

Citotoksični i genotoksični učinak zubnih pasta s fluorom i bez fluora na stanicama bukalne sluznice

Gović, Tanja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:758552>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Tanja Gović

**CITOTOKSIČNI I GENOTOKSIČNI UČINAK ZUBNIH PASTA S FLUOROM I BEZ
FLUORA NA STANICAMA BUKALNE SLUZNICE**

Diplomski rad

Akadska godina: 2016. / 2017.

Mentor: doc. dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.

Split, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Tanja Gović

**CITOTOKSIČNI I GENOTOKSIČNI UČINAK ZUBNIH PASTA S FLUOROM I BEZ
FLUORA NA STANICAMA BUKALNE SLUZNICE**

Diplomski rad

Akadska godina: 2016. / 2017.

Mentor: doc. dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.

Split, srpanj 2017.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	4
1.1.	Zubne paste.....	2
1.1.1.	Aktivni sastojci zubnih pasta	2
1.1.2.	Pomoćne tvari u zubnim pastama	4
1.1.3.	Sigurnosna pitanja vezana uz sastojke zubnih pasti	6
1.1.4.	Zubne paste s fluorom.....	7
1.2.	Fluoridi – korištenje i učinak na zdravlje.....	8
1.2.1.	Primjena fluorida u dentalnoj medicini i toksikologija.....	9
1.3.	Mikronukleus test	12
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	17
3.	MATERIJALI I METODE.....	19
3.1.	Ispitanici.....	20
3.2.	Materijali	21
3.3.	Uzorkovanje stanica.....	22
3.4.	Mikronukleus test	23
3.4.	Statistička obrada podataka	23
4.	REZULTATI	25
4.1.	Usporedba tretmana	30
4.2.	Višestruka regresijska analiza	31
5.	RASPRAVA.....	34
6.	ZAKLJUČCI	39
7.	POPIS CITIRANE LITERATURE	41
8.	SAŽETAK	45

9.	SUMMARY	47
10.	ŽIVOTOPIS	49

Veliku zahvalnost iskazujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Antoniji Tadin, na velikoj pomoći i savjetima, a najviše na potpori i razumijevanju, ne samo tijekom izrade ovog diplomskog rada, nego i tijekom trajanja studija.

Posebno se zahvaljujem i doc. dr. sc. Lidiji Gavić na susretljivosti, pomoći i korisnim savjetima tijekom statističke obrade podataka i interpretacije rezultata.

Također, hvala svim ispitanicima na sudjelovanju u ovom istraživanju i iskazanoj suradljivosti.

Zahvaljujem sveukupnom nastavnom osoblju na iznimnoj pristupačnosti i angažiranosti te na prenesenom znanju i iskrenim savjetima tijekom studija.

Najveće hvala upućujem svojoj obitelji koja je bila uz mene u svakom trenutku te koja mi je svojom potporom, razumijevanjem i strpljenjem omogućila da budem uspješna i ostvarim željene rezultate.

1. UVOD

1.1. Zubne paste

Zubne paste su pomoćno sredstvo u obliku paste ili gela koje se koristi zajedno s četkicom za zube u svrhu održavanja i poboljšanja oralnog zdravlja i estetike. Pasta za zube ima i kozmetički - higijenski učinak (otklanja zadah iz usta) i pomaže u prevenciji karijesa (prvenstveno zahvaljujući fluoridima). One su možda jedan od najsloženijih medicinski – zdravstvenih proizvoda, a sastoje se od abraziva ili njihove smjese suspendiranih u vodenoj vlažnoj fazi pomoću hidrokoloida. Zubne paste dodatno sadrže surfaktante, aktivne terapijske sastojke, zaslađivače, boje, konzervanse i brojne druge sastojke (1, 2).

1.1.1. Aktivni sastojci zubnih pasta

Fluoridi

Ovisno o specifičnom zakonodavstvu zemlje ili regije, može se koristiti nekoliko fluoridnih spojeva u različitim koncentracijama. U EU su fluoridni spojevi regulirani kao kozmetički te je dostupno ukupno 20 različitih spojeva i njihovih mješavina. U SAD-u se fluoridi reguliraju kao lijek i dopuštena su samo tri spoja (natrijev fluorid, natrijev monofluorofosfat i kositreni fluorid). Smjese različitih fluoridnih spojeva nisu dopuštene, a za razliku od EU zubne paste moraju sadržavati određenu razinu (bio) dostupnih fluorida. U gotovo svim ostalim dijelovima svijeta moguće je naći samo osnovna tri fluoridna spoja - NaF, $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ ili SnF_2 - vjerojatno zbog toga što na većini tržišta dominiraju iste tvrtke poput onih u EU i SAD-u.

Postoje i zakonodavne razlike između maksimalnih dopuštenih koncentracija fluorida u zubnim pastama. Tako u EU mogu sadržavati maksimalno do 1500 ppm fluorida, a koncentracije znatno variraju između pojedinih vrsta zubnih pasti (250 - 1500 ppm fluorida) namijenjenih djeci u dobi od 6 i više godina. S druge strane, u SAD-u najveća dopuštena koncentracija fluorida za dob od 2 godine i više iznosi 1150 ppm, a varijacije u koncentracijama unutar zubnih pasti su male (850 – 1150 ppm) zbog statusa lijeka kojeg fluoridni spojevi imaju u toj zemlji (2).

Nefluoridni antikarijesni sastojci

Nefluoridni antikarijesni sastojci uključuju kalcij, fosfat, metale i neke antimikrobne spojeve (1). Idealni remineralizacijski spoj bi trebao difundirati ili dostavljati kalcij i fosfat

unutar površinske lezije ili pojačati remineralizacijske sposobnosti sline i oralnih rezervoara bez povećanja rizika od nastanka kamenca. CPP-ACP spojevi pružaju biološki dostupne kalcijeve i fosfatne ione koji na zubnoj površini inhibiraju demineralizaciju te potiču remineralizaciju. Ostali čimbenici sa sličnim učinkom su trikalcij fosfat, nanohidroksiapatit i arginin bikarbonat (2).

Sastojci koji djeluju protiv gingivitisa

Uzrok gingivitisa i parodontitisa su bakterije u dentalnom plaku tako da ga je za prevenciju ovih bolesti potrebno redovito uklanjati, uklanjajući time i mikroorganizme. Također je potrebno spriječiti rast bakterija, čime se inhibira nastanak novog plaka i kamenca (3). Većina antiplaknih sastojaka u oralnoj upotrebi su antiseptici ili antimikrobna sredstva koja preveniraju prijanjanje plaka, usporavaju proliferaciju bakterija ili uklanjaju postojeći plak. Takvi sastojci moraju imati sposobnost produljenog zadržavanja na oralnim površinama i polaganog otpuštanja (supstantivnost). Isto tako, trebaju imati širok antimikrobni spektar s niskom toksičnošću i visokom kompatibilnošću s ostalim komponentama zubne paste. Najčešće primjenjivani su triklosan, klorheksidin, kositreni klorid/fluorid i cinkov citrat/klorid (2).

Sastojci protiv zadaha

Pasta koja sadrži triklosan/kopolimer/natrijev fluorid je učinkovita u reduciranju oralnih bakterija, kao i sumpornih spojeva uključenih u zadah. U tu svrhu, najčešće se koriste koriste soli cinka jer cink ne posjeduje samo antimikrobna svojstva, nego i reagira s hlapljivim spojevima sumpora i pretvara ih u nestabilne cinkove soli (cinkov sulfid je jedan od najmanje topljivih spojeva) (2).

Sastojci protiv stvaranja kamenca

Supragingivni kamenac je mineralizirani plak, a može se kontrolirati inhibiranjem mineralizacije različitim čimbenicima koji sprječavaju rast kristala. Takvi inhibitori uključuju pirofosfate, fosfonate, cinkove soli te kopolimer metil vinil etera i maleičnog anhidrida (2).

