

Procjena citotoksičnog i genotoksičnog učinka pasta za izbjeljivanje na stanicama oralne sluznice

Žeravica, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:171:392523>

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

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



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Žeravica

**PROCJENA CITOTOKSIČNOG I GENOTOKSIČNOG UČINKA PASTA ZA
IZBJELJIVANJE NA STANICAMA ORALNE SLUZNICE**

Diplomski rad

Akadska godina: 2015. / 2016.

Mentorica: dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.

Split, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Žeravica

**PROCJENA CITOTOKSIČNOG I GENOTOKSIČNOG UČINKA PASTA ZA
IZBJELJIVANJE NA STANICAMA ORALNE SLUZNICE**

Diplomski rad

Akadska godina: 2015. / 2016.

Mentorica: dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.

Split, srpanj 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Biokompatibilnost dentalnih materijala	2
1.2. Test za procjenu biokompatibilnosti – Mikronukleus test	3
1.3. Zubne paste	7
1.3.1. Zubne paste za tretman i prevenciju karijesa	7
1.3.2. Zubne paste za tretman i prevenciju parodontalnih bolesti.....	9
1.3.3. Zubne paste za tretman osjetljivih zuba	9
1.3.4. Zubne paste za izbjeljivanje	10
1.3.5. Zubne paste sa specifičnom svrhom	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	15
3.2. Ispitanici	17
3.3. Uzorkovanje stanica	17
3.4. Mikronukleus test	18
3.5. Statistička obrada podataka	19
4. REZULTATI	20
5. RASPRAVA	35
6. ZAKLJUČCI	40
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	42
8. SAŽETAK	47
9. SUMMARY	49
10. ŽIVOTOPIS	51

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem mojoj mentorici i uzoru dr. sc. Antoniji Tadin na neizmjernej potpori, strpljenju, pomoći, utrošenom vremenu i stručnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala svim ispitanicima, mojim prijateljima i kolegama, koji su sudjelovali u ovom radu i bili mi potpora do samoga kraja.

Hvala tvrtki Saponia d.d. Osijek na suradnji i pomoći koju su mi pružili.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj obitelji, mojoj sestri, bratu i roditeljima, koji su uvijek bili uz mene, vjerovali u mene, pružali mi neizmjernu potporu i razumijevanje. Moj uspjeh je vaš uspjeh i ovaj rad posvećujem vama.

1. UVOD

1.1. Biokompatibilnost dentalnih materijala

Biokompatibilnost je opisana kao sposobnost materijala da postigne odgovarajući odgovor domaćina u odnosu na konkretnu svrhu. Racionalno je da je ključni problem testiranje biološkog potencijala novih dentalnih materijala prije njihove upotrebe u kontaktu s tijelom (1). Idealno, dentalni materijal koji će se koristiti u usnoj šupljini, trebao bi biti bezopasan za sva oralna tkiva, gingivu, oralnu sluznicu, pulpu i kost. Nadalje, ne bi trebao sadržavati toksične, topive i raspršive tvari koje mogu biti apsorbirane u krvožilni sustav, uzrokujući sustavni odgovor, uključujući teratogene ili kancerogene efekte. Materijal bi također, trebao biti bez agensa koji mogu izazvati senzibilizaciju ili alergijski odgovor kod senzibiliziranog pacijenta (2). Testovi za potvrdu biokompatibilnosti slijede ISO standard i odvijaju se u 3 glavne skupine: (a) primarni test (citotoksičnost, sustavna toksičnost, mutagenost); (b) sekundarni test (senzibilizacija, test implantacije, iritacija oralne sluznice); (c) pretklinički test (3).

Primarni *in vitro* testovi ocjenjuju svojstva materijal direktno u kulturi stanica koje reagiraju na učinke eksperimentalnih materijala, dok oni sekundarni izvode se *in vivo* te se temelje na implantaciji materijala u potkožna ili intramuskularna područja u štakora i/ili kunića i ostalih životinja pri čemu se procjenjuje tkivni odgovor na implantirani materijal nakon određenog razdoblja. Nakon što je materijal uspješno prošao gore navedene testove, trebao bi biti testiran na ljudima gdje se procjenjuje njegova učinkovitost te povoljne ili nepovoljne reakcije koje se mogu pojaviti u normalnim kliničkim uvjetima (4).

Biokompatibilnost materijala očituje se kroz parametre citotoksičnosti, genotoksičnosti, kancerogenosti, mutagenosti i imunogenosti.

Citotoksičnost se odnosi na oštećenje pojedine stanice, primjerice u kulturama stanica te predstavlja održivost staničnog života. Različite metode i parametri koji se koriste u određivanju citotoksičnosti mogu se svrstati u sljedeće kategorije ocjenjivanja: (a) ocjenjivanje oštećenja stanica po morfološkim osobinama, (b) mjerenje oštećenja stanica, (c) mjerenje rasta stanica i (d) mjerenje specifičnih aspekata staničnog metabolizma (4-6).

Genotoksičnost se opisuje kao štetni učinak na genomski materijal, a može biti izazvana oštećenjem DNK bez direktnog dokaza za mutacije (7). Prijenos genetske štete na sljedeće generacije stanica može se izbjeći programiranom smrću stanice (apoptoza). U slučaju da je došlo do prijelaza genetske ozljede na sljedeću generaciju govorimo o mutagenosti.

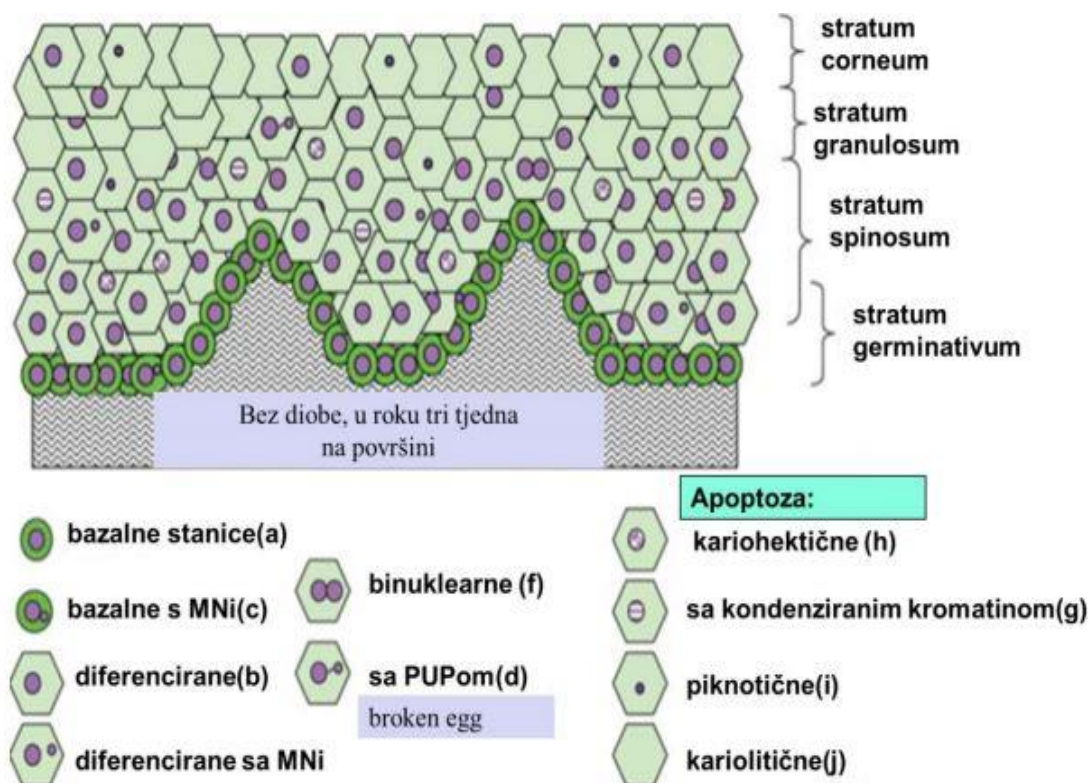
Mutagenost nam služi kao pokazatelj "moguće" kancerogenosti tvari koja je oštetila DNK. Nekoliko mutacija može dovesti do kancerogenosti, dok pojam imunogenost označava sposobnost tvari da izazove imunološki odgovor (8).

1.2. Test za procjenu biokompatibilnosti - Mikronukleus test

Mikronukleus test je test koji otkriva gubitak kromosoma ili oštećenje diobenog vretena uzrokovanih aneugenicim mehanizmima (9). Ova metoda se temelji na sljedećim principima i zapažanjima: u anafazi acentrična kromatida i kromosomski fragmenti počinju zaostajati kada se centrični elementi kreću prema polovima vretena. Nakon telofaze neoštećeni kromosomi, kao i centrični fragmenti, dovode do redovne kćeri nukleusa. Zaostajući su elementi, također, uključeni u stanice kćeri, ali značajan se udio transformira u jednog ili nekoliko sekundarnih nukleusa, koji su, u pravilu, znatno manji od glavnog nukleusa i stoga se nazivaju mikronukleusi (10). Dakle, mikronukleusi su fragmenti ili cijeli kromosomi koji nisu dosegli polove diobenog vretena tijekom mitoze i ostali su inkapsulirani u telofazi u odvojenom nukleusu (9).

Bukalne stanice čine prvu barijeru za inhalacijski i ingestijski put i sposobne su metabolizirati najbliže kancerogene i reaktivne produkte. Oko 92 % ljudskih novotvorina su dobivene iz vanjskog i unutarnjeg epitela, odnosno kože, bronhalnog epitela i epitela kojim je obložen probavni kanal. Dakle, moglo bi se tvrditi da oralne epitelne stanice predstavljaju ciljno mjesto za prijevremene genotoksične događaje izazvane kancerogenim agensima koji ulaze u tijelo disanjem ili ingestijom (9).

Oralni se epitel sastoji od 4 sloja strukturne, progenitorske i maturacijske populacije stanica - bazalnog sloja (*stratum germinativum*), trnastog sloja (*stratum spinosum*), zrnatog sloja (*stratum granulosum*) i keratiniziranog sloja na površini (*stratum corneum*) (Slika 1.). Niz prstolikih struktura, nazvanih „zupci pile“, projiciraju se iz *lamine propriae* u epidermalni sloj i tvore valoviti efekt bazalnog sloja. Oralni se epitel održava kontinuiranom obnovom stanica, čime nove stanice, proizvedene u bazalnom sloju pomoću mitoze, migriraju na površinu i zamjenjuju one koje su odbačene. Bazalni sloj sadrži matične stanice koje mogu izraziti genetska oštećenja (gubitak ili lom kromosoma) kao mikronukleuse tijekom podjele nukleusa. Stanice kćeri, koje mogu i ne moraju sadržavati mikronukleuse, na kraju se diferenciraju u trnasti sloj stanica i keratinizirani površinski sloj i zatim se odljušte u usnu šupljinu (9).

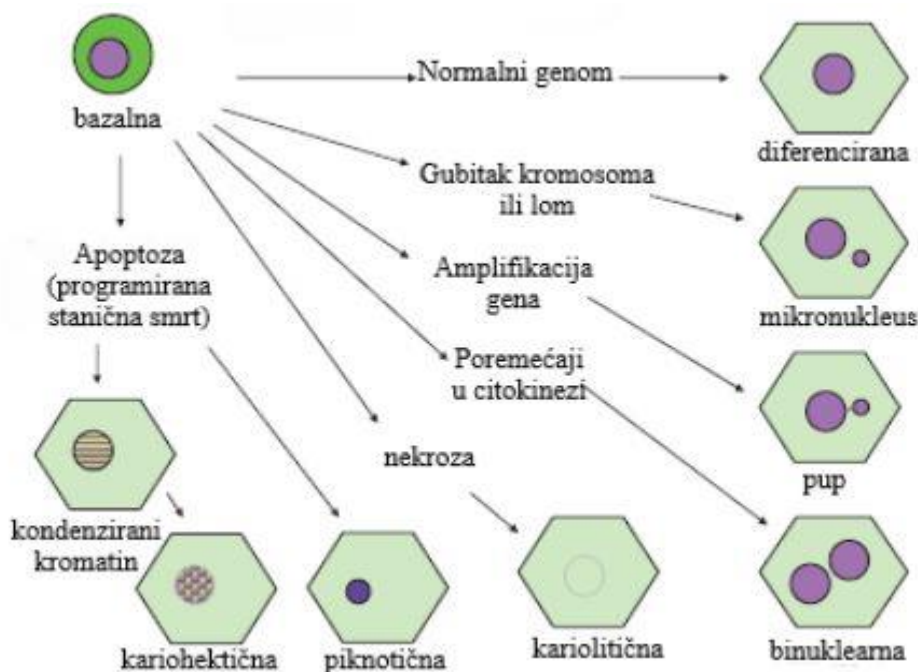


Slika 1. Prikaz poprečnog presjeka slojeva u kojima se nalaze bukalne stanice. Preuzeto iz: (9).

