>       | T0 – početak (Biomed Calcimax)                   | 180 (125)                                | 184 (87)                                   | 1,000                 |
|                        | T1 – četiri tjedna (zubna pasta 1 – 0 ppm F)     | 186 (86)                                 | 191 (73)                                   | 0,855                 |
|                        | T2 – osam tjedana (zubna pasta 2 – 1050 ppm F)   | 140 (83,25)                              | 204 (134)                                  | 0,225                 |
|                        | T3 – dvanaest tjedana (zubna pasta – 1450 ppm F) | 200 (139,75)                             | 210 (131)                                  | 0,382                 |
|                        | <i>p</i> – vrijednost                            | 0,318                                    | 0,088                                      |                       |
| <b>Karioreksa</b>      | T0 – početak (Biomed Calcimax)                   | 43 (68) <sup>a</sup>                     | 40 (52) <sup>b,c,d</sup>                   | 0,990                 |
|                        | T1 – četiri tjedna (zubna pasta 1 – 0 ppm F)     | 62,5 (61,75) <sup>A</sup>                | 99 (56) <sup>A,b</sup>                     | 0,020*                |
|                        | T2 – osam tjedana (zubna pasta 2 – 1050 ppm F)   | 67 (66,25)                               | 89 (53,5) <sup>c</sup>                     | 0,285                 |
|                        | T3 – dvanaest tjedana (zubna pasta – 1450 ppm F) | 68 (58,25) <sup>B,a</sup>                | 100 (50,5) <sup>B,d</sup>                  | 0,003*                |
|                        | <i>p</i> – v rijednost                           | 0,017*                                   | ≤0,001*                                    |                       |



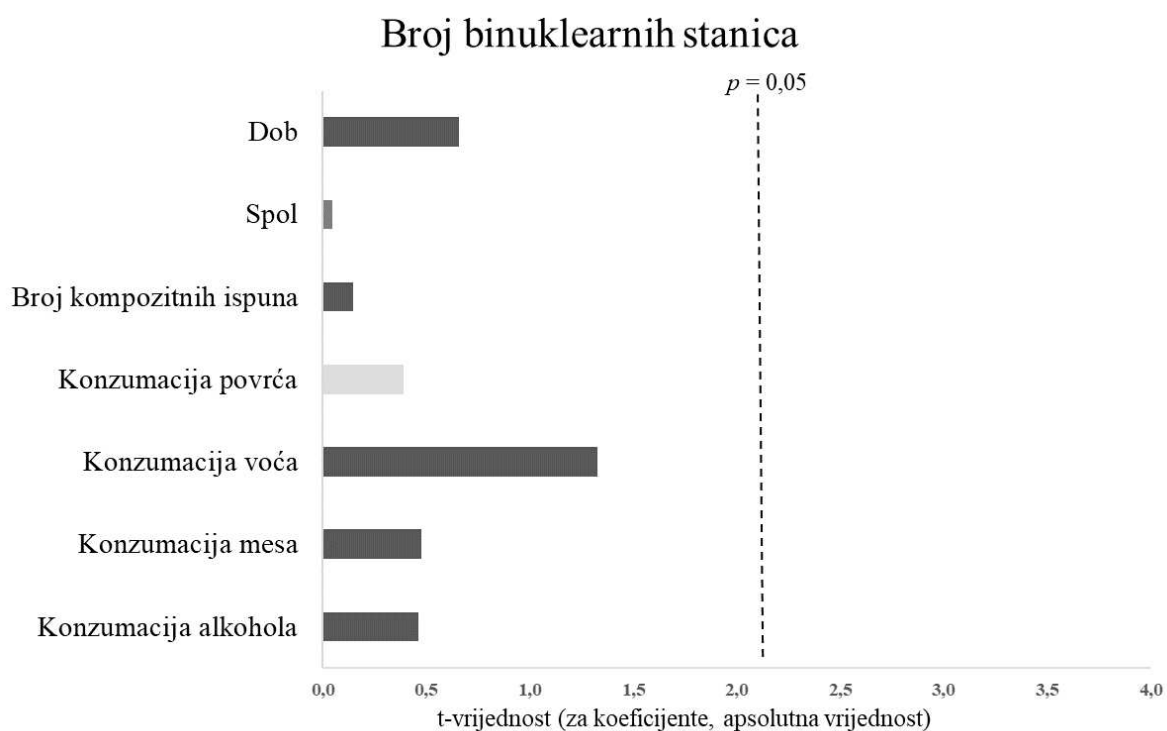
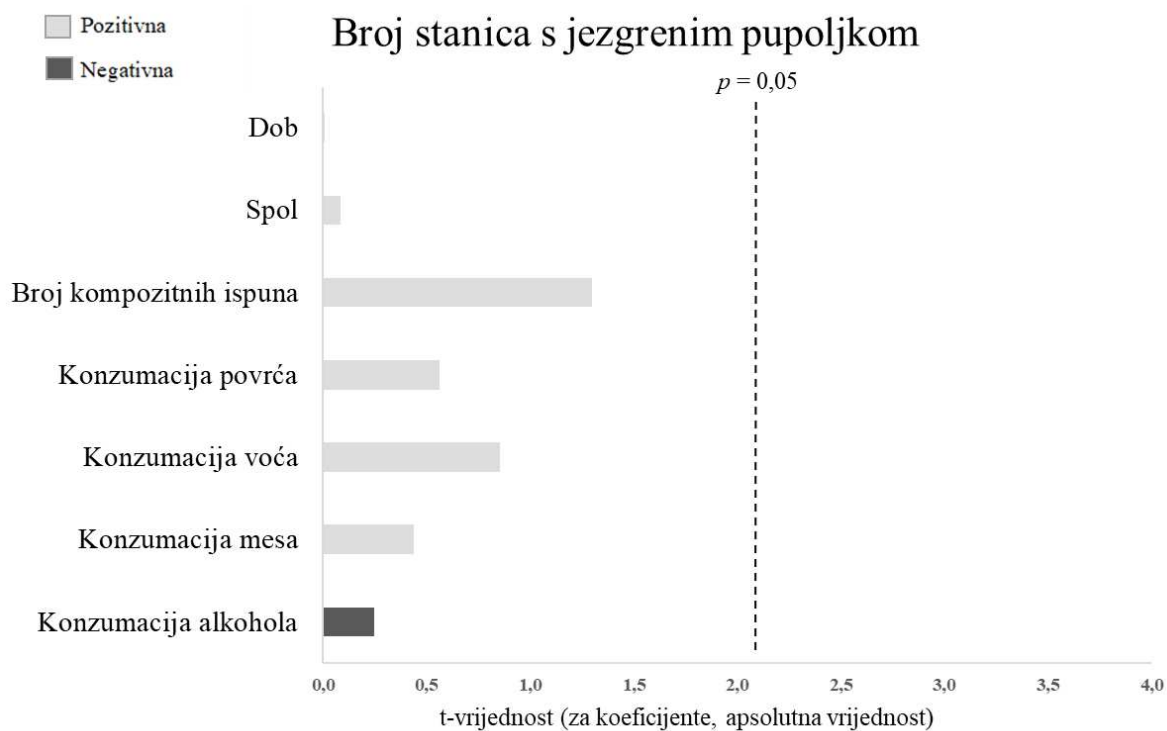
|                          |   |                           |                         |       |
|--------------------------|---|---------------------------|-------------------------|-------|
| <b>Piknoza</b>           | T0 – početak<br>(Biomed Calcimax)                   | 3 (2)                     | 2 (3)                   | 0,926 |
|                          | T1 – četiri tjedna<br>(zubna pasta 1 – 0 ppm F)     | 3,5 (2,75)                | 4 (2,5)                 | 0,958 |
|                          | T2 – osam tjedana<br>(zubna pasta 2 – 1050 ppm F)   | 3 (2,5)                   | 3 (1,5)                 | 1,000 |
|                          | T3 – dvanaest tjedana<br>(zubna pasta – 1450 ppm F) | 3,5 (2,75)                | 3 (3,5)                 | 0,063 |
|                          | <i>p</i> – vrijednost                               | 0,182                     | 0,402                   |       |
| <b>Zgusnuti kromatin</b> | T0 – početak<br>(Biomed Calcimax)                   | 20 (5,5) <sup>e</sup>     | 20 (9,5) <sup>g,h</sup> | 0,927 |
|                          | T1 – četiri tjedna<br>(zubna pasta 1 – 0 ppm F)     | 18 (4,75) <sup>f</sup>    | 15 (16,5) <sup>i</sup>  | 0,218 |
|                          | T2 – osam tjedana<br>(zubna pasta 2 – 1050 ppm F)   | 11 (10,75)                | 9 (4) <sup>g</sup>      | 0,378 |
|                          | T3 – dvanaest tjedana<br>(zubna pasta – 1450 ppm F) | 10 (10,75) <sup>e,f</sup> | 8 (4) <sup>h,i</sup>    | 0,464 |
|                          | <i>p</i> – vrijednost                               | ≤0,001*                   | ≤0,001*                 |       |

Podaci su prikazani kao vrijednost medijana i interkvartilnog raspona.

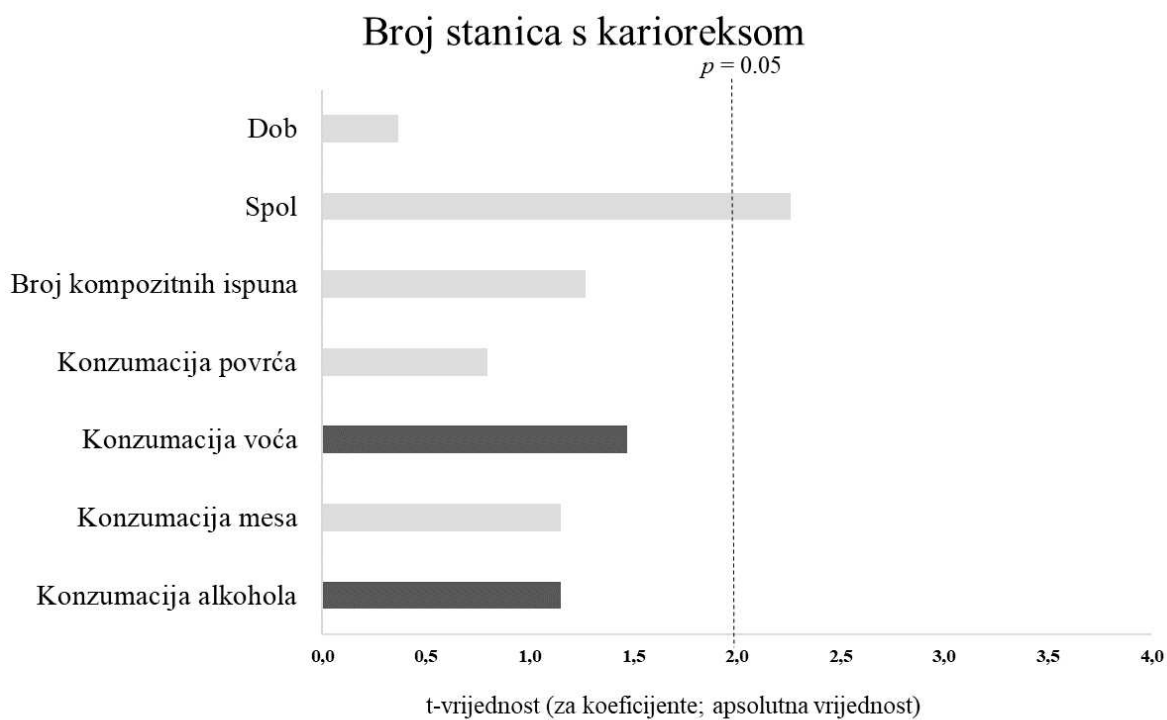
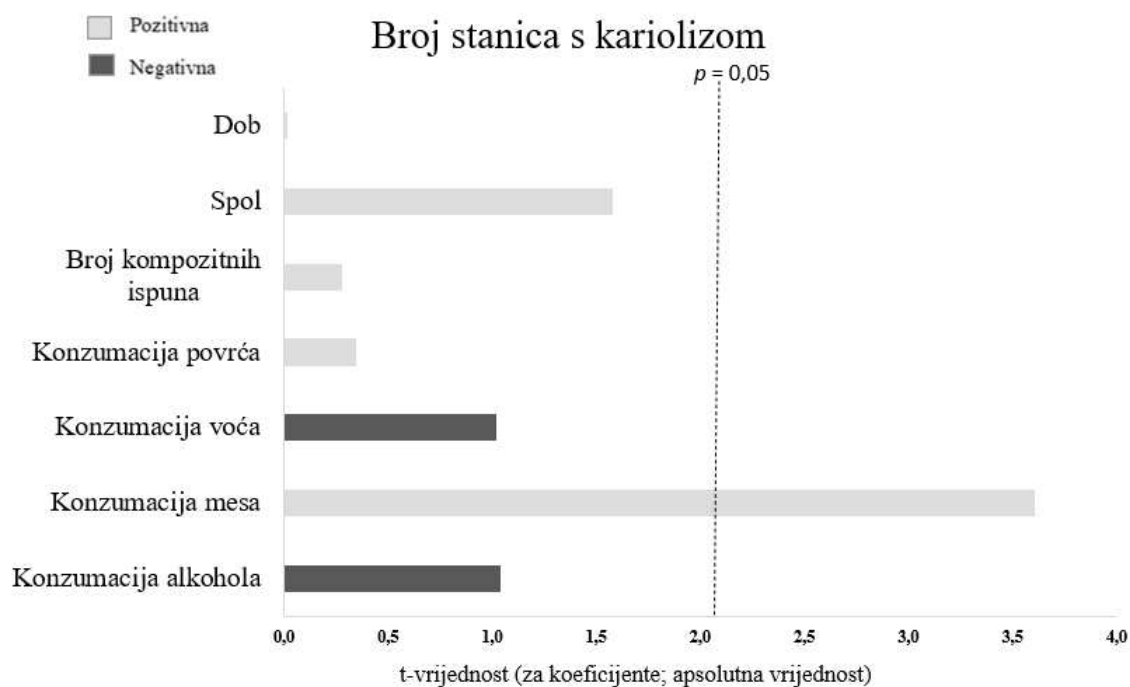
\*Statistička značajnost testirana je Mann-Whitney U testom (između skupina u istom vremenu uzorkovanja) i Kruskal-Wallisovim testom (za svaku skupinu između različitih vremena uzorkovanja). Isto veliko slovo u gornjem indeksu označavalo je statističku razliku između skupina u istom vremenu uzorkovanja (<sup>A</sup>*p* = 0,020, <sup>B</sup>*p* = 0,003). Isto malo slovo u gornjem indeksu označavalo je statističku razliku u istim skupinama između različitih vremena uzorkovanja na temelju analize parova (<sup>a,b,c,d</sup>*p* ≤ 0,001, <sup>e</sup>*p* = 0,020, <sup>f</sup>*p* = 0,030, <sup>g</sup>*p* = 0,043).