Sastojci koji pomažu izbjeljivanju

Abrazivi su glavni sastojci zubnih pasta koji služe za uklanjanje zubnih obojenja. Neke paste sadrže dodatne kemijske spojeve koji mogu pojačavati abrazivno čišćenje, a to su enzimi, peroksidi, surfaktanti, citrati, pirofosfati i heksametafosfati (2).

Sastojci za olakšavanje dentalne preosjetljivosti

Eksponirane površine korijena, nastale kao posljedica gingivalne recesije, glavni su predisponirajući čimbenici za dentinsku preosjetljivost korijena zuba. U liječenju se mogu koristiti dvije grupe proizvoda: (a) oni koji interferiraju s provođenjem živčanih impulsa i (b) oni koji okludiraju dentinske tubuluse. Za okluziju tubula koriste se stroncijeve soli (acetat, klorid), kositar fluorid, kalcij natrij fosfosilikat ("bioglas") i arginin bikarbonat u kombinaciji s kalcijevim karbonatom. Desenzibilizacija živaca može se postići i solima kalija, poput citrata i nitrata. Ove se soli obično upotrebljavaju u relativno visokim koncentracijama (oko 5% w/w), što negativno utječe na okus zubnih pasti (gorčina) (2).

Sastojci za sprečavanje dentalne erozije

Tek odnedavno su na tržište uvedene zubne paste za koje se tvrdi da se bore protiv dentalne erozija, a najčešće korišteni sastojak jest natrijev ili kositreteni fluorid (2).

1.1.2. Pomoćne tvari u zubnim pastama*Abrazivi*

Abrazivi su najčešći pomoćni sastojci koji služe za čišćenje i zaglađivanje površine zuba. Budući da su te čestice tvrđe od mrlja, ali mekše od cakline, mrlje se mogu ukloniti bez nanošenja značajnih oštećenja površini zuba. Abrazivi koji se koriste u zubnim pastama su hidratirani silicijev dioksid, kalcijev karbonat, dikalcijev fosfat dihidrat, kalcijev pirofosfat, natrijev metafosfat, aluminijski perlit, nano-hidroksiapatit i natrijev bikarbonat. Na abrazivni postupak čišćenja utječu različiti čimbenici kao što su tvrdoća čestica, oblik, veličina, raspodjela veličine, koncentracija i primijenjena sila tijekom četkanja zuba (2).

Površinski aktivne tvari

Surfaktanti (deterdženti) nisu samo odgovorni za pjenjenje zubnih pasti, već i pomažu intraoralnoj disperziji pasta i u micelizaciji njezinih hidrofobnih sastojaka (spojevi za pojačavanje okusa i sastojci protiv plaka). Ovisno o prirodi hidrofilnog dijela površinski aktivne molekule, mogu se klasificirati kao anionski, kationski, neionski ili amfoterni. Surfaktanti se upotrebljavaju u koncentracijama u rasponu od 0,5 do 2,5% w/w. Najčešće

korišteni surfaktant je SLS (natrijev dodecil sulfat) koji pripada skupini anionskih surfaktanata, a najčešći amfoterni surfaktant je kokamidopropil betain (2).

Modifikatori viskoznosti i reologije

Primarna funkcija modifikatora viskoznosti i reoloških osobina je proizvodnja gel-faze koja sadrži homogenu raspodjelu svih sastojaka zubne paste te sprječava razdvajanje komponenata tijekom dugih razdoblja skladištenja. Najčešći modifikatori viskoznosti i reologije su karboksimetilceluloza, hidroksietilceluloza, karagenan, ksantanska guma, celuloza guma i umreženi poliakrilati, a koriste se pri koncentracijama u rasponu od 0,5 do 2,0% w/w (2).

Sredstva za zadržavanje vlage

Humektanti se koriste kako bi se izbjeglo odvajanje vode i isparavanje, te kako bi se dobio glatki, sjajni i homogeni izgled zubne paste. Glicerol i sorbitol su najčešće korišteni u tu svrhu jer su kompatibilni s ostalim sastojcima, a ujedno su i najjeftiniji (2).

Okusi

Okusi se prvenstveno dodaju zbog kozmetičko/okusnih razloga. Oni prikrivaju često neugodan okus surfaktanata, osvježavaju dah i imaju sposobnost izazivati senzorne znakove poput hlađenja, zagrijavanja ili trnaca. Najčešće se upotrebljavaju okusi mente, cimeta, limuna i različiti biljni okusi. Okusi su najskuplji i najnestabilniji sastojak, a koriste se u koncentracijama između 0,3 i 2,0% w/w (2).

Zaslađivači

Zaslađivači se dodaju u zubne paste zbog poboljšanja okusa. Svi zaslađivači su umjetni, a najčešće se koristi natrijev saharin ili, iako rijetko, sukraloza. Uobičajeno, zaslađivači se koriste pri koncentracijama ispod 0,5% w/w. Xylitol (obično se koristi pri približno 10% w/w) se također može smatrati zaslađivačem, iako je njegova primarna uloga u prevenciji karijesa (2).

Bojila

Boja pasta od velikog je značaja za svakog potrošača. Većina proizvođača želi bijelo tijesto paste koje se kombinira s različito obojenim prugama. Bjelina se postiže dodavanjem

titanovog dioksida (približno 1% w/w) dok se umjetne boje (otprilike 0,1% w/w) dodaju u svrhu dobivanja obojenih traka ili obojene jezgre (2).

Konzervansi

Zubne paste koje ne sadrže ionski surfaktant često se kombiniraju s konzervansima (oko 0,2% w/w) kako bi se spriječio rast bakterija tijekom dugotrajne pohrane. Najčešće korišteni konzervansi su natrijev benzoat, etil i metil paraben (2).

Voda

Najjeftiniji sastojak koji proizvođači nastoje maksimizirati u formulaciji zubnih pasti jest voda. Ona je važno otapalo za anorganske aktivne sastojke i fluorida. Kako bi se uklonili elementi kalcija koji bi mogli smanjiti stabilnost i bioraspoloživost aktivnih sastojaka, voda mora biti pročišćena. Nedostatak nevedenih formulacija jest taj da se anorganski aktivni sastojci prisutni u krutom stanju moraju solubilizirati pomoću sline, prije nego što stupe u interakciju sa svojim ciljnim tkivom (2).

1.1.3. Sigurnosna pitanja vezana uz sastojke zubnih pasti

Najveću zabrinutost zbog fluoridiranih zubnih pasti potiče toksičnost, izazvana fluorom kroz slučajnu ili namjernu ingestiju. Toksična doza je 5 mg/kg tjelesne težine. To bi iznosilo 33,3 g 1500 ppm zubne paste s fluorom (otprilike 1/3 tube od 75 ml) za dijete s tjelesnom masom od 10 kg. S druge strane, treba uzeti u obzir i gornju granicu unosa fluorida kod djece gdje dolazi do slučajnog/namjernog gutanja pasta za zube tijekom trajanja četkanja. Američka akademija za pedijatriju odredila je dnevnu dozu fluorida od 0,05 do 0,07 mg fluorida/kg tjelesne težine dnevno kao gornju granicu, koja je jednaka 0,3 g 1500 ppm zubne paste s fluorom, ne uzimajući u obzir druge izvore unosa fluora. U odrasloj dobi preporučena tolerantna gornja razina unosa fluorida na dnevnoj bazi je 10 mg (6,6 g 1500 ppm fluoridne pasta za zube) (2).

Sljedeći toksični sastojak koji se često koristi jest SLS koji je povezan s pojavom aftoznih ulkusa. Vodeći proizvođači pasta za zube koriste SLS zbog njegove sposobnosti pjenjenja, prihvatljivog okusa i niskih troškova u odnosu na druge površinski aktivne tvari. Malo zubnih pasti s današnjeg tržišta sadrže surfaktant koji nije SLS (2).

Visoki pH pasta za izbjeljivanje može također iritirati oralnu sluznicu (2).