Neke se od tih stanica mogu preobraziti u:

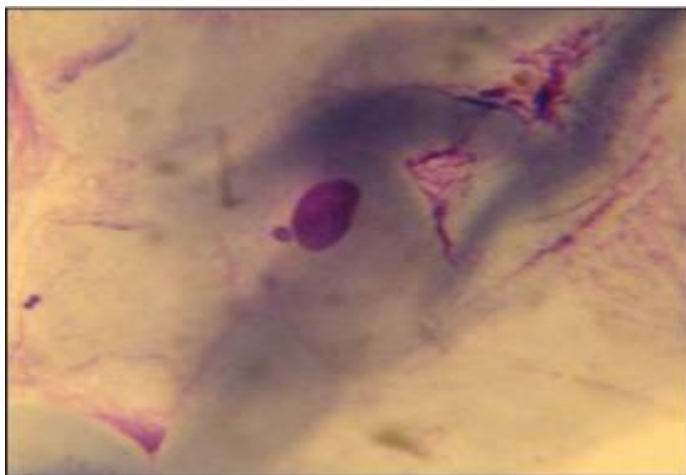
- stanice s kondenziranim kromatinom koje predstavljaju fazu apoptoze, u kojoj se događa brza proteoliza proteina nuklearnog matriksa,
- stanice s fragmentiranim nukleusom (karioreksne stanice) koje su tipične u kasnoj fazi apoptoze,
- stanice sa malim ili skupljenim nukleusom s dijametrom otprilike 1/3 normalne stanice (piknotičke stanice),
- stanice koje su kompletno izgubile nukleusni materijal (kariolitične stanice), koje se nalaze u uznapređenoj fazi nekroze i apoptoze,
- stanice koje su blokirane u binuklearnoj fazi u kojima imamo prisutnost dva nukleusa slične veličine, intenziteta bojenja i nalaze se u neposrednoj blizini ili se dodiruju,
- stanice koje mogu pokazivati nuklearne pupove (poznate kao „slomljena jaja“ u bukalnim stanicama) koji su biomarkeri amplifikacije gena te su iste teksture i intenziteta bojenja kao glavni nukleus i spojeni su s njim nukleoplazmično vezom, ali imaju manji dijametar od glavnog nukleusa (9).

Ovi biomarkeri genomskog oštećenja (npr. mikronukleusi, nuklearni pupovi) i stanične smrti (npr. apoptoza, karioliza) mogu se uočiti kako u limfocitima, tako i u sustavu bukalnih stanica, te na taj način pružiti bolju sveobuhvatnu procjenu genomskog oštećenja u odnosu na mikronukleuse u kontekstu citotoksičnog i citostatičnog efekta (Slika 2.) (9, 11).



Slika 2. Prikaz različitih tipova stanica koje se mjere u mikronukleus testu. Preuzeto iz: (12).

Nekoliko čimbenika koji utječu na mikronukleuse u bukalnim stanicama uključuju razlike u zbirci stanica (vrijeme i sredstva koja se koriste), tehnike fiksiranja i bojenja, odabir i broj stanica, kriterij bodovanja i ostale anomalije nukleusa u normalnim i promijenjenim stanicama. Citološke su se četkice pokazale kao najučinkovitije za prikupljanje stanica. Korištene su brojne metode bojenja, među njima je preferirana DNK specifična boja za bojenje nukleusa, mikronukleusa i ostalih anomalija nukleusa u odljuštenim bukalnim stanicama. Feulgen–Fast Green bojenje omiljeno je od strane mnogih istraživača zbog svoje DNK specifičnosti i jasnog transparentnog izgleda citoplazme, što omogućava jednostavnu identifikaciju mikronukleusa. Ostale boje uključuju fluorescentne boje, diamidino2-fenilindol DAPI, akridin narančaste, Hoechst, propidij jodid i May–Grunwald Giemsa (Giemsa) boje (Slika 3.) (9).



Slika 3. Fotomikrografija koja prikazuje mikronukleus s May-Grunwald Giemsinom (Giemsinom) bojom. Preuzeto iz: (9).

Formacija stanica s karioreksom, kariolizom, binukleusima i kondenziranim kromatinom teška je za interpretaciju i može se klasificirati kao mikronukleusi s nespecifičnom bojom. Drugi je mogući zbunjujući faktor u studiji mikronukleusa formacija granula keratina koja se nalaze u promijenjenim stanicama s anomalijama nukleusa (9).

Tolbert i suradnici (9) razvili su kriterije za odabir stanica i oni se najčešće primjenjuju. Sastoje se od sljedećih parametara:

1. netaknuta citoplazma i relativno ravan položaj stanica na stakalcu,
2. malo ili bez preklapanja sa susjednim stanicama,
3. s malo ili bez debrisa,
4. nukleus normalan i netaknut, nuklearan obujam gladak i izrazit.

Predloženi su kriteriji za identifikaciju mikronukleusa kako slijedi: (a) zaobljen, gladak obujam koji ukazuje na membranu; (b) manje od jedne trećine promjera pripadajućeg nukleusa, ali dovoljno velik da se razluči oblik i boja; (c) Feulgen pozitivan, odnosno ružičasto osvjetljenje širokog polja; (d) intenzitet bojanja sličan onom od nukleusa; (e) tekstura slična onoj od nukleusa; (f) ista žarišna ravnina kao od nukleusa; (g) odsutnost preklapanja s nukleusom. Također su preporučili bodovanje od najmanje 1000 stanica, s povećanjem na 2000-3000, ako je manje od 5 mikronuklearnih stanica zabilježeno nakon prebrojavanja navedenih 1000 stanica (9).

1.3. Zubne paste

Zubne su paste proizvodi za dnevnu brigu o oralnoj higijeni, kemijskog sastava koji se stalno mijenja zahvaljujući nadmetanju proizvođača. Prepoznate su po najboljem izvoru fluorida, koji najefektivnije štiti mliječne i trajne zube od karijesa. Međutim, fluorid nije jedini aktivni sastojak zubnih pasta. Jednako je važna sposobnost čišćenja zubnim pastama koja je osigurana različitim abrazivima. Antibakterijski učinak se postiže različitim tvarima sa sposobnostima za inhibiranje rasta bakterija u usnoj šupljini, kao i brojnim sastojcima sa specifičnom svrhom za rješavanje specifičnih problema. Široka selekcija zubnih pasta i različiti sastojci stvaraju poteškoće pacijentima za odabir primjerene zubne paste i kompliciraju kupnju zubnih proizvoda i za profesionalce (13).

Zubne paste sadržavaju čvrste abrazivne materijale za čišćenje, tvar za zadržavanje vlage za otapanje drugih sastojaka i sprječavanje isušivanja pripravka, sredstvo za zgušnjavanje radi definiranja reoloških svojstava pripravka, surfaktant za generiranje pjene, aktivne tvari kao što su fluorid, tvari za okus, zaslađivač, sredstva za zamućivanje, boju za karakterističan okus i izgled, pufere i konzervanse za održavanje stabilnosti pripravka (14).

Osnovna klasifikacija zubnih pasta se temelji na svojstvima aktivnih sastojaka. Tako razlikujemo:

1. zubne paste za tretman i prevenciju karijesa,
2. zubne paste za tretman i prevenciju parodontalnih bolesti,
3. zubne paste za tretman osjetljivih zuba,
4. zubne paste za izbjeljivanje zuba,
5. zubne paste sa specifičnom svrhom (13).

1.3.1. Zubne paste za tretman i prevenciju karijesa

Zubne paste korištene kao lokalni izvor fluorida imaju najbolju sposobnost inhibiranja razvoja karijesa (19-27 % redukcija karijesa), omogućavajući remineralizaciju cakline. Rana demineralizacija cakline nije vidljiva ni kliničkim ni radiološkim pregledom. Međutim, na kemijskoj razini propadanje započinje kada se poremeti normalna izmjena minerala i u većini se slučajeva tada pojavi proces demineralizacije. U liječenju takvog ranog propadanja važno je pratiti dva principa: 1) smanjiti etimološki faktor: zubni plak i bakterijski biofilm od kojeg je sastavljen i 2) povećati količinu remineralizacijske tvari – koncentraciju fluorida. Oba se

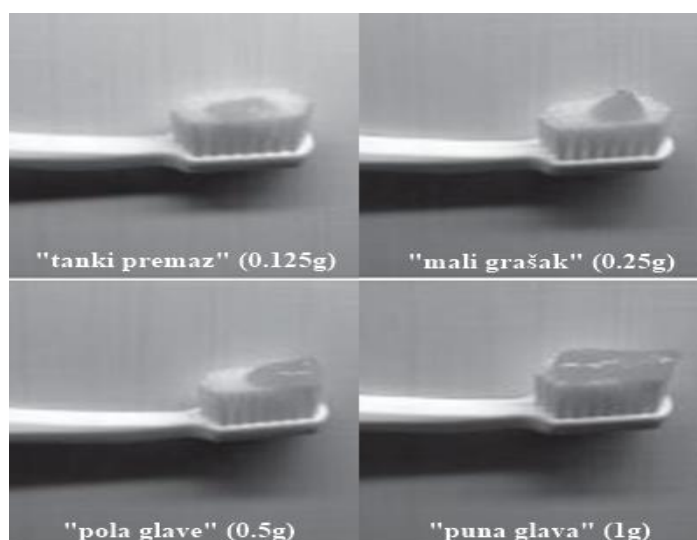
principa mogu postići čišćenjem zubi zubnim pastama koje sadrže fluorid. Primjena fluorida pokazala se kao najučinkovitija u posljednjih 20 godina. Međutim, redovita upotreba fluorida u ranom djetinjstvu povezana je s razvojem fluoroze. Stoga postoje zubne paste s različitom koncentracijom fluorida i dijele se na:

1. zubne paste s koncentracijom do 1000 ppm fluorida

Starija su istraživanja (80.-tih godina prošlog stoljeća) dokazala kako djeca u dobi od 2-5 godina progutaju 30-50 % zubne paste koja je aplicirana na četkicu za zube. U tim istraživanjima gledana je i korelacija između koncentracije fluorida u zubnim pastama i pojavnosti fluoroze na trajnim zubima. Kao rezultat, uslijed rizika od fluoroze, preporučeno je korištenje zubne paste od 500-550 ppm fluorida za djecu.

2. zubne paste s koncentracijom 1000-1500 ppm fluorida

Ove paste su prepoznate kao najefikasniji izvor fluorida. Prema najnovijim istraživanjima djeca u dobi od 2-3 godine progutaju 48 % zubne paste, a djeca u dobi od 6-7 godina progutaju 25 % zubne paste. Kako bi se smanjio rizik nastanka fluoroze, kod najpodložnije skupine (4-6 godina) preporuča se ingestija manja od 0,1 mg (sigurnije je ako je manja od 0,05 mg) F po 1 kg tjelesne mase po danu (Slika 4.). Budući da je dokazano kako je najvažniji direktan kontakt fluorida s caklinom tijekom četkanja zuba i njegova koncentracija tijekom tog kontakta, preporučeno je da mlađa djeca koriste zubne paste s koncentracijom fluorida od 1000 ppm, naravno, uzimajući u obzir količinu prikladnu njihovim godinama.



Slika 4. Prikaz koliko grama F sadrži zubna pasta uzimajući u obzir količinu nanosenu na četkicu za zube. Preuzeto iz: (13).

3. zubne paste s koncentracijom 2500-5000 ppm fluorida

Velike koncentracije fluorida u zubnim pastama mogu postići smanjenje karijesa do 36 %. *In vitro* istraživanja pokazuju kako zubne paste s povišenom koncentracijom imaju veću sposobnost remineralizacije cakline i dentina od onih s normalnom koncentracijom (13).

1.3.2. Zubne paste za tretman i prevenciju parodontalnih bolesti

Uzrok gingivitisa i parodontitisa su bakterije u zubnom plaku. Stoga postoje dva glavna pravila za prevenciju ovih bolesti: 1. redovno uklanjanje plaka, čime preveniramo rast bakterija u biofilmu i 2. prevencija rasta bakterija, čime inhibiramo formaciju plaka. Prvo pravilo je osigurano mehaničkim čišćenjem zuba, ali kako bi prevenirali rast bakterija, proizvođači su dodali različite antiseptičke i antibakterijske tvari u zubne paste poput triklosana, klorheksidina, hidrogen peroksida, sode bikarbone, povidon jodida, cink citrata i ostalih. Ova skupina zubnih pasta može sadržavati ili sintetičke antiseptičke i antibakterijske tvari (triklosan, klorheksidin) ili prirodne ekstrakte biljaka, esencijalna ulja, enzime i vitamine, koji pokazuju sličan antibakterijski efekt kao kod onih zubnih pasta koje sadrže klorheksidin (13).

1.3.3. Zubne paste za tretman osjetljivih zuba

Ove zubne paste se dijele na:

1. zubne paste s analgetikom koje sadrže kalijeve soli koje održavaju visoku razinu ekstracelularnog K^+ , čime se prevenira repolarizacija živčane membrane stanice i inhibira transmisija impulsa, bez promjena na pulpi. Zubne paste koje sadrže 5 % ili 10 % kalij nitrata mogu smanjiti osjetljivost zuba kroz 4 tjedna, te

2. zubne paste koje blokiraju dentinske tubuluse, a koje sadrže spojeve fluorida, koji omogućavaju remineralizaciju te povećavaju otpornost dentina na kiseline. Stvoreno taloženje spojeva fluorida blokira dentinske tubuluse. Kositreni fluorid posjeduje sposobnost blokiranja tubulusa, stvarajući SnF_2 i CaF_2 i sposobnost formiranja protektivnog sloja na površini zuba pomoću reakcije Sn^{+2} iona sa natrijevim, kalcijevim i fosfatnim spojevima, stvarajući Sn – Na heksametafosfat. Dokazano je kako se povećanjem koncentracije fluoridnih iona u caklini povećava mikrotvrdoća cakline. Dodavanjem kalcijevih i fosfatnih iona dolazi do spajanja s fluoridnim ionima na površini cakline i stvara se amorfnu kalcijev fosfat, koji, uz blokiranje tubulusa, zaglađuje površinu zuba. Time se postiže još efikasnija redukcija osjetljivosti (13).