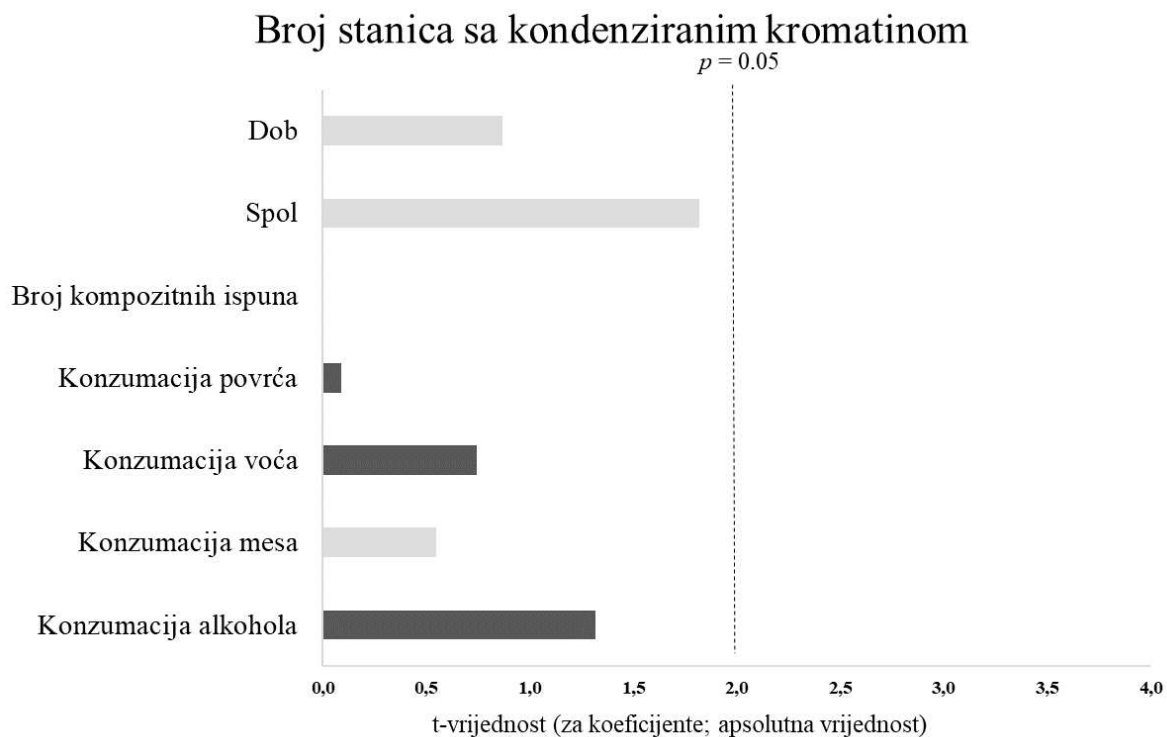
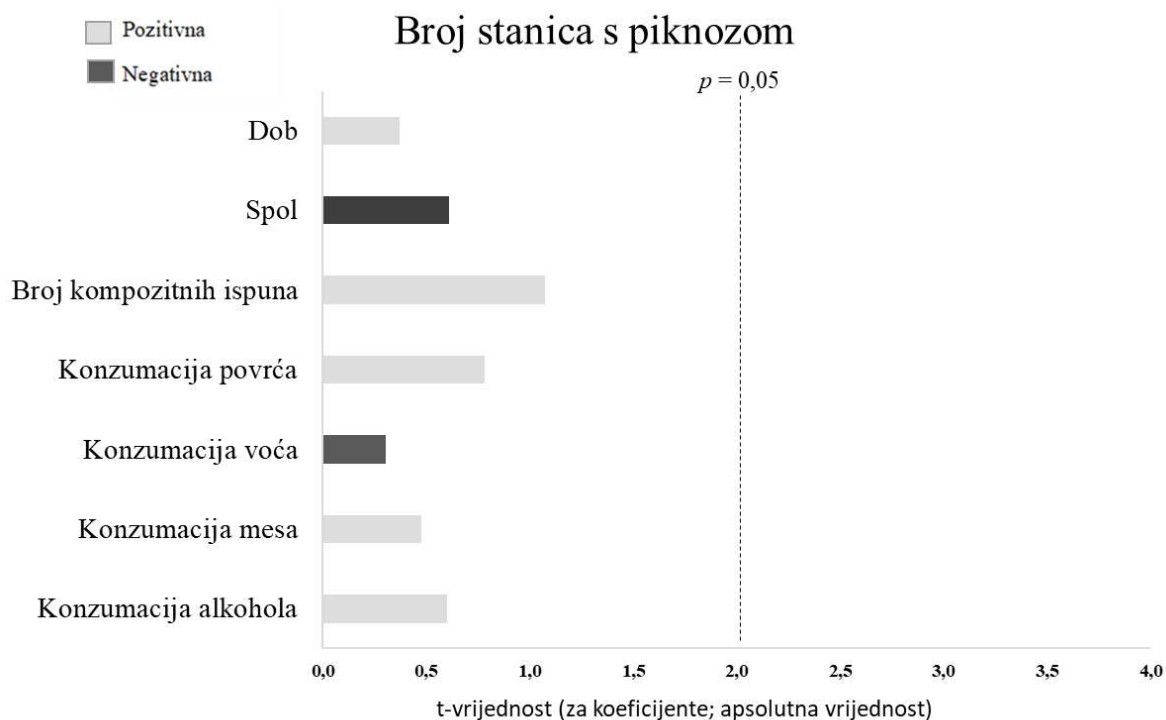
**Slika 7.** Rezultati višestruke regresijske analize. Značajna povezanost citogenetske krajnje točke u stanicama bukalne sluznice (broj stanica s mikronukleusima) s demografskim čimbenicima i čimbenicima načina života kao mogućim prediktorima.



**Slika 8.** Rezultati višestruke regresijske analize. Značajna povezanost citogenetskih krajnjih točaka u stanicama bukalne sluznice (broj stanica s jezgrenom pupoljkom i stanicama s dvije jezgre) s demografskim čimbenicima i čimbenicima načina života kao mogućim prediktorima.



**Slika 9.** Rezultati višestruke regresijske analize. Značajna povezanost citogenetskih krajnjih točaka u stanicama bukalne sluznice (broj stanica s kariolizom i karioreksom) s demografskim čimbenicima i čimbenicima načina života kao mogućim prediktorima.



**Slika 10.** Rezultati višestruke regresijske analize. Značajna povezanost citogenetskih krajnjih točaka u stanicama bukalne sluznice (broj stanica s piknozom i kondenziranim kromatinom) s demografskim čimbenicima i čimbenicima načina života kao mogućim prediktorima.

U istraživanju o povezanosti KEP indeksa i stavova o oralno-higijenskim znanjima, stavovima i ponašanjima bio je uključen 41 ispitanik, od čega su 15 (36,6 %) bili muškarci, a 26 (63,4 %) su bile žene. Najviše ispitanika je imalo visoku stručnu spremu (65,9 %) te ih je najviše bilo u prosječnom socio - ekonomskom statusu (73,2 %) (Tablica 11).

KEP indeks za ispitanike iznosio je  $5,43 \pm 2,88$  ( $M_d = 5$ ,  $IQR = 5$ ;  $Min. = 0$ ,  $Max. = 12$ ). Među stupnjem edukacije ispitanika dominira visoka stručna sprema  $n = 27$  (65,9 %), zatim viša stručna sprema,  $n = 6$  (14,6 %), doktorat ili više,  $n = 5$  (12,2 %), te srednja stručna sprema  $n = 3$  (7,3 %). Ispitanici su se izjasnili kako je njihov socio - ekonomski status prosječan u najvećem broju slučajeva,  $n = 30$  (73,2 %), iznad prosjeka  $n = 11$  (26,8 %) dok ni jedan ispitanik nije bio ispodprosječnog socio - ekonomskog statusa. Više od polovice ispitanika  $n = 24$  (58,5 %) se izjasnilo kako nitko od obitelji ili oni sami ne rade u stomatologiji, dok se  $n = 17$  (41,5 %) ispitanika izjasnilo kako rade u stomatologiji.

Rezultati dijela upitnika o znanju o oralnom zdravlju i oralno-higijenskim navikama pokazali su kako je većina ispitanika točno odgovorila na pitanja, te da dobro vladaju osnovnim oralno-higijenskim informacijama (Tablica 12).

**Tablica 11.** Sociodemografski podatci ispitivanog uzorka.

| <b>Parametar</b>   | <b>Ispitivani uzorak<br/>n = 41</b> |
|--|-------------------------------------|
| <b>Spol (n, %)</b>   |                                     |
| Muško  | 15 (36,6)                           |
| Žensko   | 26 (63,4)                           |
| <b>Dob (godine)</b>  | 32,0 (29,75 - 34,25)                |
| <b>Stupanj edukacije (n, %)</b>                                |                                     |
| SSS  | 3 (7,3)                             |
| VŠS  | 6 (14,6)                            |
| VSS  | 27 (65,9)                           |
| Doktorat ili više  | 5 (12,2)                            |
| <b>Socioekonomski status (n, %)</b>                            |                                     |
| Ispod prosjeka   | 0 (0)                               |
| Prosjek  | 30 (73,2)                           |
| Iznad prosjeka   | 11 (26,8)                           |
| <b>Ispitanik ili član obitelji radi u stomatologiji (n, %)</b> |                                     |
| Da   | 17 (41,5)                           |
| Ne   | 24 (58,5)                           |

Svi podatci su prikazani kao cijeli brojevi (postotak) ili kao medijan (interkvartilni raspon).  
Kratice: SSS – srednja stručna sprema ; VŠS – viša stručna sprema ; VSS – visoka stručna sprema.