Triklosan, prema nekim izvještajima, ima sposobnost da u reakciji s vodom proizvodi kloroform koji, ako se udiše u velikim količinama, može uzrokovati depresiju, jetrene probleme i karcinom. Reakcije mekih tkiva nastaju i kao odgovor na esencijalna ulja, dodatke za okus, itd., a manifestiraju se kao direktni iritansi ili alergijska reakcija u ustima, a na usnama kao kontaktni heilitis (1).

1.1.4. Zubne paste s fluorom

Najbolji trenutak za četkanje zubi jest kada imate vremena to učiniti pažljivo. Preporučuje se četkanje dvaput dnevno, bez obilnog ispiranja. Kako se protok sline smanjuje za vrijeme spavanja, što usporava brzinu otpuštanja fluorida, očekivano je najbolje vrijeme prije odlaska u krevet. Nakon četkanja ne preporuča se uzimanje hrane, pića ili medicinskih sirupa (2).

Fluoridirane zubne paste trebaju imati sposobnost isporučiti slobodni ili topljivi fluorid. One mogu sadržavati fluorid u različitim kemijskim oblicima uglavnom kao NaF (natrijev fluorid), Na_2FPO_3 (natrijev monofluorofosfat), $\text{C}_{27}\text{H}_{60}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3$ (olaflur), SnF_2 (kositrene fluorid) ili njihove kombinacije (2).

Četkanje pastama s fluorom uzrokuje prolazno povećanje koncentracije fluora u slini koje traje nekoliko sati. Također, koncentracija fluora u ranoj fazi formiranja biofilma se može održati u većim koncentracijama duže vrijeme, zbog smanjenog klirensa na očetkanim mjestima. Tako fluor pospješuje remineralizaciju na čistim površinama dok na onima pokrivenima biofilmom reducira demineralizaciju. Zbog visokih koncentracija fluora u pastama (1000 – 1500 ppm) očekivano je da se stvori rezervoar CaF_2 koji se otpušta između četkanja. S obzirom na to da je dentin topljiviji od cakline, utjecaj fluoridnih pasta je manji u kontroli dentinskog karijesa, nego caklinskog. Zbog toga, zubne paste s višim koncentracijama fluora (npr. 5000 ppm) pokazale su se učinkovitijima u kontroli karijesa korijena od onih koje imaju uobičajenu koncentraciju (4). *In vitro* istraživanja su pokazala da aminofluorid ima najveći kapacitet remineralizacije cakline, praćen natrijevim fluoridom i natrijevim monofluorofosfatom (2).

Koncentracija fluora do 1000 ppm

Općenito se ne preporuča korištenje paste koja sadrži manje od 1000 ppm fluora te je dokazano da paste od 450 – 500 ppm fluora nemaju razliku u učinku od placebo paste.

Također, postoje dokazi o tome da ne postoji razlika u pojavnosti fluoroze između paste s 400 ppm i 1450 ppm F nakon prve godine života, ako se koristi u veličini zrna graška (3). Klinička efikasnost paste s 500 ppm fluora je slična onoj s 1100 ppm u djece koja nemaju karijes dok su kod djece s karijesom, paste s niskim koncentracijama fluora manje učinkovite (4).

Koncentracija fluora 1000 – 1500 ppm

Paste s koncentracijom fluora 1000 – 1500 ppm su se pokazale kao najučinkovitiji izvor fluora. Prema posljednjim istraživanjima djeca od 2 do 3 godine progutaju 48% paste dok djeca od 6 do 7 godina progutaju 25%. Kako bi se umanjio rizik od dentalne fluoroze u najrizičnijoj skupini (4 – 6 godina) preporučeno je da ne ingestiraju više od 0,1 mg F po kilogramu na dan. S obzirom da je dokazano da su u prevenciji karijesa najvažniji direktni kontakt fluora s caklinom i koncentracija fluora, preporuča se da djeca koriste paste s koncentracijom od 1000 ppm fluora u adekvatnoj količini prema njihovoj dobi (1, 2, 4).

Koncentracija fluora 2500-5000

Više koncentracije fluora u zubnim pastama mogu reducirati karijes do 36%. *In vitro* istraživanja su pokazala da paste s višim koncentracijama fluora imaju veću sposobnost remineralizacije cakline i dentina od onih uobičajene koncentracije i placebo zubnih pasta (3). Takve paste se izdaju na recept te je kod djece mlađe od 6 godina potrebna temeljita procjena rizika u slučajevima onih kod kojih je morbiditet uzrokovan karijesom veći od rizika estetski vidljive fluoroze (5).

1.2. Fluoridi – korištenje i učinak na zdravlje

Najučinkovitiji način za sprečavanje karijesa je korištenje fluoridiranih zubnih proizvoda. Fluor ulazi u tijelo s hranom, disanjem i proizvodima koji sadrže fluorid. Fluor je dio prirodnog okoliša te je sukladno tome prisutan u životu ljudi. Međutim, koncentracija fluorida može varirati od jedne do druge regije. S kemijske točke gledišta, to je najviše elektronegativan i reaktivan element. Budući da je vrlo reaktivan, obično je vezan kao anorganski fluorid i nije pronađen u osnovnom stanju. Fluor je prisutan u litosferi, atmosferi, hidrosferi i biosferi. Velika količina fluora može se naći u stijenama vulkanskog porijekla. Može ući u okoliš kroz vulkanske erupcije, razgradnju stijena i brojne ljudske aktivnosti

(gorenje ugljena, obrada rude, proizvodnja i uporaba gnojiva i industrijskih postrojenja). Fluor se nalazi u svim prirodnim vodama. Morska voda sadrži 1,2 – 1,5 ppm fluorida. Slatkovodne koncentracije su obično niže u rasponu od 0,01 do 0,3 ppm. Visoke koncentracije fluorida u vodi mogu biti prisutne u blizini vrućih izvora vulkanskog podrijetla. Uobičajena akumulacija fluorida iz tla je niska. Flora koja raste u kiselom tlu ima tendenciju akumulirati više fluorida. Postoje neke biljke koje mogu akumulirati nekoliko stotina ppm fluorida (biljke čaja) (6).

Iako je fluorid općenito prisutan u našem svakodnevnom životu, konzumira ga se u malim količinama. Općenito, može se naći u mesu, ribi i žitaricama. U većim koncentracijama se može naći u konzerviranim incunima, konzerviranom voću, mljevenim pilećim mesnim proizvodima (s većim postotkom kostiju), čokoladnom mlijeku i nekim dodatcima za bebe. U nekim zemljama preventivne metode uključuju i fluoridirano mlijeko i sol. Danas se 30 do 80% tržišne soli fluorizira. Sol obično sadrži 250 ppm fluorida dok mlijeko sadrži 2,5 ppm ili najviše 5 ppm fluorida. Proizvodi koji se koriste za oralnu higijenu također su važan način sustavnog unosa fluorida.

Oko 90% fluorida apsorbira se u gastrointestinalnom traktu nakon unošenja (do 25% u želucu i oko 77% u proksimalnom dijelu tankog crijeva). Preostalih 10% izlučuje se u izmetu. Nakon apsorpcije fluorid se prenosi u krvotok i distribuira kroz organizam. U plazmi, fluoridni ioni vezani su na proteine plazme. Koncentracija rijetko prelazi 0,06 ppm. Odrasli zadržavaju oko 36% fluorida dok djeca zadržavaju oko 50% fluorida, 99% je sadržano u mineraliziranim tkivima (kosti i zubi), a 1% se može naći u mekom tkivu. Preostali dio apsorbiranog fluorida izlučuje se kroz bubrege u urin, a izlučivanje kroz slinu i znoj je zanemarivo (6).

1.2.1. Primjena fluorida u dentalnoj medicini i toksikologija

Fluor je prepoznat kao glavni čimbenik u prevenciji zubnog karijesa, bolesti koja ima velike zdravstvene, ekonomske i socijalne utjecaje diljem svijeta. Laboratorijska istraživanja su pokazala kako je fluor najdjelotvorniji u prevenciji karijesa kada se dugotrajno održava njegova niska koncentracija u usnoj šupljini (7, 8).