1.3.4. Zubne paste za izbjeljivanje

Proizvođači proizvoda za oralnu higijenu svjesni su nezadovoljstva potrošača bojom njihovih zuba te su kao odgovor razvili velik izbor suvremenih zubnih pasta za rješavanje tog problema. Glavna uloga ovih zubnih pasta i dalje ostaje uklanjanje plaka, bilo mehanički ili kemijski, zbog čega se većina sastoji od istih osnovnih funkcionalnih sastojaka. Općenito, zubne paste koje su specifično formulirane za izbjeljivanje zuba, pružaju pogodnost uklanjanja i prevencije stvaranja vanjskih pigmentacija (13, 14). Vanjske se pigmentacije mogu smanjiti dodavanjem raznih kemikalija u zubne paste. Većina molekula pigmentacije uključena je u pelikulu koja sadrži protein. Zbog toga enzimi, poput proteaze i papaina, stvaraju efekt izbjeljivanja. Ovo utječe na sve površine zuba na koje dopire zubna pasta, uključujući aproksimalne površine zuba i one u blizini gingive do kojih je teško doprijeti četkicom za zube. Kako bi se povećala djelotvornost čišćenja i izbjeljivanja zuba, zubne paste znaju sadržavati: vodikov peroksid, karbamid-peroksid, natrijev bikarbonat, hidratizirani silicijev dioksid, aluminijski oksid, citrat, heksametafosfat te pirofosfat (natrij pirofosfat, natrij tripolifosfat), koji se povezuju s caklinom, dentinom i upijaju molekule pigmentacije, stvarajući efekt izbjeljivanja (6, 13).

Osim tvari za izbjeljivanje, abrazivi, prisutni u zubnim pastama, također mogu promovirati izbjeljivanje. Abrazivi su jedan od glavnih funkcionalnih sastojaka zubnih pasta za izbjeljivanje. Općenito, abrazivi promiču efektivno uklanjanje vanjskih pigmentacija (pigmentacija od kave, cigareta i ostalog) i pomažu prevenciji nastajanja novih pigmentacija na površini zuba (6). Međutim, proces čišćenja imaće utjecaja ovisno o tvrdoći, veličini, obliku, koncentraciji čestica i pritisku korištenom prilikom četkanja zuba. Uobičajeno, takve zubne paste imaju srednju (RDA 60-100) ili visoku (RDA >100) abrazivnost. Najčešće korišteni abrazivi su: silicij dioksid, kalcij karbonat, kalcij fosfat di-hidrat, kalcij pirofosfat, aluminijski oksid, perlit (70-75 % silicij dioksid) i natrij bikarbonat, koji, zajedno sa čekinjama zubne četkice, uklanjaju vanjski obojeni plak, ali ne mijenjaju boju zuba. Problem je što su abrazivne tvari efikasne samo na mjestima gdje čekinje zubne četkice mogu doprijeti. Zbog toga je efekt vrlo blag na aproksimalnim površinama zuba i u blizini gingive, kao i kod zbijenih zuba (13).

Ove zubne paste mogu ispolirati strukturu zuba umjesto promoviranja dubokog izbjeljivanja, poput onoga koje se postiže postupcima koje obavljaju doktori dentalne medicine. Prema tome, vjeruje se da takve zubne paste mogu proizvesti promjene u

topografiji cakline zuba zbog povećane abrazivnosti, uzrokujući štetu za tvrda i meka tkiva. Te se paste učestalo koriste u svakodnevnom životu. Budući da dolaze u kontakt s oralnim tkivima tijekom četkanja, evaluacija biokompatibilnosti tih zubnih pasta od osobite je važnosti (6).

1.3.5. Zubne paste sa specifičnom svrhom

Neki proizvođači tvrde da su proizveli zubne paste za tretman specifičnih stanja i takvi proizvodi ne spadaju u prethodno spomenute klasifikacijske skupine. Zubne paste koje sadrže maslinovo ulje, betain i ksilitol mogu stimulirati sekreciju sline u mirovanju, povećavajući tako osnovnu brzinu sekrecije sline. U slučaju kserostomije, mukozna membrana je osjetljivija i ranjivija, stoga bi se trebale izbjegavati iritirajuće zubne paste, poput onih koje sadrže snažna esencijalna ulja i pjenušave tvari. Antioksidansi i enzimi poput laktoperoksidaze, lizozima, laktoferina i glikosiloksidaze preporučljivi su. Oni osiguravaju funkciju žlijezda slinovnica. Drugi primjer zubnih pasta koje rješavaju specifične probleme su antivirusni proizvodi. Dokazano je kako larifan može pokrenuti prirodni imunološki odgovor tijela, pružajući antivirusnu i imunomodulatorsku aktivnost te inhibirati proboj i rast patogenih bakterija. Budući da je oralna mukoza podložna infekcijama, redovita uporaba zubnih pasta koje sadržavaju larifan može spriječiti stvaranje i progresiju upale uzrokovane virusima i bakterijama. Ovo može biti efikasna prevencija i liječenje stomatitisa (osobito herpetičnog), gingivitisa i parodontitisa (13).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je bilo usmjereno na ispitivanje utjecaja široko dostupnih zubnih pasta s hrvatskog tržišta na stanice usne šupljine.

Glavna svrha ovog istraživanja bila je procjena u kojoj su mjeri zubne paste bez i s učinkom izbjeljivanja biokompatibilne i sigurne za svakodnevno korištenje kroz parametre citotoksičnosti i genotoksičnosti. Primjenom mikronukleus testa pratio se utjecaj zubnih pasta na stanicama bukalne sluznice ovisno o vremenu koje je prošlo od početka korištenja.

Radne hipoteze:

1. zubne paste bez učinka izbjeljivanja (konvencionalne zubne paste) neće pokazati citotoksičan i genotoksičan učinak na stanicama bukalne sluznice, neovisno o vremenu proteklom od početka korištenja,
2. zubne paste s učinkom izbjeljivanja pokazat će veći citotoksičan i genotoksičan učinak na stanicama bukalne sluznice u odnosu na konvencionalne zubne paste istog proizvođača,
3. genotoksičan i citotoksičan učinak zubnih pasta za izbjeljivanje će rasti sukladno vremenu proteklom od početka korištenja istih.

3. MATERIJALI I METODE

Ovo je istraživanje bilo usmjereno na ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog učinka konvencionalnih zubnih pasta i pasta za izbjeljivanje u *in vivo* uvjetima. Primjenom mikronukleus testa pratio se utjecaj zubnih pasta na humanim bukalnim stanicama, ovisno o vremenu koje je prošlo od početka primjene istih.

Istraživanje se provodilo na Katedri za Restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju integriranog studija Dentalne medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta (Klasa: 003-08/16-03/0001; Ur. br.: 2181-198-03-04-16-0007).

3.1. Materijali

U istraživanju se koristilo šest zubnih pasta, tri konvencionalne zubne paste bez učinka izbjeljivanja Kalodont Pro Care Extra Clean (Saponia d. d., HR), Sensodyne® Fluoride (GlaxoSmithKline, UK) i Colgate® Cavity Protection (Colgate - Palmolive Company, SAD) te tri paste s učinkom izbjeljivanja Kalodont Pro Care Whitening (Saponia d. d., HR), Sensodyne® Whitening (GlaxoSmithKline, UK) i Colgate® Whitening (Colgate - Palmolive Company, SAD). Svojstva su zubnih pasta i njihov sastav kako je navedeno od strane proizvođača prikazana u Tablicama 1, 2 i 3.

Tablica 1. Sastav zubnih pasta Sensodyne® Fluoride i Sensodyne® Whitening prema proizvođaču.

ZUBNA PASTA	PROIZVOĐAČ	AKTIVNI SASTOJCI	INAKTIVNI SASTOJCI	ABRAZIV
Sensodyne® Fluoride	GlaxoSmithKline, UK	Natrij fluorid 1450 ppm	Voda, Sorbitol, Glicerol, Kalijev nitrat, Cocamidopropyl betain, Aroma, Ksantan guma, Natrij saharin, Natrij hidroksid, Sukraloza, Limonen	Hidratizirani silicijev dioksid, Titanij dioksid
Sensodyne® Whitening	GlaxoSmithKline, UK	Natrij fluorid 1400 ppm	Voda, Sorbitol, Glicerol, Kalijev nitrat, Cocamidopropyl betain, Aroma, Ksantan guma, Natrij saharin, Pentanatrij trifosfat, PEG-6, Natrij metil cocoyl taurat	Hidratizirani silicijev dioksid, Titanij dioksid

Tablica 2. Sastav zubnih pasta Colgate® Cavity Protection i Colgate® Whitening prema proizvođaču.

ZUBNA PASTA	PROIZVOĐAČ	AKTIVNI SASTOJCI	INAKTIVNI SASTOJCI	ABRAZIV
Colgate® Cavity Protection	Colgate - Palmolive Company, SAD	Natrij monofluorfosfat at 1000 ppm	Dikalcij fosfat dihidrat, Voda, Sorbitol, Glicerol, Natrij lauril sulfat, Celulozna guma, Aroma, Tetrakalij pirofosfat, Natrij saharin	
Colgate® Whitening	Colgate - Palmolive Company, SAD	Natrij monofluorfosfat at 1450 ppm	Voda, Sorbitol, Natrij lauril sulfat, Aroma, Celulozna guma, Benzil alkohol, Natrij saharin, Cinnamal, Eugenol, Limonen	Kalcij karbonat, Hidratizirani silicijev dioksid, Magnezij aluminij silikat, Natrij karbonat, Natrij bikarbonat

Tablica 3. Sastav zubnih pasta Kalodont Pro Care Extra Clean i Kalodont Pro Care Whitening prema proizvođaču.

ZUBNA PASTA	PROIZVOĐAČ	AKTIVNI SASTOJCI	INAKTIVNI SASTOJCI	ABRAZIV
Kalodont Pro Care Extra Clean	Saponia d.d., HR	Natrij monofluorfosfat at 1000 ppm	Voda, Sorbitol, Dikalcij fosfat, Glicerol, PEG-8, Natrij lauril sulfat, Aroma, Ksantan guma, Cocamidopropyl betain, Natrij saharin, DMDM hidantoin, Limonen, Eugenol, CI 77891	Hidratizirani silicijev dioksid
Kalodont Pro Care Whitening	Saponia d.d., HR	Natrij monofluorfosfat at 1000 ppm	Voda, Sorbitol, Dikalcij fosfat, Glicerol, PEG-8, Pentanatrij trifosfat, Aroma, Natrij lauril sulfat, Dinatrij pirofosfat, Ksantan guma, Cocamidopropyl betain, Natrij saharin, Natrij metilparaben, Limonen, Eugenol, CI 77891	Hidratizirani silicijev dioksid

3.2. Ispitanici

Svaki je ispitanik prije potpisivanja informiranog pristanka i suglasnosti u potpunosti bio upoznat sa svrhom rada. Istraživanje je provedeno na 30 pacijenata, 15 muškaraca i 15 žena, starih između 21-26 godina (srednja dob $23,27 \pm 1,21$). Ispitanici su nasumično podijeljeni u tri brojčano iste skupine (10 svaka), ovisno o korištenim zubnim pastama. U prvoj grupi su se koristile zubne paste Kalodont Pro Care Extra Clean i Kalodont Pro Care Whitening (Saponia d. d., HR), u drugoj su se skupini koristile Sensodyne® Fluoride i Sensodyne® Whitening (GlaxoSmithKline, UK), dok su se u trećoj skupini koristile Colgate® Cavity Protection i Colgate® Whitening (Colgate - Palmolive Company, SAD). Isti ispitanici koristili su kroz period od četiri mjeseca dvije različite zubne paste, svaku u trajanju od dva mjeseca. Prva su dva mjeseca koristili pastu bez učinka izbjeljivanja, a nakon toga iduća dva mjeseca onu s učinkom izbjeljivanja istog proizvođača i sličnog sastava. Paste su se koristile minimalno 2 puta dnevno, ujutro i navečer, u trajanju od 2-3 minute.

Od svakog ispitanika je uzeta detaljna medicinska anamneza. U strukturirani upitnik, predviđen za ovo istraživanje, svi su ispitanici unijeli odgovore na pitanja vezana uz demografske čimbenike (dob, spol itd.), životne navike (pušenje, konzumacija alkohola itd.), osobne čimbenike (zdravstveno stanje, uporaba lijekova, izloženost zračenju) i prehrambene navike. Pojedinci koji su pušili tri ili više cigareta dnevno najmanje godinu dana smatrani su pušačima. Pojedinci koji su trošili dvije ili više jedinica alkohola, tri ili više puta tjedno nisu uključeni u studiju, kao i pacijenti s oralnim lezijama, poviješću malignog oboljenja te oni koji su bili izloženi materijalima koji se koriste u ortodonciji i/ili u mobilnoj i fiksnoj protetici. Kriteriji uključanja su zdravi studenti bez sistemskih oboljenja.