**Tablica 12.** Rezultati upitnika o znanju o oralnom zdravlju.

| Parametar (n, %)   | Ispitivani uzorak |           |         |
|--|-------------------|-----------|---------|
|  | n = 41            |           |         |
|  | Da                | Ne        | Ne znam |
| 1. Postoje dvije postavbe zubi koje se izmjene tijekom života.                                 | 38 (92,7)         | 3 (7,3)   | 0 (0,0) |
| 2. Upala zuba može uzrokovati krvarenje desni.   | 33 (80,5)         | 7 (17,1)  | 1 (2,4) |
| 3. Nadoknada izgubljenog zuba može popraviti oralnu higijenu.                                  | 29 (70,7)         | 11 (26,8) | 1 (2,4) |
| 4. Karijes mliječnih zubi se ne treba liječiti.  | 3 (7,3)           | 37 (90,2) | 1 (2,4) |
| 5. Bakterije su jedan od razloga problema s desnama.   | 37 (90,2)         | 2 (4,9)   | 2 (4,9) |
| 6. Gazirana pića loše utječu na zube.  | 38 (92,7)         | 3 (7,3)   | 0 (0,0) |
| 7. Gubitak zubi može utjecati na govor.  | 39 (95,1)         | 2 (4,9)   | 0 (0,0) |
| 8. Zub koji je na krivom mjestu se može pomaknuti na ispravno mjesto uz stomatološku terapiju. | 38 (92,7)         | 2 (4,9)   | 1 (2,4) |
| 9. Zubi zahvaćeni karijesom mogu utjecati na izgled osobe.                                     | 39 (95,1)         | 2 (4,9)   | 0 (0,0) |
| 10. Pušenje ili žvakanje duhana može uzrokovati karcinom usne šupljine.                        | 39 (95,1)         | 2 (4,9)   | 0 (0,0) |
| 11. Bijele naslage na zubima se nazivaju dentalnim plakom.                                     | 39 (95,1)         | 2 (4,9)   | 0 (0,0) |

Svi podatci su prikazani kao cijeli brojevi (postotak).

Rezultati dijela upitnika o stavovima o oralnom zdravlju i oralno-higijenskim navikama pokazali su da većina ispitanika ima pozitivne stavove o održavanju svog oralnog zdravlja (Tablica 13). Pitanje „Stomatolozi se brinu samo o liječenju zubi, a ne o prevenciji,“



pokazuje nešto veću disperziju odgovora od ostalih pitanja. Pitanje „Struganje zubnog korijena je štetno za desni (zubno meso),“ ima najveći broj odgovora „Neodlučan sam“.

**Tablica 13.** Rezultati upitnika o stavovima o oralnom zdravlju.

| Parametar (n, %)  | Ispitivani uzorak |           |               |              |                    |
|---|-------------------|-----------|---------------|--------------|--------------------|
|   | n = 41            |           |               |              |                    |
|   | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |
| 1. Četkanje zubi dva puta dnevno poboljšava oralnu higijenu.        | 35 (85,4)         | 5 (12,2)  | 0 (0,0)       | 0 (0,0)      | 1 (2,4)            |
| 2. Održavanje zubi čistima i zdravima je korisno za naše zdravlje.  | 39 (95,1)         | 1 (2,4)   | 1 (2,4)       | 0 (0,0)      | 0 (0,0)            |
| 3. Nepravilno četkanje zubi može uzrokovati bolest desni.           | 32 (78,0)         | 8 (19,5)  | 1 (2,4)       | 0 (0,0)      | 0 (0,0)            |
| 4. Slatkiši mogu uzrokovati karijes.                                | 33 (80,5)         | 5 (12,2)  | 3 (7,3)       | 0 (0,0)      | 0 (0,0)            |
| 5. Pranje zubi sa fluoridiranom pastom sprječava nastanak karijesa. | 24 (58,5)         | 11 (26,8) | 5 (12,2)      | 1 (2,4)      | 0 (0,0)            |
| 6. Stomatolozi se brinu samo o liječenju zubi, a ne o prevenciji.   | 2 (4,9)           | 3 (7,3)   | 4 (9,8)       | 14 (34,1)    | 18 (43,9)          |
| 7. Krvarenje desni ukazuje na upalu gingive (zubnog mesa).          | 15 (36,6)         | 22 (53,7) | 2 (4,9)       | 1 (2,4)      | 1 (2,4)            |
| 8. Struganje zubnog korijena je štetno za desni (zubno meso).       | 9 (22,0)          | 4 (9,8)   | 14 (34,1)     | 11 (26,8)    | 3 (7,3)            |

Svi podatci su prikazani kao cijeli brojevi (postotak).

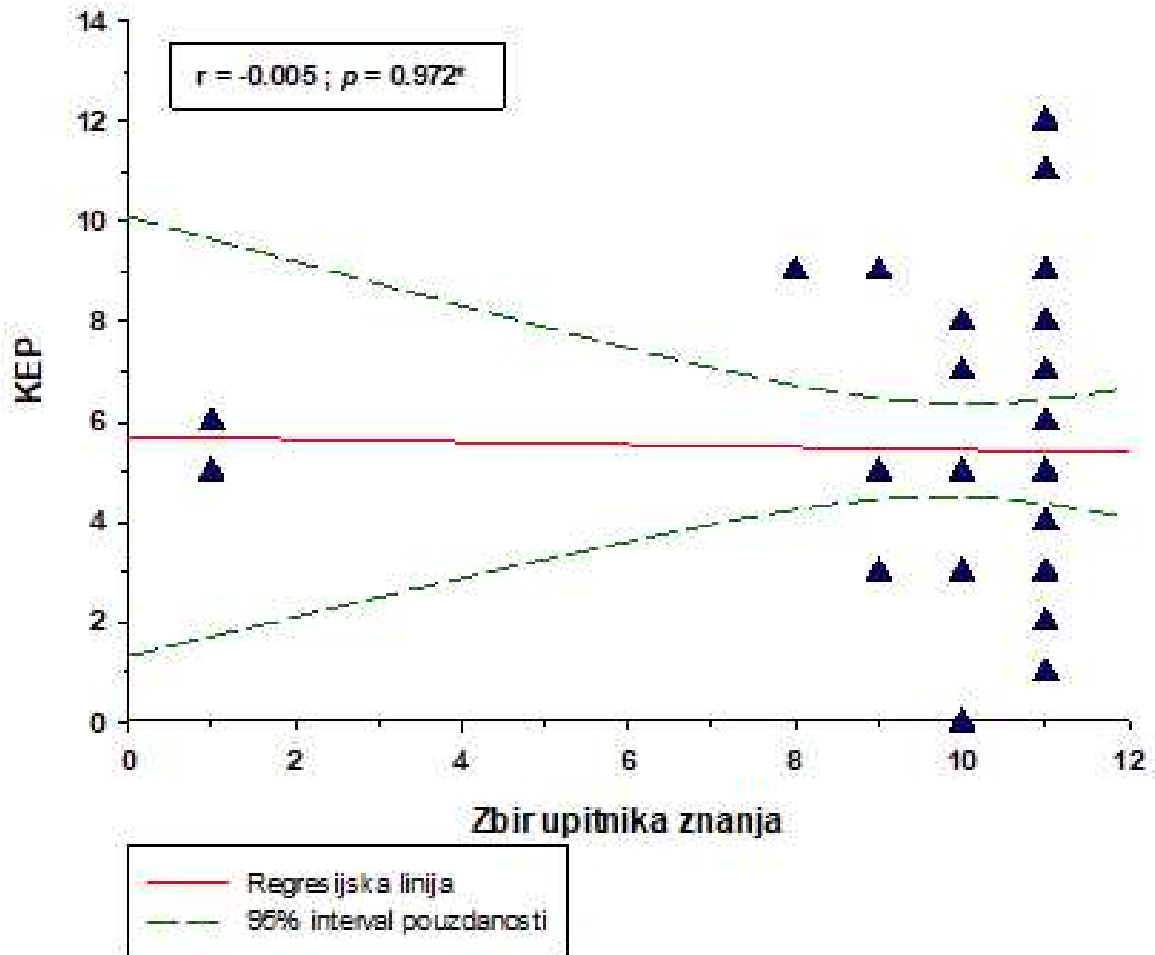
Rezultati dijela upitnika o ponašanju prema oralnom zdravlju prikazani su u Tablici 14.

**Tablica 14.** Rezultati upitnika iz ponašanja prema oralnom zdravlju.

| Parametar (n, %)  | Ispitivani uzorak<br>n = 41 |           |           |            |           |
|---|-----------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
|   | Nikad                       | Rijetko   | Povremeno | Jako često | Uvijek    |
| 1. Pridajem zubima jednaku važnost kao bilo kojem drugom dijelu mojeg tijela. | 0 (0)                       | 1 (2,4)   | 5 (12,2)  | 12 (29,3)  | 23 (56,1) |
| 2. Moji zubi su osjetljivi.   | 6 (14,6)                    | 17 (41,5) | 14 (34,1) | 3 (7,3)    | 1 (2,4)   |
| 3. Perem zube dva puta dnevno.  | 1 (2,4)                     | 0 (0,0)   | 0 (0,0)   | 9 (22,0)   | 31 (75,6) |
| 4. Koristim zube da bi otvorio bocu pića.                                     | 35 (85,4)                   | 2 (4,9)   | 3 (7,3)   | 0 (0,0)    | 1 (2,4)   |
| 5. Osjećam bol u zubima dok žvačem hranu.                                     | 19 (46,3)                   | 17 (41,5) | 4 (9,8)   | 0 (0,0)    | 1 (2,4)   |
| 6. Krvare mi desni dok perem zube.  | 20 (48,8)                   | 12 (29,3) | 6 (14,6)  | 3 (7,3)    | 0 (0,0)   |
| 7. Idem na rutinske stomatološke kontrole.                                    | 3 (7,3)                     | 8 (19,5)  | 9 (22,0)  | 6 (14,6)   | 15 (36,6) |

Svi podatci su prikazani kao cijeli brojevi (postotak).

Spearmanova korelacijska analiza je utvrdila da nema statistički značajne korelacije između KEP indeksa i zbira upitnika znanja ( $r = -0,005$ ;  $p = 0,972^*$ ) (Slika 9).



**Slika 11.** Korelacija između KEP indeksa i zbira upitnika znanja ( $n = 41$ ) (\*Spearmanova korelacija).

Koristeći zbir ispita znanja, ispitanici su bili podijeljeni na one se bolje riješenim ispitom ( $> 9$  zbir;  $n = 33$ ) te na one s lošije riješenim ispitom ( $\leq 9$  zbir;  $n = 8$ ).

Model multivarijabilne logističke regresijske analize nezavisnih prediktora za bolje riješen ispit je utvrdio da su značajni negativni prediktori iznadprosječni socio-ekonomski

status (OR = 0,023; 95 % CI 0,0007 - 0,794;  $p = 0,036$ ) te viša stručna sprema (OR = 0,010; 95 % CI 0,0002 - 0,515;  $p = 0,021$ ) (Tablica 15).

**Tablica 15.** Multivarijabilna logistička regresijska analiza nezavisnih prediktora za bolje riješen ispit znanja o oralnoj higijeni i zdravlju (n = 41).

| Varijabla   | OR       | 95 % CI            | p - vrijednost |
|---|----------|--------------------|----------------|
| Dob   | 0,9878   | 0,8853 –<br>1,1022 | 0,826          |
| Muški spol*   | 0,7487   | 0,0598 –<br>9,3755 | 0,822          |
| KEP indeks  | 0,8393   | 0,5342 –<br>1,3188 | 0,447          |
| SSS <sup>†</sup>  | 220E+003 | –                  | 0,994          |
| VŠS <sup>†</sup>  | 0,0102   | 0,0002 –<br>0,5150 | 0,021*         |
| dr, sc, i više <sup>†</sup>                                   | 0,2369   | 0,0102 –<br>5,5269 | 0,370          |
| Socioekonomski status iznad prosjeka <sup>‡</sup>             | 0,0237   | 0,0007 –<br>0,7945 | 0,036*         |
| Ispitanik ili član obitelji rade u stomatologiji <sup>#</sup> | 0,1208   | 0,0095 –<br>1,5363 | 0,103          |

Kratice: 95 % CI - 95 % interval pouzdanosti; OR - multivarijabilni podešeni omjer izgleda; KEP - Karijes, ekstrakcija, plomba indeks; SSS - srednja stručna sprema ; VŠS - viša stručna sprema, dr,sc,- doktor znanosti.