Fluor se može primjeniti topikalno i sistemski. Topikalni fluoridi jačaju zube već prisutne u ustima, na način da se fluor inkorporira u površinu zubi čineći ih otpornijima na karijes. Topikalna fluoridacija uključuje zubne paste, vodice za ispiranje usta te gelove i

lakove. Sistemski fluoridi su oni koji se nakon ingestije ugrađuju u strukturu zuba. Kada se primjenjuju tijekom faze formiranja zubi, odlažu se kroz cijelu zubnu površinu i omogućuju dugotrajniju zaštitu. Zbog svoje prisutnosti u slini, također mogu osigurati topikalnu zaštitu. Fluor se ugrađuje u plak te na taj način omogućuje remineralizaciju. Izvori sistemskog fluora su voda, sol, mlijeko, dodatci prehrani poput tableta, kapi i pastila te fluor u hrani i pićima (7-10).

Koncentracija fluora u svim proizvodima za oralnu higijenu trebala bi biti poznata korisniku. Najčešće korišteni proizvodi su vodice za ispiranje usne šupljine, zubne paste, topikalni fluoridi, tablete i lakovi. Vodice za ispiranje s 0,2% NaF i 0,4% SnF₂ sadrže 1 mg fluora/ml. Zubne paste otprilike sadrže 1000 ppm F, što je 1 mg F/g. Tablete s fluorom ili kapi služe kao nadopuna fluoru koji se unosi prehranom, a najčešće se pripisuju djeci od rođenja do 13 godina. Američko dentalno udruženje preporučuje količinu od maksimalno 264 mg NaF (120 mg F) kako bi se spriječili fatalni ishodi i ozbiljne toksične reakcije. Važno mjesto za razvoj toksične reakcije jest želudac, budući da fluor uslijed gutanja reagira s HCl želučanog soka, pri čemu se pretvara u jaki iritans (6-10).

Neželjene nuspojave u primjeni fluora mogu se ispoljiti i u obliku kronične i akutne fluoroze. Kronične nuspojave se očituju na mineraliziranim tkivima pa dovode do dentalne ili skeletalne fluoroze, ovisno o dozi. Akutne posljedice variraju od gastrointestinalnih simptoma do smrti. Fluoridi mogu biti smrtonosni u dozi koja prelazi 15 mg/kg tjelesne težine. Zbog svoje reaktivnosti fluor može uzrokovati smrt stanica inaktiviranjem staničnih enzima (7, 9, 10). Također, visoke doze povezuju se i s promjenama na štitnjači, zaostatkom u rastu, bubrežnim promjenama i urolitijazom. Starije osobe, ljudi s deficijencijom kalcija, magnezija i/ili vitamina C te ljudi s kardiovaskularnim i bubrežnim problemima su osjetljiviji na djelovanje fluora (9, 10).

Akutna toksičnost

Do akutne toksičnosti dolazi nakon jednokratnog unosa velike količine fluora. Količina koja se smatra smrtonosnom, a uzeta je oralno, jest 35 – 70 mg F/kg. To je jednako 5 – 10 g NaF za odraslu osobu tešku 70 kg ili 1 – 2 g NaF za dijete teško 15 kg. Prvi simptomi koje osoba doživljava najčešće uključuju mučninu, povraćanje te žareće ili grčevite abdominalne bolove. Može se pojaviti ekscesivna salivacija i suzenje, mukozni iscjedak iz nosa i usta, generalizirana slabost, paraliza mišića za gutanje, karpopedalni spazam ili spazam ekstremiteta, tetanija i generalizirane konvulzije. Puls može biti slab ili pak nezamjetljiv. Krvni tlak često padne do opasno niskih vrijednosti. Budući da je respiracija suprimirana,

dolazi do respiratorne acidoze. Brze mjere za smanjivanje apsorpcije fluora uključuju poticanje povraćanja i unošenje velike količine kalcija u obliku otopine Ca(OH)_2 ili mlijeka. Također, može biti korisno poticanje diureze u svrhu eliminacije fluora. Različite kemijske forme fluora mogu varirati u svom toksičnom potencijalu jer se različito apsorbiraju unutar gastrointestinalnog trakta. Stoga, zbog svoje veće topljivosti, fluor iz natrijevog ili kalijevog fluorida je toksičniji od spojeva koji sadrže di- ili trivalentne katione kao što su kalcij, magnezij ili aluminij (7, 10).

Kronična toksičnost

Kronična toksičnost je uzrokovana dugotrajnim unosom malih količina fluora. Količina fluora od 2 do 8 mg dnevno tijekom niza godina može uzrokovati skeletalnu fluorozu. Gustoća kosti se smanjuje, zglobovi se ukrućuju i postaju bolni. Količina fluora koja se odloži u kosti ovisi o dobi osobe. Više ga se retinira u mladim kostima, nego u kostima starijih osoba (7, 10).

Dentalna fluoroza

Dentalna fluoroza može se opisati kao difuzni simetrični hipomineralizacijski poremećaj ameloblasta. Fluoroza je ireverzibilna i događa se samo prilikom izlaganja fluoru dok je caklina u razvoju. Što je više fluora ingestirano tijekom formiranja i mineralizacije zuba, veći je rizik od ozbiljne manifestacije dentalne fluoroze. Mogu se razdvojiti tri faze unosa fluora: (1) faza formacije, (2) faza mineralizacije i (3) faza nakon završetka mineralizacije. U prvoj fazi se prima uniformno kroz tkivo, u drugoj je unos najveći na mjestima odvijanja mineralizacije, a u trećoj je unos ograničen na rubne dijelove cakline i dentina. Toksični učinak visokih doza fluora je pretežno ograničen na zube i skelet sa sekundarnom zahvaćenošću živčanog sustava. Umjesto kremasto bijele boje, caklina je porozna i opakna (refrakternost svjetla znatno je reducirana zbog defektne strukture caklinskih prizama). Oblačno isprugana caklina s bijelim mrljama, "pokrivena snijegom", žutosmeđim točkama ili smeđim jamicama karakteristika je fluoroze. U ozbiljnijoj formi caklina je strukturno slaba i sklona erozijama i lomu, osobito prilikom preparacije i punjenja. Čak i u blažim oblicima postoji pojačana atricija. Lezije se mikroskopski mogu čak vidjeti i u dentinu. Također dolazi do odlaganja materijala sličnog kosti i na unutrašnjosti pulpne komorice što smanjuje njenu veličinu i interferira s prehranom zuba (7, 10-13).

Otrovanje fluorom i biološki odgovor, koji dovodi do loših učinaka, ovisi o mnogo faktora – koncentraciji fluora u vodi za piće, niskim koncentracijama kalcija i visokoj

alkalnosti vode za piće, ukupnom dnevnom unosu fluora, duljini izloženosti fluoru, dobi i nutritivskoj deficijenciji. Tijekom razvoja zuba stanice zubnog tkiva, posebno ameloblasti, jako su osjetljivi na fluor. Pri relativno niskim dozama (npr. 2 ppm F u vodi) dolazi do pojave malih točki ili pjega koje variraju u boji od bijele do tamnosmeđe. Pri višim dozama zubna struktura je vidljivo promijenjena tako da normalno glatka površina zuba pokazuje hipoplastične nabore (11-13).