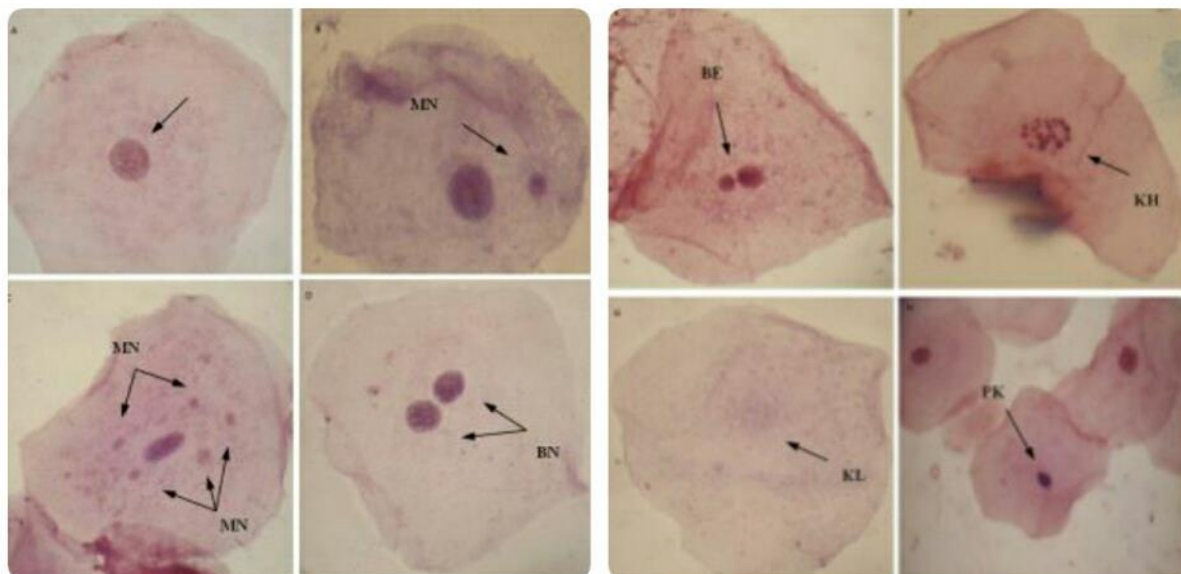
3.3. Uzorkovanje stanica

Uzorci epitelnih stanica skupljeni su kod svakog ispitanika tehnikom četkanja neposredno prije nego su počeli koristiti ispitivane zubne paste te 30, 60, 90 i 120 dana od početka korištenja kombinacije testiranih zubnih pasta (T0 – kontrola prije korištenja ispitivanih zubnih pasta, T1 – mjesec dana od početka korištenja zubne paste bez učinka za izbjeljivanje, T2 – dva mjeseca od početka korištenja zubne paste bez učinka za izbjeljivanje, T3 – mjesec dana od početka korištenja zubne paste s učinkom za izbjeljivanje i T4 – dva mjeseca od početka korištenja zubne paste s učinkom za izbjeljivanje).

Sudionike istraživanja zamolili smo da se jedan sat prije uzorkovanja suzdrže od pušenja, jela te konzumacija alkoholnih pića. Prije uzorkovanja svi su ispitanici tri puta isprali usnu šupljinu vodovodnom vodom, kako bi odstranili odljuštene mrtve stanice. Primjenom citološke četkice (Cytobrush Plus, GmbH, Dietramszell-Linden, Njemačka), nježnim četkanjem bukalne sluznice obostrano, uzet je bris bukalnih stanica, nakon čega su stanice razmazane preko predmetnog stakalca.

3.4. Mikronukleus test

Stanice na predmetnom stakalcu su fiksirane metanolom (80 % v/v) i stakalca su ostavljena da se osuše, nakon čega su obojana s 5% otopinom Giemsa-e u trajanju od 10 minuta, isprana destiliranom vodom i osušena na zraku. Obrada se provela svjetlosnim mikroskopom Olympus CX 40 (Olympus, Tokyo, Japan) pod 400x povećanjem, s time da su svaki mikronukleus i ostale nuklearne anomalije dodatno provjereni pod povećanjem od 1000x. Za svakog ispitanika je analizirano 1000 epitelnih stanica za svako vrijeme uzorkovanja. Učestalost pojavljivanja nuklearnih abnormalnosti, poput binuklearnih stanica, kariolize, kariorekse, mostova i jezgrinih pupoljaka, procijenjena je i kvalificirana prema Tolbert i sur. (9). Da bi se mikronukleus računao kao takav morao je ispuniti sljedeće uvjete: a) morao se sastojati od nuklearnog materijala, b) morao je biti potpuno odvojen od matične jezgre, c) morao je biti manji od 1/3 promjera glavne jezgre, d) morao je biti glatkog, ovalnog ili okruglog oblika, e) morao je biti u istoj ravnini fokusa i f) morao je biti iste boje, teksture i refrakcije kao i glavna jezgra. Stanice s dvije jezgre su smatrane binuklearnim. Nuklearne anomalije, kao što su karioreksa (nuklearni raspad), karioliza (otapanje jezgre), jezgrini pupoljci (prethodnici mikronukleusa) i nukleoplazmatski mostovi (jezgre međusobno spojene mostom) bilježile su se odvojeno (Slika 5.).



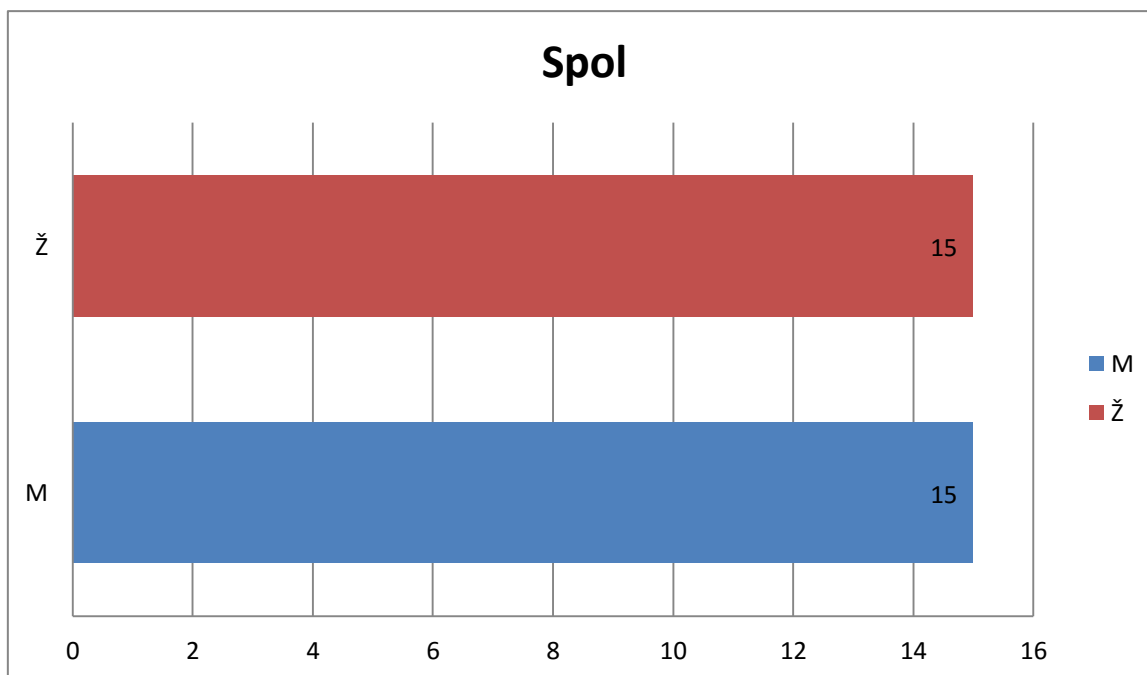
Slika 5. Odljuštene bukalne epitelne stanice pokazuju različite anomalije nukleusa na 1000x (A) normalna stanica; (B) mikronukleus; (C) 5 mikronukleusa; (D) binuklearna stanica; (E) „slomljeno jaje“; (F) karioreksija; (G) karioliza; (H) piknoza. Preuzeto iz: (11).

3.5. Statistička obrada podataka

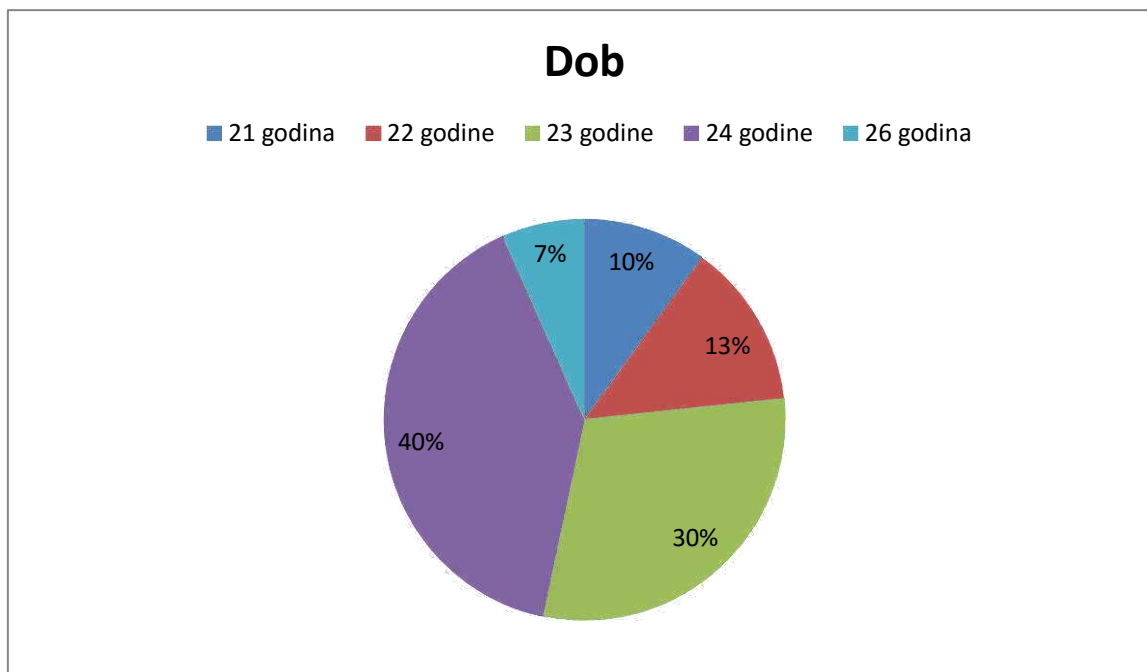
Za statističku obradu podataka korišten je programski paket STATISTICA 13 (Dell Software, Kalifornija, SAD) i Excel, dio programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Deskriptivna je statistika korištena za određivanje osnovnih statističkih parametara (srednje vrijednosti, standardne pogreške, standardne devijacije, medijana te minimalne i maksimalne vrijednosti). Analizom varijance i Student-Newman-Keuls testom utvrđeno je postojanje/nepostojanje statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti za svaki mjereni parametar (mikronukleus, binuklearna stanica, stanica s kondenziranim kromatinom, piknoza, karioliza, karioreksa, pup, most) za pojedine parove testiranih skupina. Doprinos prediktorskih varijabli zavisnim varijablama (mjereni parametri) korišten je napredni regresijski model te višestruka regresijska analiza. U svim je testovima korištena statistička značajnost $p < 0,05$.

4. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo 30 ispitanika, od kojih 15 muškaraca i 15 žena (Slika 6.) u dobi od 21-26 godina (Slika 7.).

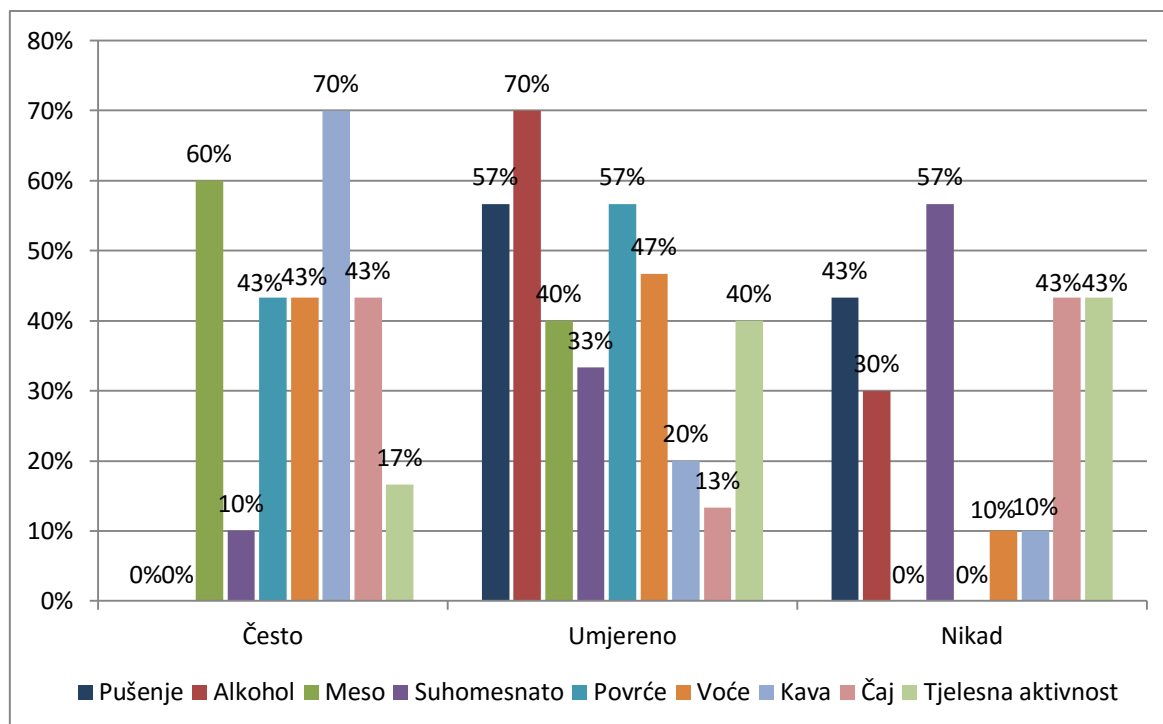


Slika 6. Prikaz broja ispitanika po spolu.