\* Ženski spol je referentna grupa

† Visoka stručna sprema je referentna grupa

‡ Prosječni socioekonomski status je referentna grupa

# Ispitanik ili član obitelji ne rade u stomatologiji je referentna grupa

## **5. RASPRAVA**

Posljednjih nekoliko godina značajan broj objavljenih članaka prikazuje opsežne dokaze koji se odnose na genotoksičnost i citotoksičnost fluorida. Većina ovih studija provedene su *in vitro* na različitim ljudskim i životinjskim staničnim linijama, kao i tumorskim linijama, dok su neke provedene *in vivo* na pokusnim životinjama kao što su štakori. Zbog nedostatka kliničkih studija *in vivo*, toksičnost fluorida i dalje ostaje kontroverzno pitanje (120).

Cilj ove studije bio je utvrditi je li redovita kombinirana uporaba fluoridiranih proizvoda za oralnu higijenu kao što su zubne paste i tekućine za ispiranje usne šupljine može predstavljati opasnost za ljudsko zdravlje zbog suviška fluorida u usnoj šupljini i utjecaja na bukalnu sluznicu. U trenutku izrade ove studije, nema sličnih objavljenih istraživanja. Kako bismo odgovorili na ovo pitanje, proveden je bukalni mikronukleusni citom test na 41-om ispitaniku. Hipoteza istraživanja bila je da će postojati razlike unutar skupina ovisno o koncentraciji fluorida u zubnim pastama ili između skupina ovisno o tome jesu li sudionici koristili tekućinu za ispiranje usne šupljine s fluoridom ili ne. Rezultati su pokazali da za većinu ispitivanih parametara nema statistički značajne razlike između te unutar dviju ispitivanih skupina (tekućina za ispiranje bez i s fluoridima).

Naši rezultati pokazuju da je učestalost mikronukleusa ostala nepromijenjena unutar i između ispitivanih skupina: identificirano je 0 – 3 MN što odgovara vrijednosti mikronukleusa sa samog početka istraživanja kada ispitanici nisu izloženi potencijalnom genotoksičnom i citotoksičnom učinku fluorida, a ovakva vrijednost MN odgovara vrijednostima zdravih osoba što je potvrđeno u više drugih sličnih istraživanja (116, 121).

Rezultat ukazuje na odsutnost genotoksičnog učinka fluorida u koncentracijama koje su korištene. Međutim, primijećena je statistički značajna razlika u broju stanica s jezgrinim pupoljcima ( $p = 0,048$ ) i karioreksom ( $p = 0,048$ ) u T1 (4 tjedna) između skupina A i B, što ukazuje na povećano citogenetsko oštećenje u skupini B, koja je koristila tekućinu za ispiranje usne šupljine s fluoridom. Ovakvi rezultati podudaraju se s rezultatima studije Tadin i sur. gdje je značajno povećana učestalost piknotičnih stanica, stanica s karioreksom i jezgrinim pupom, a uspoređivale su se različite vrste zubnih pasti (bez fluorida, s fluoridom i s natrij lauril sulfatom) (71).

Godine 2021. objavljene su dvije studije o genotoksičnosti fluoridnih lakova i gelova koji se koriste kod pacijenata s fiksnim ortodontskim aparatićima. Apiwantanakul i Chantarawaratit pronašli su povećan sadržaj metala i smanjeno preživljenje stanica, ali ne i



genotoksični učinak na stanice bukalne sluznice ispitanika (122). Važno ograničenje njihove studije bilo je što su koristili Papanicolaou metodu za bojenje bukalnih stanica, koja se ne može smatrati vjerodostojnom za identifikaciju mikronukleusa prema više publiciranih znanstvenih studija i samim protokolima za izradu bukalnog mikronukleus citom testa. Naime Nersesyan i sur. proveli su usporedno testiranje učinka nekoliko vrsta bojenja stanica na rezultate analize mikronukleusa s oljuštenih stanica bukalne sluznice (123). Zaključili su da se neke jezgrene anomalije i keratinska tijela mogu pogrešno protumačiti kao mikronukleusi s nespecifičnim bojenjima DNK kao što su Giemsa, Papanicolaou, Diff-Quick, Azur-eozin i May-Grunwald te da na taj način dovode do lažno pozitivnog rezultata. Upotreba boja specifičnih za DNK kao što su Feulgen, DAPI, akridin-narančasta i sličnih bojila obvezan je za BMCyt test kako ne bi dolazilo do pogrešnog tumačenja i lažno pozitivnih rezultata (124).

Chitra i sur. koji su također procjenjivali fluoridne lakove kod ortodontskih pacijenata, pronašli su veći broj mikronukleusa u jednom vremenu u fluoridiranoj skupini u usporedbi s nefluoridiranom kontrolom (125). Međutim, autori su analizirali samo 200 stanica po stakalcu (po ispitaniku) što nije dovoljno za objavu objektivnih rezultata prema originalnom BMCyt protokolu (105), najmanje 1000 - 2000 stanica treba se pregledati po ispitaniku kako bi se standardiziranom metodom dobili vjerodostojni rezultati (126).

Fluoridi se mogu apsorbirati u bukalnu sluznicu i to korištenjem proizvoda za oralnu higijenu koji se sastoje od 1500 ppm fluorida tijekom 4 mjeseca, a rezultati su potvrđeni na istraživanju bukalne sluznice kod ljudi i štakora (127). Studije na štakorima pokazale su da opetovana uporaba raznih stomatoloških i oralno-higijenskih fluoridiranih proizvoda može dovesti do nakupljanja fluorida u usnoj šupljini, gdje suvišak fluorida može uzrokovati oštećenje DNK, potaknuti apoptozu i utjecati na stanični ciklus (128).

Primjenom komet-testa (jednostanična elektroforeza), Ribeiro i sur. pokazali su kako različite koncentracije fluorida ne oštećuju DNK i to na mišjim stanicama limfoma, kulturi ljudskih fibroblasta i stanicama oralne sluznice štakora. Zaključili su da natrijev fluorid ne uzrokuje genotoksične promjene u oralnim stanicama štakora te da fluorid ne može biti genotoksičan zbog nemogućnosti stvaranja dodataka na bazama DNK ili interkalacije u sekundarnu DNK strukturu. Međutim, komet-test primarno detektira lomove lanaca DNK i druga oštećenja DNK koja fragmentiranu materiju prikazuju u obliku repa. Komet-test ne može

otkriti aneugenični učinak ili učinak na stanični ciklus, stoga ne pruža nužno potpuni dokaz o mutagenoj sposobnosti za ispitanu tvar (129).

Nekoliko drugih studija pokazalo je jaku genotoksičnu prirodu fluorida, ali molekularni mehanizmi nisu bili potpuno jasni (130). Smatralo se da fluorid napada amino skupinu povezanu s DNK izravno ili neizravno putem proizvodnje slobodnih radikala. Povišenje koncentracije radikalnih kisikovih spojeva i lipidne peroksidacije podupire teoriju neizravnog učinka fluorida na DNK stvaranjem slobodnih radikala. Jeng i sur. su u svojoj *in vitro* studiji zaključili da natrijev fluorid može biti toksičan za oralnu sluznicu, a posebno fibroblaste mehanizmom inhibicije sinteze proteina i mitohondrijske funkcije, kao i iscrpljivanjem staničnog ATP-a (131).

Genotoksični učinak fluorida u koncentracijama koje se koriste u proizvodima za oralnu higijenu ostaje kontradiktoran. Kod bukalnih stanica, morfološke promjene jezgre i različite promjene samog kromatina okarakterizirane su kao markeri citotoksičnih učinaka (piknoza, karioliza i karioreksa) predstavljaju različite degenerativne i/ili adaptivne promjene te označavaju pojavu apoptoze ili nekroze) (132).

Lee i sur. pokazali su da 5 - 40 mM natrijevog fluorida inducira apoptozu u ljudskim gingivalnim fibroblastima preko mitohondrijskih putova i putova ovisnih o receptorima za staničnu smrt (72). Brojne druge studije također su pokazale učinke fluorida na apoptozu, stanični ciklus i staničnu smrt (133).

Zanimljivo je da smo u ovoj studiji primijetili da unutar skupina A i B postoji smanjenje broja binuklearnih stanica (BN) od T2 do T3 i stanica s kondenziranim kromatinom (CC) od T1 do T3. Postupno povećanje izloženosti fluoridima dovodi do blagog smanjenja proliferacije bazalnih stanica i apoptoze. Prema Rose i sur. fluorid se povezuje sa stanicama oralne sluznice uglavnom preko izvanstaničnog kalcijevog mosta; ako primijenimo ovu hipotezu na rezultate ovog istraživanja, može se zaključiti kako su mjesta vezanja kalcija možda već bila zasićena prethodnom izloženošću fluoridima pa se nije dogodilo veće oštećenje stanica koje bi očekivali (97). Činjenica da nije primijećena statistički značajna genotoksičnost/citotoksičnost fluorida u ovoj studiji također može biti povezana s fenomenom otpornosti na fluorid, koji je prvi put primijećen u nekih bakterijskih vrsta i sojeva, kao i nedavno u staničnim linijama miševa i štakora (134).

Rohr i sur. pokazali su složen proces promjene izražaja gena u mišjim stanicama izloženim fluoridima, posebno kod gena koji se odnose na opći odgovor na stres, sintezu proteina i održavanje stanične membrane (135). Satoh i sur. dokazali su na tri ljudske stanične linije iz usne šupljine (gingivalni fibroblasti, parodontni fibroblasti i stanice pulpe) da je povećanje otpornosti na NaF povezano sa starenjem (136). To može biti zbog povećanja staničnog i jezgrenog volumena te sadržaja staničnih proteina, što u konačnici može rezultirati razrjeđenjem NaF u blizini ciljnog mjesta.

Rezultate studije teško je usporediti s rezultatima drugih studija jer ne postoji slično osmišljena i provedena studija koja bi uspoređivala genotoksične i citotoksične učinke koristeći zajedno pastu za zube i tekućinu za ispiranje usta *in vivo*. Većina provedenih studija su *in vitro*, te su prilično različite u smislu dizajna studije, korištenih metoda, vrste izloženosti fluoridu i veličine uzorka.

Važno je spomenuti da različiti biološki, ekološki i demografski čimbenici mogu utjecati na rezultate *in vivo* istraživanja. Usna šupljina je multifaktorijalno okruženje; budući da svaki ispitanik ima specifične biološke fluktuacije, vrlo je teško izvedivo standardizirati *in vivo* istraživanje. Kako bi se izbjegle individualne devijacije, u ovom istraživanju je svaki ispitanik služio kao kontrola sam sebi, a interindividualna biološka raznolikost bila je trivijalna u konačnoj procjeni. Na učestalost oštećenja DNK također mogu utjecati mnogi čimbenici. Pokazalo se da na učestalost MN izmjerenu u limfocitima periferne krvi blokiranoj citokinezom korištenjem BMCyt testa utječu dob, spol, način prehrane i životni stil (137,138). Stoga je ključno uvesti mjerenje svih ovih čimbenika prilikom provedbe studije o izloženosti genotoksičnim agensima. U našem istraživanju konzumacija mesa među ispitanicima ima statistički značajnu pozitivnu korelaciju između kariolize ( $\beta = 0,545$ ,  $SE = 11,437$ ,  $p \leq 0,001$ ), a muški spol korelira s karioreksom ( $\beta = 0,415$ ,  $SE = 12,512$ ,  $p = 0,027$ ). Ceppi i sur., u svom istraživanju dokazali su da su najčešći potencijalni zbunjujući čimbenici dob (98, 4%), spol (85,7 %) i pušenje (90,5 %); međutim u našem istraživanju pušači bili su isključeni zbog mogućeg velikog utjecaja na učestalost MN i rezultate općenito (16).