Genotoksičnost fluora

Ne postoje istraživanja koja dokazuju genotoksične učinke fluorida u ljudi, ali su brojne provedene na miševima. Ta istraživanja nisu našla dokaze o učinku fluora na kromosome u koštanoj srži i spolnim stanicama, čak ni pri razinama stoput višima od onih u fluoridiranoj vodi. Također, grupa istraživača nije dokazala oštećenja na ljudskim bijelim krvnim stanicama, koje su posebno osjetljive na agense koji uzrokuju genetske mutacije. Ne samo da ih fluor nije ošteti, nego ih je i zaštitio od poznatog mutagena. Pojavljuju se pitanja o učinku fluora na ljudsku reprodukciju, plodnost i stope nataliteta. Vrlo visoke razine fluora su bile povezane sa štetnim učincima na reproduktivne ishode u mnogih životinja. Te koncentracije su bile daleko više (100 – 200 ppm) od onih kojima su ljudi izloženi. Nacionalno vijeće za istraživanje pri Nacionalnoj akademiji znanosti podržava zaključak da konzumiranje optimalno fluoridirane vode nije genetska opasnost. U izjavi navode da je genotoksičnost fluora ograničena na doze puno više od onih kojima su ljudi izloženi, ali čak i kod visokih doza genotoksični učinci nisu uvijek vidljivi, a izloženost genotoksičnim učincima je vjerojatno od nikakvog ili zanemarivog genetičkog značenja (7).

1.3. Mikronukleus test

Bukalni mikronukleus test jest citogenetska metoda za mjerenje genetskih oštećenja, proliferacije stanica, diferencijacije stanica i stanične smrti u deskvaminiranim bukalnim stanicama (14). Test uključuje pregled stanica s ciljem otkrivanja učestalosti stanica s mikronukleusima, ekstranuklearnih tjelešaca koja se sastoje od cijelih kromosoma ili kromosomskih fragmenata koji se nisu uspjeli uklopiti u stanice kćeri tijekom mitoze. Svako tkivo koje sadrži stanice koje se dijele, kao što su epitel cerviksa, jednjaka, mjehura, nosa, bronha i bukalna mukoza, može biti upotrijebljeno za procjenu. Ipak, bukalna mukoza ima prednost s obzirom da je prva u doticaju sa štetnim tvarima (15). Kako je 90% karcinoma

epitelnog podrijetla, bukalna mukoza može poslužiti kao pokazatelj ranih genotoksičnih događaja koji su rezultat potencijalnih karcinogena koji ulaze u tijelo probavnim putem ili inhalacijom (15).

Mikronukleusi u odljuštenim epitelnim stanicama pokazuju genotoksične događaje koji su se dogodili u mitotički aktivnom bazalnom sloju 1 – 3 tjedna ranije. Frekventnost pojave mikronukleusa je mjera pucanja kromosoma u ranim stadijima dijeljenja stanica i njihov broj se povećava uz karcinogene stimuluse puno prije pojave kliničkih simptoma. Ovaj test se koristi za mjerenje biomarkera oštećenja DNK (mikronukleusi i/ili nuklearni pupoljci), citokinetskih defekata (binuklearne stanice), proliferativnog potencijala (učestalost bazalnih stanica) i smrti stanica (kondenzirani kromatin, karioreksa, piknotične i kariolitičke stanice). Potrebno je ustanoviti normalni raspon vrijednosti za različite biomarkere za zdravu kontrolnu skupinu koja nije bila izložena abnormalnim dozama genotoksina i citotoksina. To dopušta ispitivaču identificiranje ključnih varijabli koje utječu na učestalost biomarkera kao što su godine, spol, vitamini B, genotip i pušenje. Također, potrebno je imati informacije o genotoksičnom izlaganju (vrsta toksina, trajanje izloženosti, vrijeme početka izlaganja i vrijeme sakupljanja uzorka, itd.) kako bi se rezultati mogli pravilno interpretirati (15, 16).

Bukalni epitel se sastoji od četiri različita sloja. *Stratum corneum* ili rožnati sloj oblaže sluznicu, a sadrži stanice koje se konstantno ljušte zbog habanja površinskog tkiva. Ispod ovog sloja leže *stratum granulosum* ili granulozni sloj i *stratum spinosum* ili trnasti sloj koji sadrži populacije diferenciranih, apoptotičnih i nekrotičnih stanica. Ispod tih slojeva se nalazi *stratum germinativum* koji sadrži bazalne stanice u aktivnoj diobi i bazalne matične stanice koje proizvode potomstvo koje održava profil, strukturu i integritet epitela. Kako je vrijeme obnove bukalnih stanica od 7 do 21 dana, teoretski je moguće promatrati genotoksične učinke akutnog izlaganja u tom razdoblju (14). Idealno bi bilo uzimati uzorak svakih 7 dana, a nakon akutnog izlaganja tijekom 28 dana i više kako bi se kinetika i opsežnost indukcije biomarkera mogla temeljito istražiti. Kod kroničnog izlaganja preporuča se uzimanje uzorka barem jednom u tri mjeseca (15).

Više čimbenika utječe na brojnost mikronukleusa u oralnim epitelnim stanicama: (a) vrijeme prikupljanja uzorka, (b) metoda prikupljanja uzorka, (c) metoda fiksacije i bojanja uzorka, (d) veličina i izbor uzorka stanica, (e) način analize preparata i (f) druge anomalije jezgre u normalnim i promijenjenim stanicama. Uzorak bukalne sluznice može se uzeti drvenom špatulom, metalnom špatulom, čačalicama, četkicama za zube i citološkim četkicama ovlaženima vodom ili puferom s unutrašnjosti jednog ili oba obraza. Citološke četkice su se pokazale najefektivnijima u prikupljanju velikog broja stanica. Stanice se

fiksiraju na predmetnom stakalcu, a nakon fiksacije boje se specifičnim bojama za DNK (15-17).

Parametri za biranje stanica su: intaktna citoplazma i relativno ravan položaj stanice na stakalcu, malo ili nikakvo preklapanje susjednih stanica, uz malu količinu ili bez debrisu te normalna i intaktna jezgra, a njen opseg gladak i izražen. Tolbert i suradnici (17) preporučuju pregled barem 1000 stanica, a ako je među njima pronađeno manje od pet stanica s mikronukleusima treba povišiti broj do 2000 – 3000.

Stanica s mikronukleusom

Preporučeni kriteriji za identificiranje mikronukleusa su: (a) mora biti manji od trećine promjera jezgre, ali dovoljno velikog i raspoznatljivog oblika, (b) boja mikronukleusa mora intenzitetom odgovarati jezgri, (c) tekstura mikronukleusa mora biti slična jezgri, (d) mikronukleusna tvorba mora biti na istoj žarišnoj ravnini kao jezgra i (e) mikronukleusna tvorba ne smije se preklapati s jezgrom. Učestalost mikronukleusa u stanicama bukalne mukoze je najčešće od 0,5 – 2,5 mikronukleusa/1000 stanica. Stanice s multiplim mikronukleusima su rijetkost, a češće se pojavljuju u osoba izloženima zračenju ili drugim genotoksičnim agensima (Slika 1) (14, 17).

Binuklearna stanica

Stvaranje binuklearnih stanica se povezuje s neuspjehom citokineze koja nastaje zbog pogreške u stvaranju mikrofilamentnog prstena ili zbog zaustavljanja staničnog ciklusa kao rezultata aneuploidije ili razdvajanja telomera. Da bi se stanica smatrala binuklearnom, treba zadovoljiti sljedeće kriterije: (a) prisutne su dvije jezgre unutar stanice, (b) jezgre su slične veličine i inteziteta obojenja, (c) jezgre mogu biti vrlo blizu ili se dodirivati. (Slika 1) (14, 17).

Stanica s nuklearnim pupoljkom (pup)

Nuklearni pupoljci predstavljaju amplifikaciju DNK. Najvjerojatniji mehanizam nastanka je eliminacija amplificirane DNK, kompleksa popravka DNK i dodatnih kromosoma aneuploidnih stanica. Stanice s nuklearnim pupoljcima imaju sljedeće karakteristike: (a) glavna jezgra ima oštro suženje na jednom kraju formirajući pupoljak nuklearnog materijala, (b) pupoljci imaju istu teksturu, žarišnu ravninu i intenzitet obojenja kao i glavni nukleus, (c) pupoljci su povezani s glavnim nukleusom s uskom ili širokom nukleoplazmatskom vrpcom, (d) nuklearni pupoljci imaju promjer koji je 1/3 do 1/16 glavnog

nukleusa, ali u rijetkim slučajevima može biti iste veličine ili čak i veći od glavnog nukleusa (Slika 1) (14, 17).