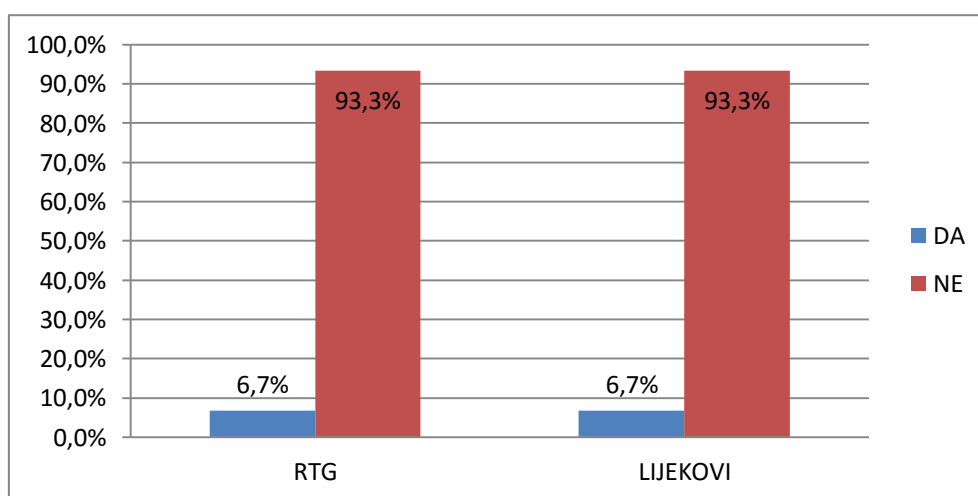


Slika 7. Prikaz ispitanika (n=30) po dobnim skupinama u postotcima.

Pomoću strukturiranog upitnika predviđenog za ovo istraživanje uzeti su podaci o učestalosti (često, umjereno, nikad) životnih navika u ispitanika (n=30), kao što su pušenje, konzumiranje alkohola, prehrambene navike (suhomesnati proizvodi, meso, voće, povrće, kava, čaj) i tjelesna aktivnost (Slika 8.). Osim navedenih podataka, među ispitanicima njih se 93,3 % nije podvrglo RTG snimanjima šest mjeseci prije uzorkovanja stanica bukalne sluznice niti koristilo lijekove (Slika 9.).



Slika 8. Prikaz životnih navika ispitanika (n=30) u postocima.



Slika 9. Prikaz učestalosti RTG pretrage i uzimanja lijekova kod ispitanika (n=30).

Ovisnost mikronukleus testa o svim prediktorskim varijablama prikazana je u Tablici 4. Kao što vidimo u tablici, statistički značajan utjecaj ima tjelesna aktivnosti na pojavnost mikronukelusa ($p=0,041$), konzumacija voća na pojavnost kondenziranog kromatina ($p=0,001$), konzumacija alkohola na pojavnost pupa ($p=0,005$) te pušenje na pojavnost mosta ($p=0,027$) i binuklearnih stanica ($p=0,003$).

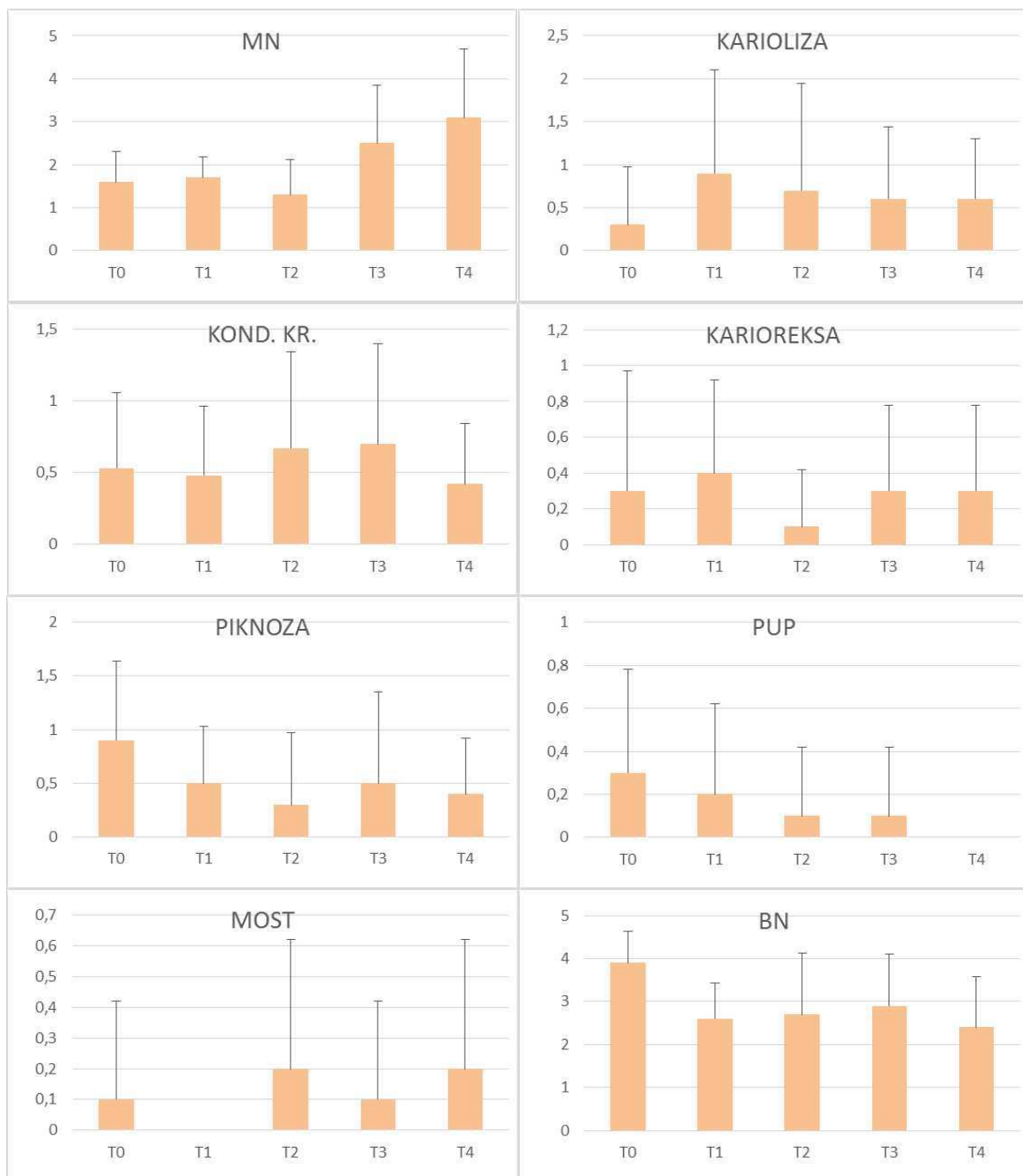
Tablica 4. Prikaz utjecaja spola, dobi, lijekova, RTG-a, životnih navika (pušenje, konzumiranje alkohola, prehrambene navike i tjelesna aktivnost) na parametre mikronukleus testa. *Statistička značajnost ($p<0,05$).

	MN	Karioliza	Konden- zirani kromatin	Karioreksa	Pikno- za	Pup	Most	Binuklea- -rna stanica
Spol	0,848	0,272	0,171	0,804	0,608	0,800	0,405	0,331
Dob	0,354	0,703	0,928	0,962	0,701	0,159	0,576	0,821
Lijekovi	0,878	0,758	0,521	0,947	0,956	0,148	0,101	0,373
RTG	0,818	0,838	0,057	0,947	0,378	0,684	0,101	0,290
Pušenje	0,614	0,767	0,295	0,829	0,106	0,327	0,027*	0,003*
Alkohol	0,365	0,408	0,375	0,327	0,180	0,005*	0,587	0,694
Meso	0,681	0,715	0,425	0,333	0,867	0,836	0,055	0,885
Suhomesnato	0,572	0,819	0,071	0,733	0,997	0,562	0,952	0,408
Povrće	0,339	0,578	0,460	0,973	0,777	0,645	0,081	0,062
Voće	0,919	0,440	0,001*	0,369	0,508	0,294	0,218	0,294
Kava	0,463	0,357	0,802	0,051	0,954	0,962	0,160	0,684
Čaj	0,056	0,584	0,557	0,774	0,755	0,797	0,719	0,948
Tj. aktivnost	0,041*	0,950	0,996	0,418	0,607	0,718	0,739	0,481

Osnovni statistički parametri za zubnu pastu Colgate® prikazani su u Tablici 5. Po parametru srednje vrijednosti razlika između kontrole (0 dana) i nakon 30 dana u kojima je korištena zubna pasta Colgate® Cavity Protection za vrijednosti mikronukleusa imamo povećanje od 6,25 %, dok se nakon 60 dana korištenje iste paste vrijednost mikronukleusa spustila za 23,53 %. Nakon toga počinje korištenje paste Colgate® Whitening nakon čijeg se korištenja u trajanju od 30 dana (ukupni 90. dan od kontrole) vrijednost mikronukleusa u odnosu na 60. dan povećala za 92,3 %, a nakon 60 dana korištenja nastavljeno je povećanje za 24 %. Međutim, nakon analize varijance i Student-Newman-Keuls testa te vrijednosti nemaju statističkog značaja $*p<0,05$.

Tablica 5. Deskriptivna statistika Colgate®. Osnovni statistički parametri za parametre mikronukleus testa prije izloženosti ispitanika zubnim pastama Colgate®, nakon izloženosti ispitanika zubnoj pasti Colgate® Cavity Protection (30 i 60 dana) te nakon toga izloženost ispitanika zubnoj pasti Colgate® Whitening (90 i 120 dana). MN - mikronukleus, BN – binuklearna stanica, X - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija, SP - standardna pogreška, M – medijan.

Vrijeme izloženosti	Statistički parametar	Parametar mikronukleus testa							
		MN	Karioliza	Kondenzirani kromatin	Karioreksa	Piknoza	Pup	Most	BN
0 dana	X	1,60	0,30	0,50	0,30	0,90	0,30	0,10	3,90
	SD	0,70	0,67	0,53	0,67	0,74	0,48	0,32	0,74
	SP	0,22	0,21	0,17	0,21	0,23	0,15	0,10	0,23
	M	1,50	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00	0,00	4,00
	Minimum	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
	Maksimum	3,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	5,00
	30 dana	X	1,70	0,90	0,30	0,40	0,50	0,20	0,00
SD		0,48	1,20	0,48	0,52	0,53	0,42	0,00	0,84
SP		0,15	0,38	0,15	0,16	0,17	0,13	0,00	0,27
M		2,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	2,00
Minimum		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
Maksimum		2,00	3,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	4,00
60 dana		X	1,30	0,70	0,30	0,10	0,30	0,10	0,20
	SD	0,82	1,25	0,67	0,32	0,67	0,32	0,42	1,42
	SP	0,26	0,40	0,21	0,10	0,21	0,10	0,13	0,45
	M	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	3,00	4,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00	5,00
	90 dana	X	2,50	0,60	0,40	0,30	0,50	0,10	0,10
SD		1,35	0,84	0,70	0,48	0,85	0,32	0,32	1,20
SP		0,43	0,27	0,22	0,15	0,27	0,10	0,10	0,38
M		2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
Minimum		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Maksimum		5,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00	5,00
120 dana		X	3,10	0,60	0,20	0,30	0,40	0,00	0,20
	SD	1,60	0,70	0,42	0,48	0,52	0,00	0,42	1,17
	SP	0,50	0,22	0,13	0,15	0,16	0,00	0,13	0,37
	M	3,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50
	Minimum	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	Maksimum	7,00	2,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	4,00

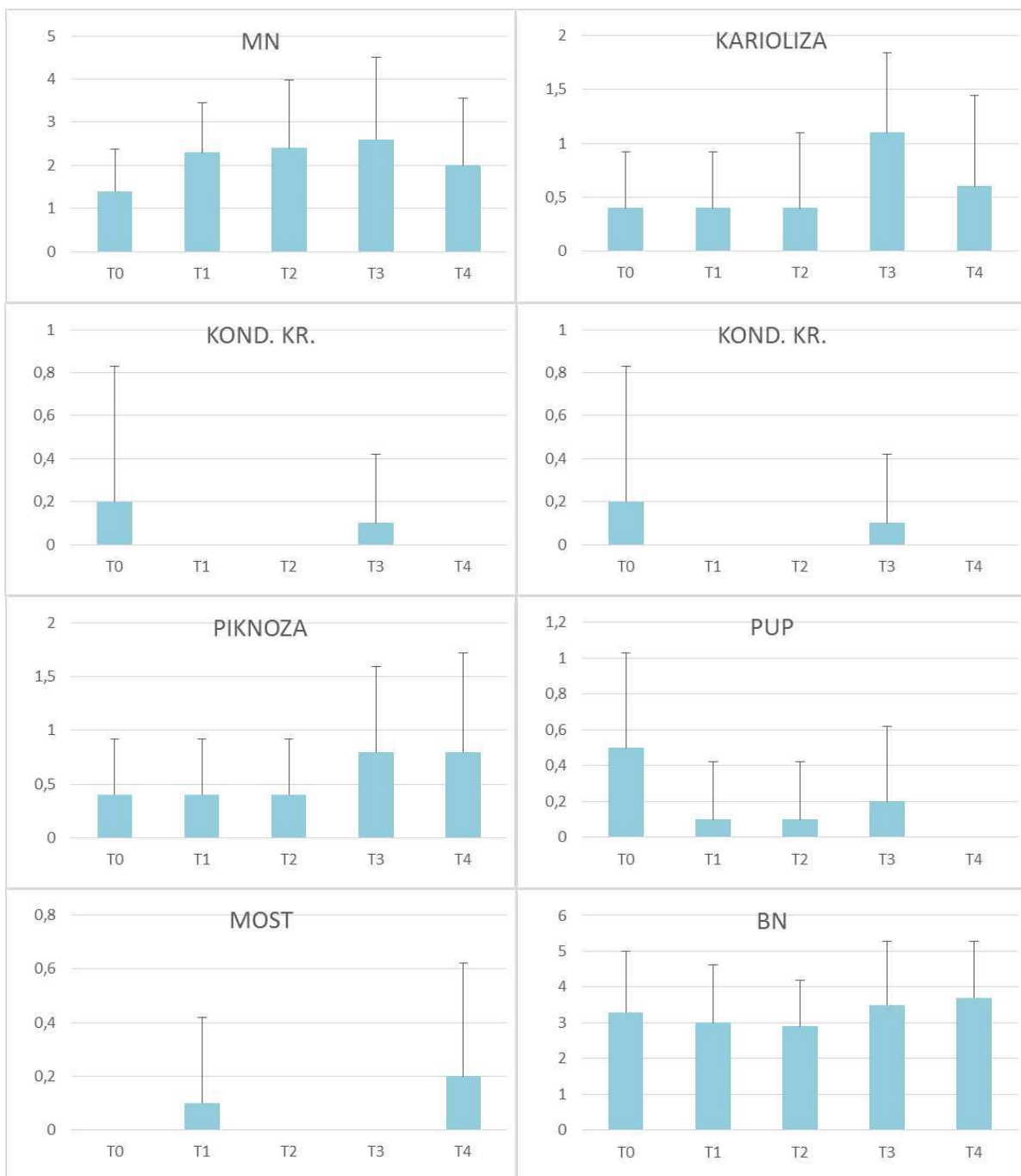


Slika 10. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa s obzirom na vrijeme izloženosti ispitanika zubnoj pasti Colgate® (T0 – 0 dana, T1 – 30 dana, T2 – 60 dana, T3 – 90 dana, T4 – 120 dana od početka korištenja zubnih pasta).