Iako je BMCyt test postao vrlo popularan alat za praćenje otkrivanja citogenetskih oštećenja kod ljudi zbog svoje jednostavnosti i bezbolne metode uzimanja lako dostupnih stanica, ovaj test također ima određena kritična ograničenja. Najvažniji ograničavajući čimbenik je subjektivna vizualna procjena stakalaca pod mikroskopom, gdje se utvrđuju

citološki parametri, a samo bodovanje i mikroskopiranje ovisi o vještini, obući i iskustvu istraživača. Studija u kojoj je nekoliko laboratorija iz cijelog svijeta ocjenjivalo ista stakalca, pokazala su se uniformna u identifikaciji mikronukleusa, no pojavila su se značajna neslaganja u pogledu različitih staničnih oblika kod stanične smrti. Stoga, preporučeno je da se stanične anomalije povezane sa staničnom smrću (npr. kondenzirani kromatin i kariorektične stanice) trebaju svrstati u jednu kategoriju (139).

Istraživanje je imalo nekoliko ograničenja. Mehanizam kontrole ispitanika te hoće li se pridržavati točno svih navedenih uputa nije bilo moguće provesti, jer ispitanici kroz duži vremenski period više puta dnevno sami koriste zubne paste i tekućine za ispiranje usne šupljine. Iako je optimalno vrijeme za promatranje staničnih anomalija oljuštenih bukalnih stanica između 7 i 21 dan, prema metabolizmu bazalnih stanica, ipak je možda trebalo uzeti duži vremenski period te više briseva kako bi rezultati bili što točniji (140). Dob ispitanika slična je u obje skupine, ali citotoksičnost i genotoksičnost se mogu bolje ispitati ukoliko bi svi ispitanici bili iz mlađe dobne skupine (npr. ispod 30 godina) kako bi se izbjegli utjecaji starenja, kao što je pokazano u nedavnim studijama o sindromu Down i Alzheimerovoj bolesti (108). Daljnje ograničenje studije bila je veličina skupine (123). Osim toga, uzorci su uzeti samo iz bukalne sluznice, a u budućim studijama trebalo bi razmotriti uzimanje uzoraka s drugih mjesta oralne sluznice, kao što su dno usne šupljine i orofarinksa, što bi moglo donijeti bolji uvid u toksičnost fluorida.

Promatranje učinaka fluoridirane paste za zube i tekućine za ispiranje usne šupljine vrlo su složeni u *in vivo* uvjetima. Glavna funkcija fluorida u oralnoj higijeni je da reagira s hidroksiapatitom kako bi se stvorio fluorapatit koji stvara povećanu otpornost cakline na kiseline (141). S obzirom da dinamička kompeticija apsorpcije fluorida od strane tvrdog i mekog tkiva nije jasna, te bi učinke također trebalo istražiti u budućnosti. Ova se studija usredotočila na paste za zube i tekućine za ispiranje usne šupljine, te su potrebne daljnje studije kako bi se ispitalo potencijalno citotoksično i genotoksično oštećenje drugih proizvoda za oralnu higijenu. Unatoč tome, naša *in vivo* studija donijela je korisne podatke o upotrebi uobičajenih proizvoda za oralnu higijenu s fluoridom. Dodatno su potrebne studije koje uključuju veći broj ispitanika s duljim praćenjem i možda kombiniranje BMCyt testa s nekim drugim metodama za procjenu mogućeg oštećenja DNK, kromosomske nestabilnosti, stanične smrti i regenerativnog potencijala tkiva bukalne sluznice.

Istovremena redovita svakodnevna uporaba paste za zube s fluoridom i tekućine za ispiranje usta povećava količinu fluorida koji dolazi u dodir s oralnom sluznicom koji se može dalje resorbirati u tkivo usne šupljine ili sistemski u organizam. Dakle, potencijalno štetni kumulativni učinak dugotrajne izloženosti višku fluorida zbog svakodnevne upotrebe oralno-higijenskih proizvoda ostaje otvoren, a daljnja su istraživanja vrijedan doprinos našem boljem razumijevanju biološkog učinka fluorida.

Rezultati anketnog upitnika o znanjima, stavovima i ponašanju prema oralnom zdravlju su zadovoljavajući. Većina ispitanika je točno odgovorila na pitanja o znanju, što se poklapa s rezultatima Selveraj i sur. (119). U svojoj studiji, Harikiran i sur. navode rezultate provedbe upitnika na 212 djece, a rezultati se dramatično razlikuju od naših rezultata jer samo 38,5 % djece pere zube dva puta dnevno, a vrlo malo ih posjećuje doktora dentalne medicine (142).

Kod ispitanika u ovoj studiji KEP indeks iznosio je 5,43, što je u usporedbi s KEP indeksom Hrvatske za razdoblje od 2013. do 2015. godine znatno bolje, jer je tada KEP indeks za dobnu skupinu 18,65 godina iznosio 12,5 (143). U svom članku, Aflalo i sur. zaključuju kako su pozitivno ponašanje i stavovi povezani s boljim oralno-zdravstvenim zdravljem. Također su utvrdili statistički značajnu povezanost između ponašanja koje ugrožava zdravlje i provođenja higijene usne šupljine, što je viši rezultat, veća je vjerojatnost neprikladnog pranja zubi i manje posjeta stomatološkoj klinici (OR = 1,56, 95% CI = 1,85-2,62 i OR = 2,20, 95% CI = 1,31-1,86) (31).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je iznadprosječni socio-ekonomski status (OR = 0,023; 95 % CI = 0,0007 - 0,794;  $p = 0,036$ ) i visoka stručna sprema (OR = 0,010; 95 % CI = 0,0002 - 0,515;  $p = 0,021$ ) značajan negativan prediktor. Ovaj rezultat je suprotan većini drugih studija, a pregledni članak autora Kumar i sur. zaključuje kako su djeca iz obitelji s visokim prihodima, obrazovanjem roditelja i obiteljskom ekonomijom imala bolju kvalitetu života što se oralnog zdravlja tiče (144). U svojoj meta-analizi, Knorst i sur. povezali su niži socio - ekonomski status i lošiju kvalitetu života povezanu s oralnim zdravljem u zemljama svih ekonomskih klasifikacija, u svim dobnim skupinama i bez obzira na korišteni socio - ekonomski pokazatelj, a također je uočeno da što je niži socioekonomski položaj pojedinaca, to je njihova kvaliteta života povezana s oralnim zdravljem lošija (145). Jedan od razloga zašto osobe s nižim socio - ekonomskim statusom često imaju lošije zdravlje zuba i usne šupljine može biti

onemogućen pristup stomatološkoj skrbi, lošiji uvjeti života, ograničen pristup zdravoj hrani i generalno povišen rizik od oboljenja usne šupljine.

Lipsky i sur. u preglednom članku o povezanosti spola i oralne higijene utvrđuju kako muški spol češće ignorira probleme s oralnim zdravlje, ima lošije higijenske navike, rjeđe posjećuju stomatologa odnosno posjećuju ga kada imaju akutni problem, a ne preventivno te češće oboljevaju od bolesti parodonta, karcinoma usne šupljine i traume zuba (146). Rezultati našeg istraživanja ne pokazuju značajnu razliku između znanja, stavova i ponašanja pojedinaca prema oralnom zdravlju u odnosu na dob i spol. U budućnosti su potrebne studije s više ispitanika, kako bi podatci dobiveni istraživanjem imali što veći značaj.

## **6. ZAKLJUČCI**

Sukladno prethodno navedenim ciljevima, hipotezama i dobivenim rezultatima istraživanja možemo zaključiti:

1. Između dviju ispitivanih skupina (kombinacija zubnih pasta s tekućinom za ispiranje usne šupljine s i bez fluorida) nije bilo značajnijih razlika u socio - demografskim karakteristikama.
2. Za citogenetska jezgrina oštećenja (mikronukleus, binuklearna stanica, karioliza, zgusnuti kromatin i piknoza) nema razlike između skupine A (0 ppm NaF tekućina za ispiranje) i B (450 ppm NaF tekućina za ispiranje) za vrijeme korištenja zubnih pasta s različitom koncentracijom fluorida u nijednoj vremenskoj točki.
3. U vremenu T1 (kada su primijenjene zubne paste bez fluorida) postoji razlika u broju stanica s jezgrinim pupom i karioreksom između skupina A (0 ppm NaF tekućina za ispiranje) i B (450 ppm NaF tekućina za ispiranje) ( $M_d = 2$ , IQR = 2 naspram  $M_d = 3$ , IQR = 7;  $p = 0,048$  te  $M_d = 62,5$ , IQR = 61,75 naspram  $M_d = 99$ , IQR = 56;  $p = 0,020$ ; slijedom).
4. U vremenu T3 (kada je korištena zubna pasta s 1450 ppm NaF) postoji razlika u broju stanica s karioreksom između skupina A (0 ppm F tekućina za ispiranje) i B (450 ppm NaF tekućina za ispiranje) ( $M_d = 68$ , IQR = 32,25 naspram  $M_d = 100$ , IQR = 50,5;  $p = 0,003$ ).
5. Za mikronukleus, kariolizu i piknozu ne postoji razlika unutar ispitivanih grupa ovisno o koncentraciji fluorida u korištenim zubnim pastama.
6. Za broj stanica s jezgrinim pupom postoji razlika za obje ispitivane skupine, skupinu A (0 ppm NaF tekućina za ispiranje) i skupinu B (450 ppm NaF tekućina za ispiranje) između različitih ispitivanih vremena, ali jedino u odnosu na kontrolno vrijeme (T0) kada se koristila komercijalno dostupna zubna pasta ( $p \leq 0,001$ ).
7. Za broj binuklearnih stanica uočeno je smanjenje njihovog broja između vremena T2 (zubna pasta s 1050 ppm NaF) i T3 (zubna pasta s 1450 ppm NaF) za obje testirane skupine, skupina A (0 ppm NaF tekućina za ispiranje) i B (450 ppm NaF tekućina za



ispiranje), ( $M_d = 14$ ,  $IQR = 12,75$  naspram  $M_d = 36$ ,  $IQR = 7$ ;  $p = 0,016$  te  $M_d = 10$ ,  $IQR = 8,5$  naspram  $M_d = 6$ ,  $IQR = 9,5$ ;  $p = 0,014$ ; slijedom).

8. Za broj stanica s karioreksom postoji razlika za obje ispitivane skupine, skupina A (0 ppm NaF tekućina za ispiranje) i skupina B (450 ppm NaF tekućina za ispiranje) između različitih ispitivanih vremena, ali jedino u odnosu na kontrolno vrijeme ( $T_0$ ) kada se koristila komercijalno dostupna zubna pasta ( $p = 0,017$ ,  $p \leq 0,001$ ; slijedom).
9. Za broj stanica sa zgusnutim kromatinom uočeno je smanjenja njihovog broja između vremena  $T_1$  (zubna pasta s 0 ppm NaF) i  $T_3$  (zubna pasta s 1450 ppm NaF) za obje testirane skupine, skupinu A (0 ppm NaF tekućina za ispiranje) i B (450 ppm NaF tekućina za ispiranje), ( $M_d = 18$ ,  $IQR = 4,75$  naspram  $M_d = 10$ ,  $IQR = 10,75$ ;  $p \leq 0,001$  te  $M_d = 15$ ,  $IQR = 16,5$  naspram  $M_d = 8$ ,  $IQR = 4$ ;  $p \leq 0,001$ ; slijedom).
10. Sukladno dobivenim rezultatima možemo zaključiti kako uporaba zubnih pasta s različitom koncentracijom fluorida ne dovodi do citotoksičog i genotoksičnog učinka u stanicama bukalne sluznice, kao ni istovremeno korištenje fluoridiranih zubnih pasta i tekućina za ispiranje usne šupljine.
11. U usporedbi prehrambeno-dijetetskih navika ispitanika i utjecaja na pojavnost oštećenja stanica, pokazano je da na broj stanica s kariolizom utječe jedino konzumacija mesa ( $\beta = 41,263$ ,  $SE = 11,437$ ,  $p = 0,001$ ), a na broj stanica s karioreksom utječe muški spol ( $\beta = 27,493$ ;  $SE = 12,182$ ,  $p = 0,032$ ).
12. Za bolje riješen upitnik o znanjima, stavovima i ponašanju prema oralnom zdravlju značajni negativni prediktori su iznadprosječni socio-ekonomski status ( $OR = 0,023$ ; 95 % CI 0,0007 - 0,794;  $p = 0,036$ ) i visoka stručna sprema ( $OR = 0,010$ ; 95 % CI 0,0002 - 0,515;  $p = 0,021$ ).