Stanica s kariolizom

Karioliza predstavlja napredni stadij nekroze i apoptoze. Da bi se stanica smatrala kariolitičnom treba zadovoljiti sljedeće kriterije: (a) angularnog je i plosnatog oblika s citoplazmom koja je veličine završno diferencirane stanice, (b) stanica ima razgrađenu jezgru i (c) nemaju jezgru koja sadrži DNK niti druge strukture koje se mogu obojiti (Slika 1) (14, 17).

Stanica s karioreksom

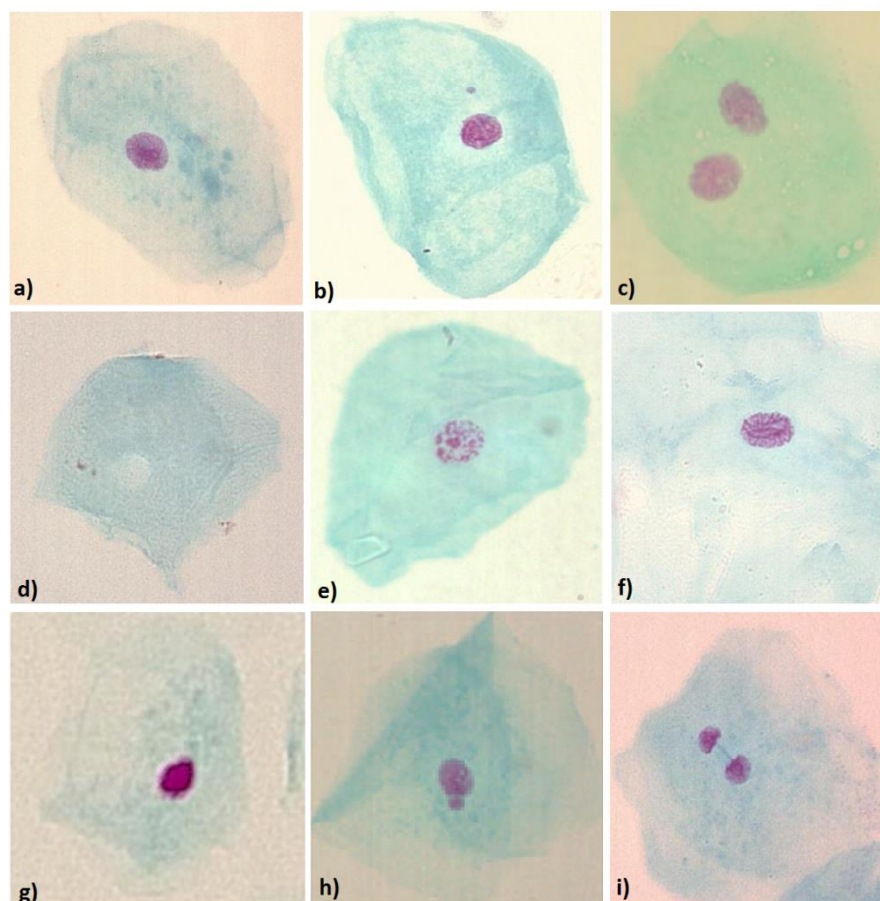
Karioreksa je tipični kasniji stadij apoptoze. Kriteriji koji određuju takvu stanicu su: (a) stanica nema integritet jezgre, (b) jezgra sadrži gušće agregirani kromatin od onoga u stanicama s kondenziranim kromatinom i (c) jezgra može također pokazivati ekstenzivnu fragmentiranost što ukazuje na uznapredovalu nuklearnu fragmentaciju (Slika 1) (14, 17).

Stanica s piknotičnom jezgrom

Piknotične stanice su terminalno diferencirane stanice koje imaju sitan, skupljen, intenzivno obojen nukleus. Promjer mu je obično jednu do dvije trećine jezgre u normalnim terminalno diferenciranim stanicama. Način na koji one nastaju nije potpuno razjašnjen, ali njihova učestalost je u pozitivnoj korelaciji s učestalosti stanica s karioreksom i s kondenziranim kromatinom što upućuje na to da su to stanice u procesu umiranja. Kriteriji za potvrđivanje ovih stanica su: (a) stanica je angularna i plosnata s citoplazmom koja je veličine završno diferencirane stanice, (b) nukleus je malen i skupljen s promjerom $1/3$ do $2/3$ potpuno diferencirane živuće stanice i (c) nukleus je ujednačeno intenzivno obojen. (Slika 1) (14, 17).

Stanica s kondenziranim kromatinom

Kondenzirani kromatin predstavlja stadij apoptoze koji se događa zbog brze proteolize nuklearnih matriksnih proteina. Karakteristike ovih stanica su: (a) angularne su i plosnate s citoplazmom koja je veličine završno diferencirane stanice, (b) nukleusi pokazuju prugasti uzorak paralelnih traktova kondenziranog kromatina i (c) izražena mjesta kondenziranog kromatina imaju intenzivniju boju od ostatka nukleusa (Slika 1) (14, 17).



Slika 1. Odljuštene oralne stanice epitela pokazuju različite nuklearne anomalije na 1000x povećanju: (a) Diferencirana stanica, (b) Stanica s mikronukleusom, (c) Binuklearna stanica, (d) Stanica s kariolizom, (e) Stanica s karioreksom, (f) Stanica s kondeziranim kromatinom, (g) Stanica s piknotičkom jezgrom, (h) Stanica s pupom i (i) Stanica s mostom.

Preuzeto i prilagođeno iz: 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):100-1.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Posljednjih se godina, osim o korisnim učincima fluorida, počelo uvelike pričati i o mogućim nuspojavama. Primjena fluora u relativno niskim koncentracijama sprječava razvoj karijesa dok njegova primjena u visokim koncentracijama može dovesti do zubne fluoroze. Dosad su provedena brojna *in vitro* istraživanja o utjecaja fluorida na ljudske i druge stanice, međutim nema provedenih *in vivo* istraživanja na ljudima o njihovoj biokompatibilnosti, posebno u vezanom obliku unutar formulacije zubne paste.

Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti pojavnost broja stanica s mikronukleusom, nuklearnim pupom, nuklearnim mostom, binuklearnih stanica, stanica s karioreksom, kondenziranim kromatinom, piknotičkom jezgrom i kariolizom kod ispitanika koji su koristili komercijalno široko dostupne zubne paste s fluorom i bez fluora istog proizvođača i sličnog sastava. Dakle, glavni cilj ovog istraživanja bio je ustanoviti postoji li razlika u učestalosti mikronukleusa i drugih jezgrinih anomalija kod ispitanika pri korištenju zubnih pasta s fluorom i bez fluora.

Hipoteza:

- zubne paste s fluorom imaju veći genotoksičan i citotoksičan učinak na stanicama bukalne sluznice u odnosu na zubne paste bez fluora.

3. MATERIJALI I METODE

Ova *in vivo* longitudinalna istraživanja bila su usmjerena prema procjeni pojavnosti mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija (karioreksa, karioliza, piknoza, kondenzirani kromatin, most, pup, binuklearne stanice) kod ispitanika koji su koristili komercijalno široko dostupne zubne pasta bez i s fluorom istog proizvođača i sličnog sastava. Primjenom mikronukleus testa pratio se utjecaj zubnih pasta na ljudskim bukalnim stanicama, ovisno o vremenu koje je prošlo od početka primjene istih.