Osnovni statistički parametri za zubnu pastu Kalodont prikazani su u Tablici 6. Po parametru srednje vrijednosti razlika između kontrole (0 dana) i nakon 30 dana u kojima je korištena zubna pasta Kalodont Pro Care Extra Clean za vrijednosti mikronukleusa imamo povećanje od 64,29 %, dok je nakon 60 dana korištenje iste paste vrijednost mikronukleusa porasla za još 4,34 %. Nakon toga počinje korištenje paste Kalodont Pro Care Whitening, nakon čijeg se korištenja u trajanju od 30 dana (ukupni 90. dan od kontrole) vrijednost mikronukleusa u odnosu na 60. dan povećala za 8,33 %, a nakon 60 dana korištenja pala je za 23,07 %. Međutim, nakon analize varijance i Student-Newman-Keuls testa te vrijednosti nemaju statističkog značaja * $p < 0,05$.

Tablica 6. Deskriptivna statistika Kalodont. Osnovni statistički parametri za parametre mikronukleus testa prije izloženosti ispitanika zubnim pastama Kalodont, nakon izloženosti ispitanika zubnoj pasti Kalodont Pro Care Extra Clean (30 i 60 dana) te nakon toga izloženost ispitanika zubnoj pasti Kalodont Pro Care Whitening (90 i 120 dana). MN - mikronukleus, X - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija, SP - standardna pogreška, M – medijan.

Vrijeme izloženosti	Statistički parametar	Parametar mikronukleus testa							
		MN	Karioliza	Kondenzirani kromatin	Karioreksa	Piknoza	Pup	Most	BN
0 dana	X	1,40	0,40	0,20	0,00	0,40	0,50	0,00	3,30
	SD	0,97	0,52	0,63	0,00	0,52	0,53	0,00	1,70
	SP	0,31	0,16	0,20	0,00	0,16	0,17	0,00	0,54
	M	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	3,50
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	Maksimum	3,00	1,00	2,00	0,00	1,00	1,00	0,00	7,00
	30 dana	X	2,30	0,40	0,00	0,00	0,40	0,10	0,10
SD		1,16	0,52	0,00	0,00	0,52	0,32	0,32	1,63
SP		0,37	0,16	0,00	0,00	0,16	0,10	0,10	0,52
M		2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50
Minimum		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Maksimum		4,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	5,00
60 dana		X	2,40	0,40	0,00	0,10	0,40	0,10	0,00
	SD	1,58	0,70	0,00	0,32	0,52	0,32	0,00	1,29
	SP	0,50	0,22	0,00	0,10	0,16	0,10	0,00	0,41
	M	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	Maksimum	5,00	2,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	5,00
	90 dana	X	2,60	1,10	0,10	0,10	0,80	0,20	0,00
SD		1,90	0,74	0,32	0,32	0,79	0,42	0,00	1,78
SP		0,60	0,23	0,10	0,10	0,25	0,13	0,00	0,56
M		2,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	4,00
Minimum		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Maksimum		6,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	0,00	6,00
120 dana		X	2,00	0,60	0,00	0,00	0,80	0,00	0,20
	SD	1,56	0,84	0,00	0,00	0,92	0,00	0,42	1,57
	SP	0,49	0,27	0,00	0,00	0,29	0,00	0,13	0,50
	M	2,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	3,50
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	Maksimum	6,00	2,00	0,00	0,00	2,00	0,00	1,00	7,00

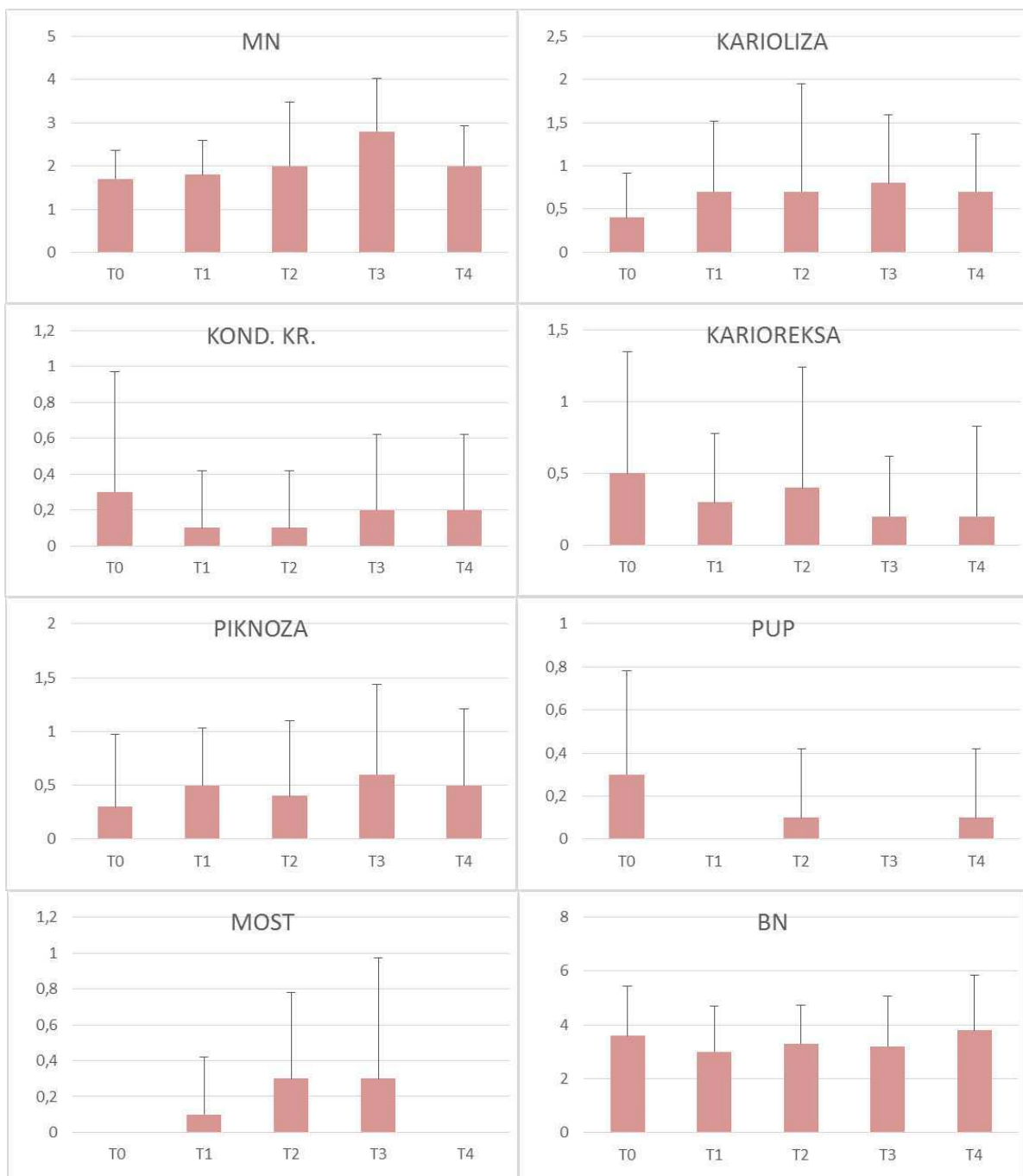


Slika 11. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa s obzirom na vrijeme izloženosti ispitanika zubnoj pasti Kalodont (T0 – 0 dana, T1 – 30 dana, T2 – 60 dana, T3 – 90 dana, T4 – 120 dana od početka korištenja zubnih pasta).

Osnovni statistički parametri za zubnu pastu Sensodyne® prikazani su u Tablici 7. Po parametru srednje vrijednosti razlika između kontrole (0 dana) i nakon 30 dana u kojima je korištena zubna pasta Sensodyne® Fluoride za vrijednosti mikronukleusa imamo povećanje od 5, 88 %, a nakon 60 dana korištenje iste paste vrijednost mikronukleusa je narasla još 11, 11 %. Nakon toga počinje korištenje paste Sensodyne® Whitening nakon čijeg se korištenja u trajanju od 30 dana (ukupni 90. dan od kontrole) vrijednost mikronukleusa u odnosu na 60. dan povećala za 40 %, a nakon 60 dana korištenja je vrijednost pala za 28, 57%. Međutim, nakon analize varijance i Student-Newman-Keuls testa te vrijednosti nemaju statističkog značaja * $p < 0,05$.

Tablica 7. Deskriptivna statistika Sensodyne®. Osnovni statistički parametri za parametre mikronukleus testa prije izloženosti ispitanika zubnim pastama Sensodyne®, nakon izloženosti ispitanika zubnoj pasti Sensodyne® Fluoride (30 i 60 dana) te nakon toga izloženost ispitanika zubnoj pasti Sensodyne® Whitening (90 i 120 dana). MN - mikronukleus, X - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija, SP - standardna pogreška, M – medijan.

Vrijeme izloženosti	Statistički Parametar	Parametar mikronukleus testa							
		MN	Karioliza	Kondenzirani kromatin	Karioreksa	Piknoza	Pup	Most	BN
0 dana	X	1,70	0,40	0,30	0,50	0,30	0,30	0,00	3,60
	SD	0,67	0,52	0,67	0,85	0,67	0,48	0,00	1,83
	SP	0,21	0,16	0,21	0,27	0,21	0,15	0,00	0,58
	M	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
	Minimum	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
	Maksimum	3,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	0,00	7,00
	X	1,80	0,70	0,10	0,30	0,50	0,00	0,10	3,00
30 dana	SD	0,79	0,82	0,32	0,48	0,53	0,00	0,32	1,70
	SP	0,25	0,26	0,10	0,15	0,17	0,00	0,10	0,54
	M	2,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	2,50
	Minimum	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	Maksimum	3,00	2,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	6,00
	X	2,00	0,70	0,10	0,40	0,40	0,10	0,30	3,30
	SD	1,49	1,25	0,32	0,84	0,70	0,32	0,48	1,42
60 dana	SP	0,47	0,40	0,10	0,27	0,22	0,10	0,15	0,45
	M	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
	Maksimum	5,00	4,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	7,00
	X	2,80	0,80	0,20	0,20	0,60	0,00	0,30	3,20
	SD	1,23	0,79	0,42	0,42	0,84	0,00	0,67	1,87
	SP	0,39	0,25	0,13	0,13	0,27	0,00	0,21	0,59
90 dana	M	2,50	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
	Minimum	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	5,00	2,00	1,00	1,00	2,00	0,00	2,00	6,00
	X	2,00	0,70	0,20	0,20	0,50	0,10	0,00	3,80
	SD	0,94	0,67	0,42	0,63	0,71	0,32	0,00	2,04
	SP	0,30	0,21	0,13	0,20	0,22	0,10	0,00	0,65
	M	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00
120 dana	Minimum	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	4,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	0,00	7,00



Slika 12. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa s obzirom na vrijeme izloženosti ispitanika zubnoj pasti Sensodyne® (T0 – 0 dana, T1 – 30 dana, T2 – 60 dana, T3 – 90 dana, T4 – 120 dana od početka korištenja zubnih pasta).

Tablica 8. Rezultati analize varijance za parametar mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika zubnim pastama. SS - suma kvadrata, D.F. - stupnjevi slobode, MS - varijanca. * Statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,05$).

	Izvor varijacije	Između skupina	Unutar skupina	Ukupno	F	p
Mikronukleus T0	SS	0,47	16,9	17,37	0,37	0,69
	D.F.	2	27	29		
	MS	0,23	0,63			
Mikronukleus T1	SS	2,07	19,8	21,87	1,41	0,26
	D.F.	2	27	29		
	MS	1,03	0,73			
Mikronukleus T2	SS	6,2	48,5	54,7	1,73	0,2
	D.F.	2	27	29		
	MS	3,1	1,8			
Mikronukleus T3	SS	0,47	62,5	62,97	0,1	0,9
	D.F.	2	27	29		
	MS	0,23	2,31			
Mikronukleus T4	SS	8,07	52,9	60,97	2,06	0,15
	D.F.	2	27	29		
	MS	4,03	1,96			

Tablica 9. Rezultati Student-Newman-Keuls testa za parametar mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika zubnim pastama. Grupirajuća varijabla – proizvođači pasta: 1 – Colgate®, 2 – Kalodont, 3 – Sensodyne®. *Statistička značajnost postavljena na $p < 0,05$.