## **7. LITERATURA**

1. Cheng R, Yang H, Shao MY, Hu T, Zhou XD. Dental erosion and severe tooth decay related to soft drinks: a case report and literature review. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009;10(5):395-9.
2. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5721-32.
3. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006;6 Suppl 1(Suppl 1):S14.
4. He X, Shi W-Y. Oral Microbiology: Past, Present and Future. *International journal of oral science*. 2009;1:47-58.
5. Adams SE, Arnold D, Murphy B, Carroll P, Green AK, Smith AM, i sur. A randomised clinical study to determine the effect of a toothpaste containing enzymes and proteins on plaque oral microbiome ecology. *Sci Rep*. 2017;7:43344.
6. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007;369(9555):51-9.
7. Wu CZ, Yuan YH, Liu HH, Li SS, Zhang BW, Chen W, i sur. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):204.
8. Aspinall SR, Parker JK, Khutoryanskiy VV. Oral care product formulations, properties and challenges. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021;200:111567.
9. Cook SL, Bull SP, Methven L, Parker JK, Khutoryanskiy VV. Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocolloids*. 2017;72:281-96.
10. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol*. 1982;11(1):1-17.
11. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis*. 2002;8(3):117-29.
12. Neyraud E. Role of saliva in oral food perception. *Monogr Oral Sci*. 2014;24:61-70.
13. Cariati P, Cabello Serrano A, Marin Fernandez A, Julia Martinez MA, Fernandez Solis J, Martinez Lara I. Behavior of Buccal Mucosal Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Study of 53 Carcinomas of This Anatomical Region. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr*. 2019;12(1):8-13.

14. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2013;753(2):100-13.
15. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol*. 2011;682:235-48.
16. Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharm Sci*. 1998;1(1):15-30.
17. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res*. 2010;705(1):11-9.
18. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, i sur. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007;28(3):625-31.
19. Surrallés J, Autio K, Nylund L, Järventaus H, Norppa H, Veidebaum T, i sur. Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis*. 1997;18(4):817-23.
20. Ribeiro DA, Yujra VQ, da Silva VHP, Claudio SR, Estadella D, de Barros Viana M, i sur. Putative mechanisms of genotoxicity induced by fluoride: a comprehensive review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(18):15254-9.
21. Galey WR, Lonsdale HK, Nacht S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J Invest Dermatol*. 1976;67(6):713-7.
22. Souza DC, Maltz M, Hashizume LN. Fluoride retention in saliva and in dental biofilm after different home-use fluoride treatments. *Braz Oral Res*. 2014;28.
23. Vogel GL, Mao Y, Chow LC, Proskin HM. Fluoride in plaque fluid, plaque, and saliva measured for 2 hours after a sodium fluoride monofluorophosphate rinse. *Caries Res*. 2000;34(5):404-11.
24. Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, i sur. Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol*. 2006;51(11):1006-14.

25. Naumova EA, Staiger M, Kouji O, Modric J, Pierchalla T, Rybka M, i sur. Randomized investigation of the bioavailability of fluoride in saliva after administration of sodium fluoride, amine fluoride and fluoride containing bioactive glass dentifrices. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):119.
26. Naumova EA, Kuehnl P, Hertenstein P, Markovic L, Jordan RA, Gaengler P, i sur. Fluoride bioavailability in saliva and plaque. *BMC Oral Health*. 2012;12:3.
27. Twetman S. Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *European Journal of Oral Sciences*. 2018;126:19-25.
28. Tanner L, Craig D, Holmes R, Catinella L, Moynihan P. Does Dental Caries Increase Risk of Undernutrition in Children? *JDR Clin Trans Res*. 2022;7(2):104-17.
29. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E. *Dental caries: the disease and its clinical management*: John Wiley & Sons; 2015.
30. Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):4-12.
31. Dawes C, Weatherell JA. Kinetics of fluoride in the oral fluids. *J Dent Res*. 1990;69 Spec No:638-44; discussion 82-3.
32. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17030.
33. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015;94(5):650-8.
34. Aflalo E, Dichtiar R, Zusman S, Bilenko N, Keinan-Boker L. The association between health attitudes and behaviors and oral-health-related practices. *Quintessence Int*. 2018;49(2):153-62.
35. Winkelmann J, Gómez Rossi J, Schwendicke F, Dimova A, Atanasova E, Habicht T, i sur. Exploring variation of coverage and access to dental care for adults in 11 European countries: a vignette approach. *BMC Oral Health*. 2022;22(1):65.
36. Widström E, Eaton KA. Oral healthcare systems in the extended European union. *Oral Health Prev Dent*. 2004;2(3):155-94.

37. Gugnani N, Pandit IK, Srivastava N, Gupta M, Sharma M. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2011;4(2):93-100.
38. Acharya S. Specific caries index: A new system for describing untreated dental caries experience in developing countries. *J Public Health Dent.* 2006;66(4):285-7.
39. Moradi G, Mohamadi Bolbanabad A, Moinafshar A, Adabi H, Sharafi M, Zareie B. Evaluation of Oral Health Status Based on the Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) Index. *Iran J Public Health.* 2019;48(11):2050-7.
40. Marthaler TM. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res.* 2004;38(3):173-81.
41. Health at a Glance 2009: OECD Indicators. Ukrajina: OECD Publishing.
42. Carvalho JC, Schiffner U. Dental Caries in European Adults and Senior Citizens 1996-2016: ORCA Saturday Afternoon Symposium in Greifswald, Germany - Part II. *Caries Res.* 2019;53(3):242-52.
43. Mehta A. Comprehensive review of caries assessment systems developed over the last decade. *RSBO (South brazilian dental journal).* 2012;99:316-21.
44. Szöke J, Petersen PE. Changing Levels of Dental Caries over 30 Years among Children in a Country of Central and Eastern Europe - The Case of Hungary. *Oral Health Prev Dent.* 2020;18(1):177-83.
45. Doifode D, Godhane A, Pattanshetti K, Sanklecha S, Kesri R, Jain C. Dental Caries Indices used for Detection, Diagnosis, and Assessment of Dental Caries. *International Journal of Oral Care & Research.* 2018;6:77-81.
46. Patel RN, Eaton KA, Pitts NB, Schulte A, Pieper K, White S. Variation in methods used to determine national mean DMFT scores for 12-year-old children in European countries. *Community Dent Health.* 2016;33(4):286-91.
47. Klingenberger D WJ, Henschke C. Best Oral Health Practice in Europe? Eine Analyse zur Frage der Vergleichbarkeit der Effizienz zahnmedizinischer Versorgungssysteme. *Zahnmed Forsch Versorg.* 2021;4.
48. Oral health: prevention is key. *Lancet.* 2009;373(9657):1.

49. Selvaraj S, Naing NN, Nadiyah WA. Periodontal Disease and COVID 19. *J. Pharm. Res. Int.*, 32, pp. 88–91.
50. Bettinghaus EP. Health promotion and the knowledge-attitude-behavior continuum. *Prev Med.* 1986;15(5):475-91.
51. Aranza D, Nota A, Galić T, Kozina S, Tecco S, Poklepović Peričić T, i sur. Development and Initial Validation of the Oral Health Activities Questionnaire. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(9).
52. Westland JC. Information loss and bias in likert survey responses. *PLoS One.* 2022;17(7):e0271949.
53. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(1):Cd007868.
54. Robinson PG, Deacon SA, Deery C, Heanue M, Walmsley AD, Worthington HV, i sur. Manual versus powered toothbrushing for oral health. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005(2):Cd002281.
55. Hitz Lindenmüller I, Lambrecht JT. Oral care. *Curr Probl Dermatol.* 2011;40:107-15.
56. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;2004(1):Cd002781.
57. Feigal RJ, Donly KJ. The use of pit and fissure sealants. *Pediatr Dent.* 2006;28(2):143-50; discussion 92-8.
58. Ahovuo-Saloranta A, Hiiri A, Nordblad A, Worthington H, Mäkelä M. Pit and fissure sealants for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004(3):Cd001830.
59. Lippert F. An introduction to toothpaste - its purpose, history and ingredients. *Monogr Oral Sci.* 2013;23:1-14.
60. Davies R, Scully C, Preston AJ. Dentifrices--an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(6):e976-82.

61. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32(5):319-21.
62. Lee CH, Maibach HI. The sodium lauryl sulfate model: an overview. *Contact Dermatitis.* 1995;33(1):1-7.
63. Kasi SR, Özcan M, Feilzer AJ. Side effects of sodium lauryl sulfate applied in toothpastes: A scoping review. *Am J Dent.* 2022;35(2):84-8.
64. Gaffar A, Scherl D, Afflitto J, Coleman EJ. The effect of triclosan on mediators of gingival inflammation. *J Clin Periodontol.* 1995;22(6):480-4.
65. Fedorowicz Z, Aljufairi H, Nasser M, Outhouse TL, Pedrazzi V. Mouthrinses for the treatment of halitosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(4):Cd006701.
66. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S46-s73.
67. Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg.* 2005;3(4):162-78.
68. Zimmer S, Kolbe C, Kaiser G, Krage T, Ommerborn M, Barthel C. Clinical efficacy of flossing versus use of antimicrobial rinses. *J Periodontol.* 2006;77(8):1380-5.
69. Escobar-García DM, Puente-Amaro J, Rosales-Berber M, Pozos-Guillén A, Ruiz-Rodríguez S, Garrocho-Rangel A. Biological effects of sodium fluoride varnishes used in remineralisation of enamel: An in vitro study. *Eur J Paediatr Dent.* 2021;22(2):107-13.
70. Aoba T, Fejerskov O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):155-70.
71. Reich E. Trends in caries and periodontal health epidemiology in Europe. *Int Dent J.* 2001;51(6 Suppl 1):392-8.
72. Duffin S, Duffin M, Grootveld M. Revisiting Fluoride in the Twenty-First Century: Safety and Efficacy Considerations. *Front Oral Health.* 2022;3:873157.
73. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik B. Fluoride: a review of use and effects on health. *Mater Sociomed.* 2016;28(2):133-7.



74. Yeung CA. A systematic review of the efficacy and safety of fluoridation. *Evid Based Dent.* 2008;9(2):39-43.
75. Tadin A, Gavic L, Govic T, Galic N, Zorica Vladislavic N, Zeljezic D. In vivo evaluation of fluoride and sodium lauryl sulphate in toothpaste on buccal epithelial cells toxicity. *Acta Odontol Scand.* 2019;77(5):386-93.
76. Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, Park JH, Yang KH, Choi NK, i sur. Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicology.* 2008;243(3):340-7.
77. Buzalaf. Fluoride and the Oral Environment. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:97–114.
78. Ullah R, Zafar M. Oral and dental delivery of fluoride: A review. *Fluoride.* 2015;48.
79. Kay E, Locker D. A systematic review of the effectiveness of health promotion aimed at improving oral health. *Community Dent Health.* 1998;15(3):132-44.
80. Duckworth RM, Morgan SN. Oral Fluoride Retention after Use of Fluoride Dentifrices. *Caries Research.* 1991;25(2):123-9.
81. dos Santos AP, Nadanovsky P, de Oliveira BH. A systematic review and meta-analysis of the effects of fluoride toothpastes on the prevention of dental caries in the primary dentition of preschool children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41(1):1-12.
82. Li Y. Fluoride: safety issues. *J Indiana Dent Assoc.* 1993;72(3):22-6.
83. Toumba KJ, Twetman S, Splieth C, Parnell C, van Loveren C, Lygidakis N. Guidelines on the use of fluoride for caries prevention in children: an updated EAPD policy document. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2019;20(6):507-16.
84. Kusano SC, Tenuta LM, Cury AA, Cury JA. Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin demineralization. *Braz Oral Res.* 2011;25(5):383-7.
85. Heijnsbroek M, Paraskevas S, Van der Weijden GA. Fluoride interventions for root caries: a review. *Oral Health Prev Dent.* 2007;5(2):145-52.
86. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res.* 2004;83(1):71-5.