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

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na 40 ispitanika, studenata Studija dentalne medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Ukupno je bilo 12 muškaraca i 28 žena, starih između 20 i 26 godina (srednja dob 23.18 ± 1.48). Ispitanici su bili podijeljeni u dvije brojčano jednake skupine (po 20 osoba) ovisno o kombinaciji korištenih zubnih pasta. U prvoj skupini su se koristile zubne paste Sensodyne Classic (GlaxoSmithKline, UK) i Sensodyne Fluor (GlaxoSmithKline, UK), a u drugoj Plidenta 15 sekundi (Neva d.o.o., HR) i Plidenta Sensitiv (Neva d.o.o., HR). Dodijeljene zubne paste ispitanici su koristili ukupno četiri mjeseca. Prva dva mjeseca su koristili pastu bez fluora, a nakon toga, iduća dva mjeseca onu s fluorom istog proizvođača i sličnog sastava. Paste su se koristile minimalno dvaput dnevno, ujutro i navečer, u trajanju 2 – 3 minute. U isto vrijeme, ispitanici nisu koristili pomoćna sredstva za oralnu higijenu, kao što je tekućina za ispiranje usne šupljine ili topikalnu fluoridaciju.

Od svakog ispitanika je uzeta detaljna medicinska i dentalna anamneza. U strukturirani upitnik, prilagođen ovom istraživanju, svi su ispitanici unijeli odgovore na pitanja vezana uz demografske čimbenike (dob, spol), osobne čimbenike (zdravstveno stanje, uporaba lijekova, izloženost zračenju), životne navike (pušenje, konzumacija alkohola), prehrambene navike i oralno higijenske navike. Pojedinci koji su pušili tri ili više cigareta dnevno, najmanje godinu dana, smatrani su pušačima. Oni koji su konzumirali dvije ili više jedinica alkohola, tri ili više puta tjedno, nisu uključeni u studiju kao ni pacijenti s oralnim

lezijama, poviješću malignog oboljenja te oni izloženi materijalima koji se koriste u ortodonciji i/ili u mobilnoj i fiksnoj protetici. Kriterij prema kojem su se birali ispitanici koji su sudjelovali u istraživanju bio je da budu potpuno zdravi, bez sistemskih oboljenja. U istraživanje su bili uključeni samo punoljetni pacijenti koji su dobrovoljno pristali na sudjelovanje u istraživanju, s naglaskom na činjenicu da je svaki ispitanik prije potpisivanja informiranog pristanka i suglasnosti, u potpunosti bio upoznat sa svrhom rada.

3.2. Materijali

U istraživanju su se koristile četiri zubne paste, dvije vrste bez fluora Sensodyne Classic (GlaxoSmithKline, UK) i Plidenta 15 sekundi (Neva d.o.o., HR) te dvije s fluorom Sensodyne Fluor (GlaxoSmithKline, UK) i Plidenta Sensitiv (Neva d.o.o., HR). Svojstva zubnih pasti i njihov sastav, kako je navedeno od strane proizvođača, prikazani su u Tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Sastav zubnih pasta Sensodyne Classic i Sensodyne Fluor korištenih u istraživanju prema proizvođaču.

Zubna pasta	Proizvođač	Fluor	Glavni sastojci
Sensodyne Classic	GalaxoSmithKline, UK	Ne sadrži fluor	Voda, Glicerol, Sorbitol, Stroncijev klorid heksahidrat, Kalcijev karbonat, Silica, Hidroksimetilceluloza, Natrij metil cocoyl taurat, Aroma, PEG.49, Stearat, Natrij saharin, Cinamal, Limonen, CI 77891, CI 45430
Sensodyne Fluor	GalaxoSmithKline, UK	Natrij fluorid 1440 ppm	Voda, Sorbitol, Glicerol, Kalijev nitrat, Cocamidopropyl betain, Aroma, Ksantan guma, Natrij saharin, Pentanatrij trifosfat, PEG-6, Natrij metil cocoyl taurat

Tablica 2. Sastav zubnih pasta Plidenta 15 sekundi i Plidenta Sensitiv korištenih u istraživanju prema proizvođaču.

Zubna pasta	Proizvođač	Fluor	Glavni sastojci
Plidenta 15 sekundi	Neva d.o.o., HR	Nema fluora	Voda, Hidrirana silika, Sorbitol; Glicerol, Pentanatrij trifosfat, Natrij C14-16 Olefin sulfonat, Celulozna guma, Aroma, Lactobacillus, Natrijev sulfat, Titanijev dioksid, Propilen glikol, Saharin, Humulus lupulus cvjetni ekstrakt, Limunska kiselina, Natrijev hidroksid, CI 42090, Limonen
Plidenta Sensitiv	Neva d.o.o., HR	Natrijev fluorid 1310 ppm	Voda, Hidrirana silica, Sorbitol, Glicerol, Kalijev nitrat, Natrij C14-16, Olefin sulfonat, Propilen glikol, Aroma, Celulozna guma, Arginin, Titanijev dioksid, Saharin, Eugenia Caryophyllus cvjetni ekstrakt, CI 45430

3.3. Uzorkovanje stanica

Uzorci epitelnih stanica uzeti 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 (T0 – kontrola prije korištenja ispitivanih zubnih pasta, T1 – mjesec dana od početka korištenja zubne paste bez fluora, T2 – dva mjeseca od početka korištenja zubne paste bez fluora, T3 – mjesec dana od početka korištenja zubne paste s fluorom i T4 – dva mjeseca od početka korištenja zubne paste s fluorom).

Od svih sudionika istraživanja zatraženo je da se jedan sat prije uzorkovanja suzdrže od pušenja, jela te konzumacije alkoholnih pića. Također, neposredno prije uzimanja uzorka,

svi su ispitanici triput isprali usnu šupljinu vodovodnom vodom da bi se odstranile 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) te su stakalca ostavljena da se osuše, nakon čega su obojana s 5% otopinom Giemsa u trajanju od 10 minuta, isprana destiliranom vodom i osušena na zraku. Obrada se provela svjetlosnim mikroskopom Olympus CX 40 (Olympus, Tokio, Japan) pod 400x povećanjem, s tim 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 u duplikatu. Učestalost pojavljivanja nuklearnih abnormalnosti, poput binuklearnih stanica, kariolize, kariorekse, mostova i jezgrinih pupoljaka, procijenjena je i kvalificirana prema Tolbert i sur. (17). Da bi se mikronukleus računao kao takav, trebao je ispuniti sljedeće uvjete: a) da se sastoji od nuklearnog materijala, b) da je potpuno odvojen od matične jezgre, c) da je manji od 1/3 promjera glavne jezgre, d) da je glatkog, ovalnog ili okruglog oblika, e) da je u istoj ravnini fokusa i f) da je 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), kondenzirani kromatin, piknoza (mala jezgra), jezgrini pupoljci (prethodnici mikronukleusa) i nukleoplazmatski mostovi (jezgre međusobno spojene mostom) bilježile su se odvojeno.

3.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je programski paket Statistica 13 (Dell Software, Kalifornija, SAD). Za određivanje osnovnih statističkih parametara (srednje vrijednosti, standardne pogreške, standardne devijacije i relativne standardne devijacije, medijana te minimalne i maksimalne vrijednosti) korištena je metoda deskriptivne statistike. Uz pomoć analize varijance i *post hoc* Studentovog t-testa, utvrđene su razlike u broju mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija unutar grupe i između pojedinih grupa ispitanika. Opći regresijski model iz lineranog/nelinearnog regresijskog modela i kanonska korelacijska

analiza su korištene za procjenu utjecaja prediktorskih varijabli (dob, spol, zdravstveno stanje, korištenje lijekova, izloženost rendgenskom zračenju, prehrambene navike, dentalni status, osobne navike) na zavisne varijable (mikronukleus, binuklearne stanice, nukleoplazmatski mostovi, nuklearni pupovi, piknoza, kondenzirani kromatin, karioliza i karioreksa). Za opis populacije te računanje Parsonovih koleracijskih koeficijenata korištena je metoda osnovne statistike. Za utvrđivanje odnosa između pojedinih varijabli korišteni su napredni regresijski modeli, a rezultati su prikazani u obliku Pareto dijagrama. U svim testovima korištena je razina značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI

Ovo istraživanje je uključivalo 40 sudionika, 28 žena i 12 muškaraca u rasponu od 20 do 26 godina ($23,18 \pm 1,48$). Sudionici su bili podijeljeni u dvije jednake skupine. Prva skupina se sastojala od 20 ispitanika (14 žena i 6 muškaraca), raspona godina od 21 do 26 godina (srednja dob $23 \pm 1,54$ godine). Druga skupina se također sastojala od 20 ispitanika (14 žena i 6 muškaraca), raspona godina od 20 do 24 (srednja dob $22,75 \pm 1,33$ godine). Prva skupina je koristila zubne paste robne marke Sensodyne (Sensodyne Classic i Sensodyne Fluor), a druga zubne paste robne marke Plidenta (Plidenta 15 sekundi i Plidenta Sensitiv).