MN0

	(1) Colgate®	(2) Kalodont	(3) Sensodyne®
(1) Colgate®		0,576691	0,779736
(2) Kalodont	0,576691		0,677092
(3) Sensodyne®	0,779736	0,677092	

MN1

(1) Colgate®		0,277118	0,796098
(2) Kalodont	0,277118		0,202837
(3) Sensodyne®	0,796098	0,202837	

MN2

(1) Colgate®		0,177509	0,253186
(2) Kalodont	0,177509		0,510349
(3) Sensodyne®	0,253186	0,510349	

MN3

(1) Colgate®		0,884348	0,898854
(2) Kalodont	0,884348		0,771180
(3) Sensodyne®	0,898854	0,771180	

MN4

(1) Colgate®		0,203142	0,090341
(2) Kalodont	0,203142		1,000000
(3) Sensodyne®	0,090341	1,000000	

Tablica 10. Rezultati analize varijance za parametar mikronukleus testa za vrijeme 4 razdoblja izloženosti ispitanika zubnim pastama. SS - suma kvadrata, D.F. - stupnjevi slobode, MS - varijanca. * Statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,05$).

	Izvor varijacije	Između skupina	Unutar skupina	Ukupno	F	p
	SS	21,17	217,87	239,04		
Razdoblja	D.F.	4	145	149	3,52	0,008*
	MS	5,29	1,5025			

Tablica 11. Rezultati Student-Newman-Keuls testa za parametar mikronukleus testa za vrijeme 4 razdoblja izloženosti ispitanika zubnim pastama. *Statistička značajnost postavljena na $p < 0,05$.

Razdoblja	Colgate®	Kalodont	Sensodyne®
0	0,569010	0,478112	0,292250
1	0,478112	0,087512	0,916139
2	0,292250	0,916130	0,320415
3	0,005748*	0,069199	0,094136
4	0,055750	0,170954	0,303233

Cilj je ovog istraživanja procjena biokompatibilnosti zubnih pasti s učinkom izbjeljivanja na stanicama oralne sluznice. Genotoksičnost i citotoksičnost su procijenjene mikronukleus testom. Opsežna je vremenska klinička studija provedena u razdoblju od četiri mjeseca. Tri su grupe pacijenata koristile dvije različite zubne paste istih proizvođača, svaku dva mjeseca (konvencionalnu bez učinka za izbjeljivanje i onu s učinkom izbjeljivanja) te je procijenjena toksičnost svake paste nakon razdoblja od mjesec, odnosno dva mjeseca od početka upotrebe. Prema našim saznanjima, ovo je prva uzdužna *in vivo* studija koja procjenjuje biokompatibilnost različitih zubnih pasti izravno na pacijentima.

Zubne paste sadrže kemikalije koje mogu imati nepovoljne učinke na oralno tkivo ljudi. Gotovo svi su sastojci potencijalno štetni, a rizik štetnih efekata ovisi o koncentraciji istih. S obzirom na njihov učestali doticaj s oralnom sluznicom, svi štetni efekti takvih sastojaka moraju biti provjereni. Mikronukleus test korišten u ovoj studiji potpuno je neinvazivna i pouzdana metoda prikladna za utvrđivanje štete na kromosomima usne šupljine. Bazalni sloj oralne sluznice sadrži matične stanice koje mogu iskazati genetsko oštećenje (gubitak ili lom kromosoma) kao mikronukleus tijekom diobe stanica. Bukalne stanice se samoodržavaju konstantnom staničnom obnovom, u kojoj nove stanice nastale mitozom u bazalnom sloju migriraju na površinu i zamjenjuju oštećene (15). Optimalno je tempiranje između 7 i 21 dana nakon izlaganja jer vršno iskazivanje oštećenja može varirati ovisno o efektima određenog oštećenja DNK, odnosno o promjenjivoj izloženosti kromosoma bazalnih stanica (16). Bukalne stanice imaju ograničene mogućnosti regeneracije DNK, zbog čega su podložnije razvijanju genetske nestabilnosti u usporedbi sa stanicama koje efikasnije obnavljaju oštećenja DNK (17).

Također, nužno je naglasiti da je usna šupljina multifaktorijalno okruženje te, obzirom da svaki pacijent ima vlastite specifične biološke varijacije, *in vivo* studije ne mogu biti standardizirane. Kako bi se eliminirala pojedinačna odstupanja, napredak svakog ispitanika je redovito vremenski praćen. Ispitanici su poslužili kao vlastita kontrola te su biološke raznolikosti bile zanemarive u konačnoj procjeni (18).

Mikronukleus test na oljuštenim stanicama bukalne sluznice je *in vivo* ispitivanje koje omogućava pojašnjenje učinaka genotoksičnih tvari direktno na ciljanom tkivu. Sve tri testirane konvencionalne zubne paste bez učinka za izbjeljivanje nisu dovele do značajnog povećanja broja mikronukleusa u odnosu na kontrolni bris uzet neposredno prije početka korištenja testiranih zubnih pasta. Broj je stanica sa mikronukleusima u ovom istraživanju bio

najveći trideset dana od početka korištenja zubnih pasti s učinkom za izbjeljivanje (T3) za sve tri zubne paste u odnosu na kontrolu (T0), ali statistički značajan porast je bio samo kod zubne paste Colgate® ($p=0,0057$; T3) te se spustio na kontrolirane vrijednost nakon 60 dana od početka korištenja ($p=0,055$; T4). Usporedbom konvencionalnih zubnih pasti bez učinka izbjeljivanja s onima s učinkom izbjeljivanja primjećen je porast broja stanica s mikronukleusom, ali se nije pokazalo statistički značajnim. Kad smo uspoređivali konvencionalne zubne paste međusobno, nismo naišli na razlike među njima u parametrima cito i genotoksičnosti. Isto se potvrdilo i u usporedbi zubnih pasti s učinkom za izbjeljivanje.

Ovi rezultati su u skladu s onima preuzetim iz Camargo i suradnici (6), koji pokazuju kako su paste s učinkom izbjeljivanja bile *in vitro* više genotoksične od uobičajenih. U tom istraživanju sve su testirane zubne paste uspjele dovesti preživljavanje stanica na istu razinu. Oral-B Whitening paste za zube smanjile su preživljavanje stanica na prosječno manje od 40 %, te su dovele do stvaranja 3 puta više mikronukleusa nego kod netretirane skupine. S druge strane, Colgate® Whitening pokazuje postotak stanica sposobnih za život manji od 5 %, te je ta zubna pasta povećala broj mikronukleusa na tretiranim stanicama za otprilike dvostruko u odnosu na rezultate kod netretirane skupine. Ako procjenjujemo u odnosu na konvencionalne Colgate® zubne paste, Colgate® Whitening zubna pasta je dovela do jednostrukog povećanja broja mikronukleusa.

S druge strane, Torrado i suradnici (19) su na mišjim fibroblastima L929 *in vitro* testirali citotoksičnost Crest Extra-Whitening zubne paste. Njihovi rezultati su pokazali da nije bilo inhibicije veće od 50 % te nisu primijetili povećanja citotoksičnosti u odnosu na vrijeme inkubacije. Ghapanachi i suradnici (20) su također *in vitro* istraživali citotoksičnost 16 komercijalnih zubnih pasti na osnovnim epitelnim stanicama usne šupljine i HeLa stanicama, te su pokazali da sve testirane paste imaju određeni stupanj toksičnosti. Štoviše, u usporedbi s kontrolnim skupinama, citotoksičnost zubnih pasti je značajno porasla i uzrokovala odumiranje stanica nakon povećanog vremena izloženosti, od 1 do 5 minuta. Citotoksičnost su zubnih pasti, također, *in vitro* dokazali Bruno i suradnici (21) na ljudskim gingivnim fibroblastima. Sve testirane zubne paste su pokazale postotak stanica sposobnih za život između 16 i 21 %, te su smatrane izrazito toksičnima. Postotak je stanica sposobnih za život bio sličan kod svih testiranih zubnih pasti (Colgate® Total 12 Clean Mint, Colgate® Luminous White, Oral B Limpeza i Closeup Ação Profunda). Slično je istraživanje provela još jedna brazilska skupina autora (22). Oni su procjenjivali citotoksičnost široko dostupnih konvencionalnih zubnih pasti na ljudske gingivne fibroblaste putem MTT testa. Sensodyne®

skupina pasti pokazala je postotak stanica sposobnih za život sličan onom kod kontrolne skupine (destilirana voda), a bio je između 60 i 68 %. Sve su druge zubne paste, među njima i Colgate® Total 12, pokazale visoku razinu citotoksičnosti, s brojem stanica manjim od 50 % u odnosu na kontrolnu skupinu (22).

Ovaj pad broja stanica sposobnih za život može biti pripisan učinku različitih sastojaka zubnih pasti, samih ili u kombinacijama (21). Neka su istraživanja pokazala da su određeni sastojci zubnih pasti odgovorni za kulturno odumiranje stanica (21, 23, 24). Razlike između sastava testiranih zubnih pasti mogu biti odgovorne za spomenute učinke. Međutim, proizvođači ne objavljuju detaljan sastav.

Natrij lauril sulfat (SLS) poznat je kao jedan od najtoksičnijih sastojaka zubnih pasti, korišten kao deterdžent i sastojak kozmetičkih preparata. Učestala upotreba ovog sastojka vodi do višestrukih alergijskih reakcija i trovanja. Sustavni unos spojeva SLS-a može imati kancerogeni učinak (25). Istraživanje koje su proveli Gerckens i suradnici (26, 27) pokazalo je kako je SLS najtoksičniji sastojak za stanice sluznice te da uzrokuje deskvamaciju stanica epitela. Neppelberg i suradnici (28) utvrdili su direktnu vezu između SLS-a i odumiranja epitelnih stanica. Treba napomenuti da je svih 6 testiranih zubnih pasti sadržavalo SLS, ali te zubne paste su vjerojatno imale manju koncentraciju ovog sastojka, tako da učinak SLS na parametre citotoksičnosti i genotoksičnosti u *in vivo* uvjetima nije bio uočljiv.

Još jedan sastojak koji je povezan s citotoksičnošću oralne sluznice je triklosan. To je aktivni sastojak koji sprječava bakterijsku aktivnost i nastanak plaka (22, 29). *In vitro*, triklosan oštećuje integritet plazmatske membrane i uzrokuje odumiranje stanica apoptozom (30). Triklosan može smanjiti iritaciju uzrokovanu SLS-om dok kombinacija triklosana sa NaF ili Zn citratom povećava citotoksični potencijal triklosana (30, 31).

Ostali sastojci, uključujući natrijev monofluorofosfat, silicijev dioksid, hidratizirani silicij, natrijev benzoat, konzervanse, boje, okuse i baze, mogu također imati toksičan utjecaj (20, 32). Unatoč učestaloj kliničkoj upotrebi, NaF može inhibirati rast stanica, kao i sintezu DNK i proteina, citotoksičan je za nekoliko tipova stanica. Jeng i suradnici (33) su zaključili kako je NaF toksičan za fibroblaste oralne sluznice, tako da smanjuje sintezu proteina, staničnu ATP razinu i mitohondrijsku funkcionalnost, ovisno o doziranju. Međutim, učinci su NaF na stanice ovisili o količini, frekvenciji i trajanju izloženosti. Utvrdili su kako NaF ne uzrokuje značajniju inhibiciju na koncentracijama manjim od 2 mmol/L (40 ppm).

In vitro istraživanja mogu se razlikovati od našeg *in vivo*, obzirom da je teško utvrditi koncentraciju zubne paste te uvjetovano vrijeme. Naši se rezultati vjerojatno razlikuju od onih *in vitro* zbog činjenice da različiti faktori poput sline, sloja sluzi, razine kreatina, cirkulacije i oralne flore mogu utjecati na zaštitu oralne šupljine od štetnih tvari (21).

Brojni biološki, ekološki i demografski faktori mogu ometati *in vivo* istraživanja. Uglavnom, to su faktori domaćina (dob, spol), životni stil (pušenje, alkohol, zanimanje, folna kiselina i unos vitamina) te podložnost bolestima (karcinom i sl.) (34). U našem istraživanju na oštećenja DNK najveći je utjecaj promatran s obzirom na vrijeme proteklo od početka korištenja zubnih pasti. Dob i spol su najvažnije demografske varijable koje utječu na indeks mikronukleusa. U našem istraživanju nismo uočili razlike između spolnih i dobnih skupina. U brojnim je istraživanjima dokazano kako osobe ženskog spola imaju veći broj mikronukleusa zbog hormonskih promjena. Za oba je spola učestalost mikronukleusa značajno i pozitivno povezana s dobi ispitanika (35). Među faktorima životnog stila pušenje i konzumacija alkohola pokazali su najveći utjecaj na oštećenje DNK (pup i most) i pojavu binuklearnih stanica. Naša promatranja, temeljena na rezultatima višestruke regresijske analize i s obzirom na utjecaj pušenja i konzumacije alkohola na oštećenje DNK i frekventnost mikronukleusa, u skladu su s onima koje su objavili Lima i suradnici (36), koji nisu otkrili značajan efekt pušenja i alkohola na pojavu mikronukleusa u stanicama oralne sluznice kod osoba koje zloupotrebljavaju alkohol, duhan i droge.