87. Kleinsasser NH, Weissacher H, Wallner BC, Kastenbauer ER, Harréus UA. [Cytotoxicity and genotoxicity of fluorides in human mucosa and lymphocytes]. *Laryngorhinootologie*. 2001;80(4):187-90.
88. Refsnes M, Becher R, Låg M, Skuland T, Schwarze PE. Fluoride-induced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in human epithelial lung cells. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18(11):645-52.
89. Aoun A, Darwiche F, Al Hayek S, Doumit J. The Fluoride Debate: The Pros and Cons of Fluoridation. *Prev Nutr Food Sci*. 2018;23(3):171-80.
90. Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda. Geneva: World Health Organization; 2022.
91. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*. 2010;188(2):319-33.
92. Choudhury P, Gnanasundaram N, Bajoria A. Fluoride Toxicity in Rabbits and The Role of Calcium in Prevention of Fluoride Toxicity. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2018;11:445-52.
93. Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res*. 1994;8(1):5-14.
94. Cerklewski FL. Fluoride bioavailability — Nutritional and clinical aspects. *Nutrition Research*. 1997;17(5):907-29.
95. Palmer CA, Gilbert JA. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: the impact of fluoride on health. *J Acad Nutr Diet*. 2012;112(9):1443-53.
96. Qy X, Liang Y, Chen L, Cs W, Bh C, Xd C, et al. Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence. *Fluoride*. 2003;36.
97. Carey CM. Focus on fluorides: update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. *J Evid Based Dent Pract*. 2014;14 Suppl:95-102.
98. Holland RI. Fluoride inhibition of protein synthesis. *Cell Biol Int Rep*. 1979;3(9):701-5.
99. Aardema MJ, Gibson DP, LeBoeuf RA. Sodium fluoride-induced chromosome aberrations in different stages of the cell cycle: a proposed mechanism. *Mutat Res*. 1989;223(2):191-203.

100. Hirano S, Ando M. Apoptotic cell death following exposure to fluoride in rat alveolar macrophages. *Arch Toxicol.* 1996;70(3-4):249-51.
101. Staun Larsen L, Baelum V, Richards A, Nyvad B. Fluoride in Saliva and Oral Mucosa after Brushing with 1,450 or 5,000 ppm Fluoride Toothpaste. *Caries Res.* 2019;53(6):675-81.
102. Arpan Dey B. A review on fluoride induced organotoxicity and genotoxicity in mammals and zebrafish. *Nucleus.* 2019;v. 62(no. 2):pp. 177-85-2019 v.62 no.2.
103. Ribeiro DA, Cardoso CM, Yujra VQ, De Barros Viana M., Aguiar O, Jr., Pisani LP, i sur. Fluoride Induces Apoptosis in Mammalian Cells: In Vitro and In Vivo Studies. *Anticancer Res.* 2017;37(9):4767-77.
104. Tadin A, Gavic L, Zeravica A, Ugrin K, Galic N, Zeljezic D. Assessment of cytotoxic and genotoxic effects of conventional and whitening kinds of toothpaste on oral mucosa cells. *Acta Odontol Scand.* 2018;76(1):64-70.
105. Apiwantanakul N, Chantarawatit PO. Cytotoxicity, genotoxicity, and cellular metal accumulation caused by professionally applied fluoride products in patients with fixed orthodontic appliances: A randomized clinical trial. *J World Fed Orthod.* 2021;10(3):98-104.
106. Rose RK, Shellis RP, Lee AR. The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res.* 1996;30(6):458-64.
107. Ribeiro DA, Marques ME, de Assis GF, Anzai A, Poleti ML, Salvadori DM. No relationship between subchronic fluoride intake and DNA damage in Wistar rats. *Caries Res.* 2004;38(6):576-9.
108. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, i sur. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37.
109. Bolognesi C, Roggieri P, Ropolo M, Thomas P, Hor M, Fenech M, i sur. Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis.* 2015;30(4):545-55.
110. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, i sur. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage:

- the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659(1-2):93-108.
111. Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen.* 2005;45(2-3):258-70.
  112. Rosin MP. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat Res.* 1992;267(2):265-76.
  113. Fenech M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes (Basel).* 2020;11(10).
  114. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMan MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1999;428(1-2):271-83.
  115. Moore LE, Warner ML, Smith AH, Kalman D, Smith MT. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen.* 1996;27(3):176-84.
  116. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res.* 2013;753(2):100-13.
  117. Oberhammer FA, Hochegger K, Fröschl G, Tiefenbacher R, Pavelka M. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol.* 1994;126(4):827-37.
  118. Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res.* 2008;638(1-2):37-47.
  119. Zamzami N, Kroemer G. Condensed matter in cell death. *Nature.* 1999;401(6749):127-8.
  120. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):3-15.

121. Shi Q, King RW. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*. 2005;437(7061):1038-42.
122. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, i sur. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011;26(1):125-32.
123. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, i sur. The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res*. 2011;728(3):88-97.
124. Shimizu N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis*. 2011;26(1):119-23.
125. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992;271(1):69-77.
126. Sharma D, Singh A, Verma K, Paliwal S, Sharma S, Dwivedi J. Fluoride: A review of pre-clinical and clinical studies. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;56:297-313.
127. Amaechi BT, van Loveren C. Fluorides and non-fluoride remineralization systems. *Monogr Oral Sci*. 2013;23:15-26.
128. Suresh K. An overview of randomization techniques: An unbiased assessment of outcome in clinical research. *J Hum Reprod Sci*. 2011;4(1):8-11.
129. Selvaraj S, Naing NN, Wan-Arfah N, Karobari MI, Marya A, Prasad S. Development and Validation of Oral Health Knowledge, Attitude and Behavior Questionnaire among Indian Adults. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(1).
130. Johnston NR, Strobel SA. Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. *Arch Toxicol*. 2020;94(4):1051-69.
131. Nersesyan A, Kundi M, Atefie K, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(10):1835-40.

132. Nersesyanyan A, Kundi M, Fenech M, Stopper H, da Silva J, Bolognesi C, i sur. Recommendations and quality criteria for micronucleus studies with humans. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2022;789:108410.
133. Chitra P, Prashantha G, Rao A, Jois HS. In Vivo Evaluation of Micronucleus Frequencies in Buccal Mucosal Cells of Orthodontic Patients with and Without Fluoride Use. *Journal of Indian Orthodontic Society*. 2022;56(3):274-81.
134. Jeng JH, Hsieh CC, Lan WH, Chang MC, Lin SK, Hahn LJ, i sur. Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. *Cell Biol Toxicol*. 1998;14(6):383-9.
135. Gabler WL. Absorption of fluoride through the oral mucosa of rats. *Arch Oral Biol*. 1968;13(6):619-23.
136. He LF, Chen JG. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World J Gastroenterol*. 2006;12(7):1144-8.
137. Susik MS, Prakash PA, Rao TM. Effects of Different Concentrations of Fluoride in Oral Mucosal Cells in Albino Rats. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(12):Zf01-4.
138. Ribeiro DA, Scolastici C, Marques ME, Salvadori DM. Fluoride does not induce DNA breakage in Chinese hamster ovary cells in vitro. *Braz Oral Res*. 2004;18(3):192-6.
139. Ribeiro DA, Salvadori DMF, Assis GF, Marques MEA. Does fluoride cause DNA damage? An 'in vitro' evaluation using rats oral mucosa cells. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2015;2(6):268-71.
140. Rohr P, da Silva GF, Vicentini VEP, Almeida IV, Dos Santos RA, Takahashi CS, i sur. Buccal micronucleus cytome assay: Inter-laboratory scoring exercise and micronucleus and nuclear abnormalities frequencies in different populations from Brazil. *Toxicol Lett*. 2020;333:242-50.
141. Satoh R, Kishino K, Morshed SR, Takayama F, Otsuki S, Suzuki F, i sur. Changes in fluoride sensitivity during in vitro senescence of normal human oral cells. *Anticancer Res*. 2005;25(3b):2085-90.
142. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011;26(1):43-9.

143. Borthakur G, Butryee C, Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE. Exfoliated buccal mucosa cells as a source of DNA to study oxidative stress. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(1):212-9.
144. Simmer JP, Hardy NC, Chinoy AF, Bartlett JD, Hu JC. How Fluoride Protects Dental Enamel from Demineralization. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2020;10(2):134-41.
145. Harikiran AG, Pallavi SK, Hariprakash S, Nagesh KS. Oral health-related KAP among 11- to 12-year-old school children in a government-aided missionary school of Bangalore city. *Indian J Dent Res.* 2008;19(3):236-42.
146. Radić M, Benjak T, Vukres VD, Rotim Ž, Zore IF. Presentation of DMFT/dmft Index in Croatia and Europe. *Acta Stomatol Croat.* 2015;49(4):275-84.
147. Kumar S, Kroon J, Lalloo R. A systematic review of the impact of parental socio-economic status and home environment characteristics on children's oral health related quality of life. *Health Qual Life Outcomes.* 2014;12:41.
148. Knorst JK, Sfreddo CS, de FMG, Zanatta FB, Vettore MV, Ardenghi TM. Socioeconomic status and oral health-related quality of life: A systematic review and meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2021;49(2):95-102.
149. Lipsky MS, Su S, Crespo CJ, Hung M. Men and Oral Health: A Review of Sex and Gender Differences. *Am J Mens Health.* 2021;15(3):15579883211016361.

## **8. SAŽETAK**



**Ciljevi:** Glavni cilj istraživanja je procijeniti potencijalni citotoksični i genotoksični učinak kombiniranog korištenja fluoridiranih zubnih pasta i tekućine za ispiranje usne šupljine s fluoridom mjerenjem pojavnosti mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija u stanicama bukalne sluznice mikronukleus testom. Sporedni ciljevi su procijeniti potencijalni citotoksični i genotoksični učinak zubnih pasta s različitim koncentracija fluorida na pojavnost mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija u stanicama bukalne sluznice mikronukleus testom te ispitati znanja, stavove i ponašanje ispitanika prema oralnom zdravlju.

**Materijali i metode:** Ovo prospektivno, dvostruko slijepo, paralelno randomizirano kliničko ispitivanje provedeno je pomoću analize bukalnog mikronukleusnog citoma (BMCyt analiza). Četrdeset i jedan ispitanik nasumično je raspoređen u dvije skupine. Svi su ispitanici koristili iste vrste pasta za zube 12 tjedana, dizajniranih izričito za ovu studiju (bez fluorida, 1050 ppm NaF, odnosno 1450 ppm NaF; svaka kroz 4 tjedna). Istovremeno, tijekom tri mjeseca istraživanja, jedna skupina koristila je tekućini za ispiranje usta s fluoridom (450 ppm NaF), a druga bez fluorida. Uzorak bukalne sluznice uzet je prije uporabe testiranih proizvoda te nakon 4, 8 i 12 tjedana njihove uporabe. Anketni upitnik o znanjima, stavovima i ponašanju sadržavao je 11 pitanja o znanju, 8 o stavovima i 7 o ponašanju prema oralnom zdravlju.

**Rezultati:** Učestalost mikronukleusa i većina drugih bodovanih parametara iz BMCyt testa nije pokazala statistički značajne razlike unutar i između ispitivanih skupina. Uspoređujući dvije skupine, samo je statistički značajno povećanje broja stanica s jezgrinim pupoljcima ( $p = 0,048$ ) i karioreksom ( $p = 0,020$ ) nakon 4 tjedna korištenja primijećeno u skupini koja je koristila tekućinu za ispiranje usta s fluoridom. Znanja, stavovi i ponašanje prema oralnom zdravlju također ne pokazuju značajnija odstupanja od točnih odgovora i pozitivnog stava te ponašanja, a za bolje riješen upitnik o znanjima, stavovima i ponašanju prema oralnom zdravlju značajni negativni prediktori su iznadprosječni socio-ekonomski status (OR = 0,023; 95 % CI 0,0007 - 0,794;  $p = 0,036$ ) i visoka stručna sprema (OR = 0,010; 95 % CI 0,0002 - 0,515;  $p = 0,021$ ).