Rezultati provedenog istraživanja pokazuju kako paste za izbjeljivanje mogu prouzročiti genotoksičan efekt na stanice bukalnog epitela u prvom mjesecu upotrebe. Također, nakon dva mjeseca upotrebe broj mikronukleusa vratio se na bazalnu razinu, pokazujući odsustvo dugoročnih efekata na genetsku stabilnost. Prema našim rezultatima možemo zaključiti kako je promatrano povećanje oštećenja DNK privremenog karaktera i ne mora imati biološkog značaja. Bilo bi poželjno da farmaceutske tvrtke bolje prate neželjene efekte te izbace dokazane štetne tvari iz sastava zubnih pasti. Štoviše, buduća su istraživanja i uzdužno praćenje nužni kako bi se otkrile bilo kakve nuspojave prilikom korištenja proizvoda za oralnu higijenu.

6. ZAKLJUČCI

Iz navedenih rezultata dolazimo do sljedećih zaključaka:

1. Nema razlike u parametrima citotoksičnosti i genotoksičnosti na stanicama bukalne sluznice dobivenih mikronukleus testom kod zubnih pasta bez učinka izbjeljivanja (konvencionalne zubne paste), neovisno o vremenu proteklom od početka korištenja.
2. Zubne paste s učinkom izbjeljivanja pokazale su porast parametara citotoksičnosti i genotoksičnosti na stanicama bukalne sluznice u odnosu na konvencionalne zubne paste istog proizvođača, no to nije bilo statistički značajno.
3. Zubne paste s učinkom izbjeljivanja pokazale su porast parametara citotoksičnosti i genotoksičnosti na stanicama bukalne sluznice u odnosu na kontrolni bris uzet prije početka korištenja testiranih zubnih pasta.
4. Genotoksičan i citotoksičan učinak zubnih pasta za izbjeljivanje nije rastao sukladno vremenu proteklom od početka korištenja istih. Najveći je porast primijećen u prvom mjesecu korištenja.
5. Genotoksični učinak zubnih pasta s učinkom izbjeljivanja *in vivo* prolaznog je karaktera te nema biološku važnost.
6. Zubne paste su najčešće korišteno sredstvo u oralnoj higijeni, a proizvođači na tržište proizvoda za oralnu higijenu svakodnevno izbacuju veliki broj proizvoda s novim inovativnim sastojcima upitne biokompatibilnosti, stoga su nužna redovita istraživanja moguće toksičnosti istih u *in vivo* uvjetima.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Hoshyari N, Labbaf H, Jalayer Naderi N, Kazemi A, Bastami F, Koopaei M. Biocompatibility of Portland Cement Modified with Titanium Oxide and Calcium Chloride in a Rat Model. *Iranian endodontic journal*. 2016;11(2):124-8.
2. Mousavinasab SM. Biocompatibility of composite resins. *Dental research journal*. 2011;8(Suppl 1):S21-9.
3. Gociu M, Patroi D, Prejmerean C, Pastrav O, Boboia S, Prodan D, et al. Biology and cytotoxicity of dental materials: an in vitro study. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2013;54(2):261-5.
4. de Moraes Porto ICC. Polymer Biocompatibility [Internet book]. InTech, 2012. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/polymerization> [13. srpnja 2016.].
5. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*. 2007;12(3):258-66.
6. Camargo SE, Joias RP, Santana-Melo GF, Ferreira LT, El Achkar VN, Rode Sde M. Conventional and whitening toothpastes: cytotoxicity, genotoxicity and effect on the enamel surface. *American journal of dentistry*. 2014;27(6):307-11.
7. Sikalidis C. Advances in Ceramics: Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment [Internet book]. InTech, 2011. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-ceramics-electric-and-magnetic-ceramics-bioceramics-ceramics-and-environment> [13. srpnja 2016.]
8. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of dental materials*: Springer; 2009.
9. Kashyap B, Reddy PS. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2012;8(2):184-91.
10. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1975;31(1):9-15.
11. Yadav AS, Jaggi S. Buccal Micronucleus Cytome Assay-A Biomarker of Genotoxicity. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*. 2015.

12. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2009;4(6):825-37.
13. Maldupa I, Brinkmane A, Rendeniece I, Mihailova A. Evidence based toothpaste classification, according to certain characteristics of their chemical composition. *Stomatologija*. 2012;14(1):12-22.
14. Joiner A. Whitening toothpastes: a review of the literature. *Journal of dentistry*. 2010;38 Suppl 2:e17-24.
15. Dorea LT, Meireles JR, Lessa JP, Oliveira MC, de Braganca Pereira CA, Polpo de Campos A, et al. Chromosomal damage and apoptosis in exfoliated buccal cells from individuals with oral cancer. *International journal of dentistry*. 2012;2012:457054.
16. Shashikala R, Indira AP, Manjunath GS, Rao KA, Akshatha BK. Role of micronucleus in oral exfoliative cytology. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2015;7(Suppl 2):S409-13.
17. Borthakur G, Butryee C, Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE. Exfoliated buccal mucosa cells as a source of DNA to study oxidative stress. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2008;17(1):212-9.
18. Tadin A, Galic N, Mladinic M, Marovic D, Kovacic I, Zeljezic D. Genotoxicity in gingival cells of patients undergoing tooth restoration with two different dental composite materials. *Clinical oral investigations*. 2014;18(1):87-96.
19. Torrado A, Valiente M, Zhang W, Li Y, Munoz CA. Cytotoxicity of a new toothpaste based on an ion exchange resin mixture. *American journal of dentistry*. 2005;18(4):267-9.
20. Ghapanchi J, Kamali F, Moattari A, Poorshahidi S, Shahin E, Rezazadeh F, et al. In vitro comparison of cytotoxic and antibacterial effects of 16 commercial toothpastes. *Journal of international oral health : JIOH*. 2015;7(3):39-43.
21. Bruno M, Taddeo F, Medeiros IS, Boaro LC, Moreira MS, Marques MM, et al. Relationship between toothpastes properties and patient-reported discomfort: crossover study. *Clinical oral investigations*. 2016;20(3):485-94.

22. Souza-Rodrigues RD, Ferreira Sda S, D'Almeida-Couto RS, Lachowski KM, Sobral MA, Marques MM. Choice of toothpaste for the elderly: an in vitro study. *Brazilian oral research*. 2015;29.
23. Tsutsui T, Tanaka Y, Ushimura A, Ide T, Matsumura M, Barrett JC. In vitro cytotoxicity of diverse preparations used in dental practice to human gingival keratinocytes. *Toxicology in vitro*. 1997;11(4):393-8.
24. Norton JN, Rylander LA, Richards JL. In vitro oral mucosa irritation testing with human cell cultures. *Toxicology in vitro*. 1995;9(1):67-74.
25. Ersoy M, Tanalp J, Ozel E, Cengizlier R, Soyman M. The allergy of toothpaste: a case report. *Allergologia et immunopathologia*. 2008;36(6):368-70.
26. Gerckens B, Eisinger G, Kaden P, Kruger W. Comparative studies of toothpastes and toothpaste ingredients in biological systems: 1. Can various toothpastes be differentiated by relative biological effectiveness in cell culture studies? *Oral-prophylaxe / Herausgeber, Verein fur Zahnhygiene eV*. 1991;13(2):55-60.
27. Gerckens B, Eisinger G, Kruger W. Comparative studies of toothpastes and toothpaste ingredients in biological systems. 2. Study of toothpaste ingredients and their effects on cell growth. *Oral-prophylaxe / Herausgeber, Verein fur Zahnhygiene eV*. 1991;13(3):94-9.
28. Neppelberg E, Costea DE, Vintermyr OK, Johannessen AC. Dual effects of sodium lauryl sulphate on human oral epithelial structure. *Experimental dermatology*. 2007;16(7):574-9.
29. Davies R, Scully C, Preston AJ. Dentifrices--an update. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2010;15(6):e976-82.
30. Zuckerbraun HL, Babich H, May R, Sinensky MC. Triclosan: cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro. *European journal of oral sciences*. 1998;106(2 Pt 1):628-36.
31. Gaffar A, Scherl D, Afflitto J, Coleman EJ. The effect of triclosan on mediators of gingival inflammation. *Journal of clinical periodontology*. 1995;22(6):480-4.

32. Rantanen I, Jutila K, Nicander I, Tenovuo J, Soderling E. The effects of two sodium lauryl sulphate-containing toothpastes with and without betaine on human oral mucosa in vivo. *Swedish dental journal*. 2003;27(1):31-4.
33. Jeng JH, Hsieh CC, Lan WH, Chang MC, Lin SK, Hahn LJ, et al. Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. *Cell biology and toxicology*. 1998;14(6):383-9.
34. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsiere T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation research*. 2008;658(3):215-33.
35. Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 2011;26(1):69-76.
36. Lima CF, Oliveira LU, Cabral LA, Brandao AA, Salgado MA, Almeida JD. Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. *Journal of oral pathology & medicine*. 2010;39(6):441-6.

Naslov diplomskog rada: Procjena citotoksičnog i genotoksičnog učinka pasta za izbjeljivanje na stanicama oralne sluznice

Cilj istraživanja: Ispitati postoji li razlika u učestalosti mikronukleusa i drugih jezgrinih anomalija kod ispitanika pri korištenju zubnih pasta bez i s učinkom izbjeljivanja.

Materijali i metode: Istraživanje je provedeno na Medicinskom fakultetu u Splitu u trajanju od četiri mjeseca. Sudjelovalo je 30 zdravih studenata Medicinskog fakulteta u Splitu, koji su potpisali suglasnost za sudjelovanje. Svakom je ispitaniku uzet bris oralne sluznice citološkom četkicom neposredno prije korištenja zubnih pasta te nakon 30, 60, 90 i 120 dana. Ispitanici su koristili dva mjeseca zubnu pastu bez učinka izbjeljivanja, a zatim dva mjeseca zubnu pastu s učinkom za izbjeljivanje. Uzeti bris se nanosio na predmetno stakalce te se uzorak adekvatno pripremio za analiziranje mjera genotoksičnosti i citotoksičnosti u stanicama u kojima je utvrđen broj mikronukleusa i drugih morfoloških promjena jezgre (mikronukleus test) na svjetlosnom mikroskopu.

Rezultati: Rezultati su pokazali značajno veći broj stanica s mikronukleusom u periodu od 90 dana, čije su se vrijednosti vratile na kontrolne poslije 120 dana (prijašnju upotrebu testiranih pasta). Rezultati nisu otkrili razlike između korištenja različitih zubnih pasta za vrijeme istog perioda korištenja.

Zaključak: Na osnovu rezultata možemo zaključiti kako uporaba pasta za zube sa učinkom izbjeljivanja, u usporedbi s konvencionalnim pastama, uzrokuje određena stanična oštećenja ali ne kroz duže vrijeme. Promatrani efekti nisu indicirani kao biološki značajni.

Ključne riječi: biokompatibilnost, DNK oštećenja, mikronukleus test, stanice oralne sluznice, paste za izbjeljivanje

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Assessment of cytotoxic and genotoxic effects of whitening toothpastes on oral mucosa cells

Objectives: To examine whether there is a difference in the frequency of micronuclei and other nuclear anomalies in the subjects that are using conventional and whitening toothpastes.

Material and Methods: The study was conducted at the School of Medicine in Split, and lasted for 4 months. The study included 30 healthy medical students from University of Split who signed the agreement to participate. Each subject's oral mucosa was wiped with cytology brush directly before using the toothpastes, and after 30, 60, 90 and 120 days. Subjects used conventional toothpaste for 2 months and then whitening toothpaste for other 2 months. Wiped cells were inflicted on a glass slide and then the sample was adequately prepared for analysis of genotoxicity and cytotoxicity measures in the cells in which the number of micronuclei and other morphological changes of the nucleus (micronucleus assay) is established. It was done with luminous microscope.

Results: The results showed significantly higher number of cells with micronuclei within period of 90 days, who returned to control values after 120 days (prior use of tested toothpastes) . Results did not reveal any difference between different toothpaste for the same duration of use.

Conclusion: Based on the results, we can conclude that the use of whitening toothpastes causes certain cellular damage compared to conventional toothpastes, but not for long time. Observed effects could not be indicated as biologically relevant.

Keywords: biocompatibility, DNA damage, micronucleus assay, oral epithelial cells, whitening toothpaste

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Ana Žeravica

Državljanstvo: Republike Hrvatske

Datum i mjesto rođenja: 25. listopada 1991., Osijek

Adresa: Kolodvorska 66, 31431 Čepin

Elektronička pošta: ana.zeravica@hotmail.com

IZOBRAZBA

1998. – 2006. Osnovna škola Miroslava Krležu u Čepinu

2006. – 2010. I. gimnazija Osijek, program opće gimnazije

2010. – 2016. Medicinski fakultet u Splitu, integrirani studij Dentalna medicina

MATERINSKI JEZIK

- hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

- engleski jezik – tečno
- njemački jezik – osnovno

AKTIVNOSTI

- potpredsjednica Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- predsjednica studentske organizacije „Zubolina“, osnovane pri Medicinskom fakultetu u Splitu koja se bavi edukacijom djece o oralnom zdravlju i higijeni
- demonstrator na katedri Restaurativna dentalna medicina i Endodoncija

NAGRADE

- dobitnica nagrade "Trofej Kuna" za mlade i perspektivne sportaše grada Osijeka
- dobitnica nagrade Školskog sportskog saveza grada Osijeka za najbolju sportašicu srednjih škola Osječko-baranjske županije u školskoj godini 2008./2009.
- dobitnica Rektorove nagrade za izvrsnost za akademsku godinu 2014./2015.