**Zaključak:** Na temelju rezultata može se zaključiti da istovremena primjena fluoridirane zubne paste i fluoridirane tekućine za usta ne dovodi do citotoksičnog i genotoksičnog oštećenja stanica bukalne sluznice. Na broj stanica s kariolizom utječe konzumacija mesa, a na broj stanica s karioreksom utječe muški spol. Za bolje riješen upitnik o znanjima, stavovima i ponašanju prema oralnom zdravlju značajni negativni prediktori su iznadprosječni socio - ekonomski status i visoka stručna sprema.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Assessment of cellular damage to the buccal cells of the oral cavity caused by fluoride

**Objectives:** The main objective is to evaluate the potential cytotoxic and genotoxic effect of the combined use of fluoridated toothpastes and mouthwashes with fluoride by measuring the occurrence of micronuclei and other nuclear anomalies in the cells of the buccal mucosa using the micronucleus test. Secondary objectives are to assess the potential cytotoxic and genotoxic effect of toothpastes with different concentrations of fluoride on the occurrence of micronuclei and other nuclear anomalies in the cells of the buccal mucosa using the micronucleus test, and to examine the knowledge, attitudes and behavior towards the oral health.

**Materials and methods:** This prospective, double-blinded parallel randomized clinical trial was conducted using a buccal micronucleus cytome assay (BMCyt assay). Forty-one participants were randomly assigned to the two groups. All participants have been using the same kinds of toothpaste for 12 weeks, designed explicitly for this study (non-fluoride, 1050 ppm NaF, and 1450 ppm NaF each for four weeks, respectively). Simultaneously, during the three months of the research, one group used mouthwash with fluoride (450 ppm NaF) and another without fluoride. The buccal mucosal sampling was taken before using the tested products and after 4, 8, and 12 weeks of their use. The survey questionnaire on knowledge, attitudes and behavior had 11 questions on knowledge, 8 on attitudes and 7 on behavior towards oral health.

**Results:** The frequency of micronuclei and the majority of other scored end-points from the BMCyt assay showed no statistically significant differences within and between the studied groups. Comparing two groups only statistically significant increase in the number of cells with nuclear buds ( $p = 0,048$ ) and karyorrhexis ( $p = 0,020$ ) at four weeks of usage were observed in the group that used mouthwash with fluoride. Knowledge, attitudes and behavior towards the oral health also does not show significant deviations from correct answers and positive attitude and behavior, and for the better-solved questionnaire on knowledge, attitudes and behavior towards oral health, significant negative predictors are above-average socio-economic status (OR = 0,023; 95 % CI 0,0007 - 0,794;  $p = 0,036$ ) and higher education grade (OR = 0,010; 95 % CI 0,0002 - 0,515;  $p = 0,021$ ).

**Conclusion:** Based on the results, it can be concluded that simultaneous application of fluoridated toothpaste and fluoride mouthwash does not lead to cytotoxic or genotoxic damage

in buccal mucosal cells. The number of cells with karyolysis is affected by meat consumption, and the number of cells with karyorrhexis is affected by male gender. For the better-solved questionnaire on knowledge, attitudes and behavior towards oral health, significant negative predictors are above-average socio-economic status and high professional education.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODATCI**

**Ime i prezime:** Ema Puizina Mladinić

**Elektronička pošta:** e.puizina@gmail.com

**Datum i mjesto rođenja:** 9.3.1992., Split

## **IZOBRAZBA**

- 2006. – 2010. Opća gimnazija „Vladimir Nazor“
- 2010. – 2016. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
- Rujan 2013. – studentska razmjena, Odjel za kirurgiju, Sveučilišna bolnica „St. George“, Plovdiv, Bugarska
- Kolovoz 2014. – studentska razmjena, Odjel za kirurgiju, Schreiber Klinik, Munchen, Njemačka
- Rujan 2016. – studentska razmjena, Odjel za internu medicinu, bolnica San Rafael, Cadiz, Španjolska
- 2016. – 2021. Doktorska škola „Klinička medicina utemeljena na dokazima“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- Svibanj 2019. – stručno usavršavanje na Odjelu za maksilofacijalnu i oralnu kirurgiju, Landeskrankenhaus Feldkirch, Austrija

## **RADNO ISKUSTVO**

- 2016. – 2017. – pripravnički staž, doktorica medicine, KBC Split
- 2017. - 2018. – doktorica medicine, Zavod za hitnu medicinu, ispostava Blato na Korčuli i liječnica obiteljske medicine u Čari, O. Korčula
- 2018. – danas – specijalizantica maksilofacijalne kirurgije, KBC Split

## **STRANI JEZICI**

- Engleski, razina C

- Njemački jezik, razina C

## **OSTALE AKTIVNOSTI**

- Predsjednica Udruge studenata medicine CroMSIC, 2014. – 2016.
- Rektorova Nagrade za izvrsnost u akademskoj godini 2015./2016.
- Predsjednica Rotaract kluba Split, 2019. – 2020.
- Članica Hrvatskog društva za maksilofacijalnu kirurgiju, Hrvatskog društva za estetsku medicinu i Europskog udruženja kraniomaksilofacijalne kirurgije

## **PUBLIKACIJE**

1. Pogorelić Z, Puizina E, Jukic M, Mestrovic M, Pintaric I, Furlan D. Arthroscopic Management of Meniscal Injuries in Adolescents: Outside-in Suturing versus Meniscal Dart Technique. *Acta Clinica Croatica*, 2020;593; 431-438.
2. Duplancic R, Poklepović Pericic T, Vladislavić Zorica N, Puizina E, Gavic, L.. Metode prevencije zubnog karijesa - Prevencija u dentalnoj medicini. Tadin A, Gavic L (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2021. 45-80.
3. Radovic M, Gavic L, Jerkovic D, Zeljezic D, Puizina J, Srzentic I, Puizina Mladinic E, Tadin A. Clinical Prospective Assessment of Genotoxic Effects of Dental Implants in Gingival Epithelial Cells. *Acta Stomatol Croat.* 2022 Sep;56(3):222-234.
4. Puizina Mladinic E, Puizina J, Gavic L, Tadin A. Clinical Prospective Assessment of Genotoxic and Cytotoxic Effects of Fluoride Toothpaste and Mouthwash in Buccal Mucosal Cells. *Biomedicines.* 2022 Sep 6;10(9):2206.
5. Martinovic D, Lupi-Ferandin S, Tokic D, Usljebrka M, Rados A, Pojatina A, Kadic S, Puizina E, Mihovilovic A, Kumric M, Vilovic M, Leskur D, Bozic J. Objective Skin Quality Assessment after Reconstructive Procedures for Facial Skin Defects. *J Clin Med.* 2022;11(15):4471.
6. Puizina Mladinic E, Jerković D, Ercegovic S. Hybrid lesion of central odontogenic fibroma and central gigantocellular granuloma of the upper jaw - report of the 3rd case in the world.. *Acta Stomatol. Croat.* 2022,56 (4), p433-433.

7. Frka Separovic I, Martinovic D, Lesin A, Puizina Mladinic E, Tokic D, Kumric M, Jurina L, Lupi-Ferandin M, Bukic J, Bozic J. Temporomandibular Disorder Prevalence and Its Association with Lifestyle Habits in Biomedicine Students-A Cross-Sectional Study. *Healthcare (Basel)*. 2023 Aug 11;11(16):2261.
8. Martinovic D, Tokic D, Puizina-Mladinic E, Kadic S, Lesin A, Lupi-Ferandin S, Kumric M, Bozic J. Oromaxillofacial Surgery: Both a Treatment and a Possible Cause of Obstructive Sleep Apnea-A Narrative Review. *Life (Basel)*. 2023 Jan 4;13(1):142.
9. Martinovic D, Tokic D, Puizina Mladinic E, Usljebrka M, Kadic S, Lesin A, Vilovic M, Lupi-Ferandin S, Ercegovic S, Kumric M, Bukic J, Bozic J. Nutritional Management of Patients with Head and Neck Cancer-A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2023 Apr 13;15(8):1864.
10. Mihovilovic A, Dogas Z, Martinovic D, Tokic D, Puizina Mladinic E, Kumric M, Ivkovic N, Vilovic M, Bozic J. Serum Urotensin II Levels Are Elevated in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Biomolecules*. 2023 May 31;13(6):914.



**DODATAK I**

**UPITNIK - O PRIMJENI FLUORIDA U ORALNOM ZDRAVLJU I ORALNO-HIGIJENSKIM NAVIKAMA ISPITANIKA**

**DIO 1. OPĆENITI PODATCI O ISPITANIKU** (*odaberi jednu od ponuđenih opcija osim za dob gdje treba napisati broj godina*)

1. Dob (godine) \_\_\_\_\_
2. Spol      M    Ž
3. Stručna sprema (NSS, SSS, VŠS, VSS, dr. sc i više)
4. Socioekonomski status (iznad prosjeka/ prosječno / ispod prosjeka)
5. Radite li vi ili netko od vaše obitelji radi u ordinaciji dentalne medicine (DA/ NE)

**DIO 2. Znanja o oralnom zdravlju – odaberite jedan odgovor za koji smatrate da je točan.**

|     |   |    |    |         |
|-----|---|----|----|---------|
| 1.  | Postoje dvije postavbe zubi koje se izmjene tijekom života.                                 | Da | Ne | Ne znam |
| 2.  | Upala zuba može uzrokovati krvarenje desni.   | Da | Ne | Ne znam |
| 3.  | Nadoknada izgubljenog zuba može popraviti oralnu higijenu                                   | Da | Ne | Ne znam |
| 4.  | Karijes mliječnih zubi se NE treba liječiti   | Da | Ne | Ne znam |
| 5.  | Bakterije su jedan od razloga problema s desnama.   | Da | Ne | Ne znam |
| 6.  | Gazirana pića loše utječu na zube.  | Da | Ne | Ne znam |
| 7.  | Gubitak zubi može utjecati na govor.  | Da | Ne | Ne znam |
| 8.  | Zub koji je na krivom mjestu se može pomaknuti na ispravno mjesto uz stomatološku terapiju. | Da | Ne | Ne znam |
| 9.  | Zubi zahvaćeni karijesom mogu utjecati na izgled osobe.                                     | Da | Ne | Ne znam |
| 10. | Pušenje ili žvakanje duhana može uzrokovati karcinom usne šupljine.                         | Da | Ne | Ne znam |
| 11. | Bijele naslage na zubima se nazivaju dentalnim plakom.                                      | Da | Ne | Ne znam |

**DIO 3. Stavovi o oralnom zdravlju – odaberite jedan odgovor za koji smatrate da najbolje odgovara Vašem stavu.**

|    |   |                   |           |               |              |                    |
|----|---|-------------------|-----------|---------------|--------------|--------------------|
| 1. | Četkanje zubi dva puta dnevno poboljšava oralnu higijenu.       | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |
| 2. | Održavanje zubi čistima i zdravima je korisno za naše zdravlje. | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |
| 3. | Nepravilno četkanje zubi može uzrokovati bolest desni.          | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |
| 4. | Slatkiši mogu uzrokovati karijes.                               | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |
| 5. | Pranje zubi sa fluoriranom pastom sprječava nastanak karijesa.  | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |
| 6. | Stomatolozi se brinu samo o liječenju zubi, a ne o prevenciji.  | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |
| 7. | Krvarenje desni ukazuje na upalu gingive (zubnog mesa).         | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |
| 8. | Struganje zubnog korijena je štetno za desni (zubno meso).      | Potpuno se slažem | Slažem se | Neodlučan sam | Ne slažem se | Uopće se ne slažem |

**DIO 4. Ponašanje prema oralnom zdravlju – odaberite jedan odgovor za koji smatrate da je najtočniji za Vas.**

|    |  |       |         |           |            |        |
|----|--|-------|---------|-----------|------------|--------|
| 1. | Pridajem zubima jednaku važnost kao bilo kojem drugom dijelu mojeg tijela. | Nikad | Rijetko | Povremeno | Jako često | Uvijek |
| 2. | Moji zubi su osjetljivi.   | Nikad | Rijetko | Povremeno | Jako često | Uvijek |
| 3. | Perem zube dva puta dnevno.  | Nikad | Rijetko | Povremeno | Jako često | Uvijek |
| 4. | Koristim zube da bi otvorio bocu pića.                                     | Nikad | Rijetko | Povremeno | Jako često | Uvijek |
| 5. | Osjećam bol u zubima dok žvačem hranu.                                     | Nikad | Rijetko | Povremeno | Jako često | Uvijek |
| 6. | Krvare mi desni dok perem zube.  | Nikad | Rijetko | Povremeno | Jako često | Uvijek |
| 7. | Idem na rutinske stomatološke kontrole.                                    | Nikad | Rijetko | Povremeno | Jako često | Uvijek |