Osnovni statistički parametri korišteni za dobivanje rezultata mikronukleus testa u bukalnim stanicama prije i nakon upotrebe testiranih pasta, prikazani su u Tablicama 3 i 4 te na Slikama 2 i 3.

Tablica 3. Osnovni statistički parametri za ispitivane varijable mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika zubnim pastama robne marke Sensodyne, na 1000 prebrojanih bukalnih stanica.

Parametri mikronukleus testa		Sensodyne Classic			Sensodyne Fluor	
		T0	T1	T2	T3	T4
Mikronukleus	$\bar{X}$	0,85	0,60	0,60	0,65	0,50
	(SD)	(0,745)	(0,598)	(0,598)	(0,598)	(0,513)
Nukleoplazmatski pup	$\bar{X}$	0,65	0,25	0,45	0,35	0,45
	(SD)	(0,813)	(0,444)	(0,605)	(0,587)	(0,510)
Nukleoplazmatski most	$\bar{X}$	0,25	0,20	0,30	0,85	0,45
	(SD)	(0,444) ^a	(0,410) ^b	(0,923) ^c	(0,671) ^{a, b, c}	(0,686)
Binuklearna stanica	$\bar{X}$	2,20	3,65	2,25	2,80	3,30
	(SD)	(1,240) ^d	(1,387) ^{d, e}	(1,803) ^e	(1,508)	(1,729)
Karioreksa	$\bar{X}$	0,65	0,55	0,40	0,30	0,85
	(SD)	(1,268)	(0,686)	(0,681)	(0,571) ^f	(0,933) ^f
Kondenzirani kromatin	$\bar{X}$	0,70	0,45	0,10	0,40	0,20
	(SD)	(0,733) ^g	(0,759)	(0,308) ^{g, h}	(0,503) ^h	(0,523)
Piknoza	$\bar{X}$	0,10	0,00	0,05	0,02	0,00
	(SD)	(0,308)	(0,000) ^h	(0,224)	(0,410) ^{h, i}	(0,000) ⁱ
Karioliza	$\bar{X}$	0,25	0,45	0,05	0,05	0,35
	(SD)	(0,444)	(0,686)	(0,224)	(0,224)	(0,671)

*Unutar istog reda, isto slovo označuje statistički značajnu razliku među testiranim grupama ($P < 0,05$); $\bar{X}$ – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, T0 – kontrola prije korištenja ispitivanih zubnih pasta, T1 – mjesec dana od početka korištenja zubne paste bez fluora, T2 – dva mjeseca od početka korištenja zubne paste bez fluora, T3 – mjesec dana od početka korištenja zubne paste s fluorom i T4 – dva mjeseca od početka korištenja zubne paste s fluorom.

Tablica 4. Osnovni statistički parametri za ispitivane varijable mikronukleus testa prije i nakon izloženosti ispitanika zubnim pastama robne marke Plidenta, na 1000 prebrojanih bukalnih stanica.

Parametri mikronukleus testa		Plidenta 15 sekundi			Plidenta Sensitiv	
		T0	T1	T2	T3	T4
Mikronukleus	$\bar{X}$ (SD)	0,95 (0,745)	0,70 (0,657)	0,55 (0,510) ^a	1,15 (0,875) ^a	0,95 (0,945)
Nukleoplazmatski pup	$\bar{X}$ (SD)	0,20 (0,366) ^b	0,10 (0,366) ^c	0,05 (0,410) ^{d, r}	0,25 (0,444) ^{b, c, d}	0,10 (0,447) ^r
Nukleoplazmatski most	$\bar{X}$ (SD)	0,30 (0,470) ^{e, f, g}	0,05 (0,224) ^e	0,00 (0,000) ^{f, h}	0,00 (0,000) ^{g, i}	0,20 (0,410) ^{h, i}
Binuklearna stanica	$\bar{X}$ (SD)	3,80 (3,220)	4,50 (3,364)	4,10 (2,511)	4,75 (2,511)	4,75 (2,049)
Karioreksa	$\bar{X}$ (SD)	0,50 (0,745) ^{j, k}	0,15 (0,657) ⁱ	0,00 (0,520) ^{k, l, m}	0,30 (0,875) ^m	0,25 (0,945) ^l
Kondenzirani kromatin	$\bar{X}$ (SD)	0,30 (0,470) ⁿ	0,30 (0,733)	0,50 (0,761) ⁿ	0,20 (0,410)	0,20 (0,410)
Piknoza	$\bar{X}$ (SD)	0,15 (0,366)	0,15 (0,366)	0,20 (0,410)	0,25 (0,444)	0,10 (0,447)
Karioliza	$\bar{X}$ (SD)	0,24 (0,437) ^o	0,55 (0,759)	0,25 (0,555) ^p	0,75 (0,910) ^{o, p}	0,55 (0,759)

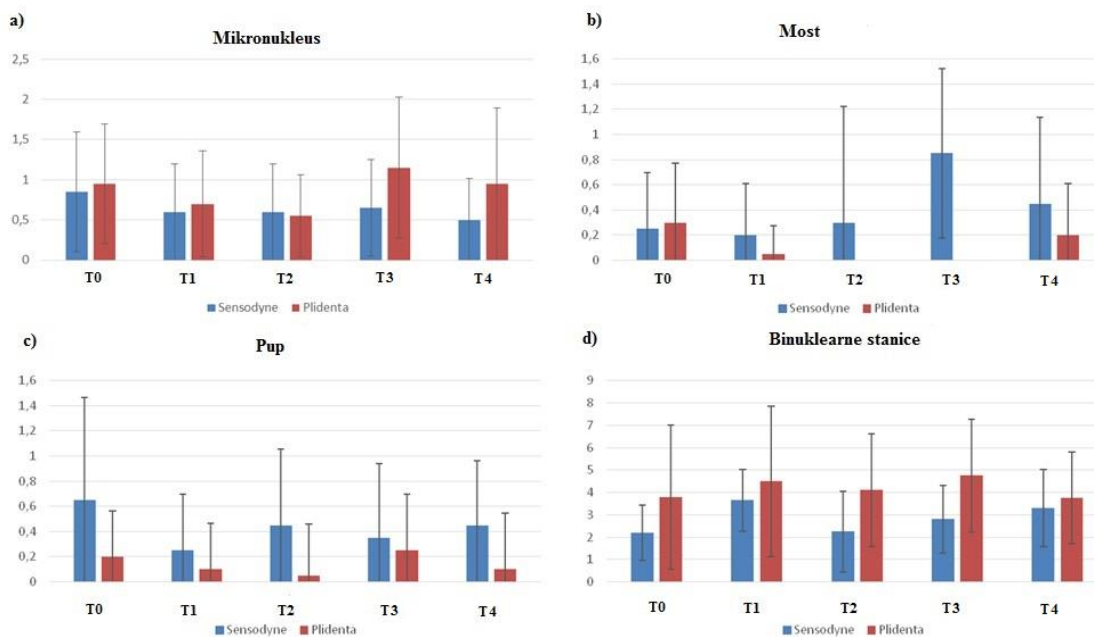
*Unutar istog reda, isto slovo označuje statistički značajnu razliku među testiranim grupama ($P < 0,05$); $\bar{X}$ – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, T0 – kontrola prije korištenja ispitivanih zubnih pasta, T1 – mjesec dana od početka korištenja zubne paste bez fluora, T2 – dva mjeseca od početka korištenja zubne paste bez fluora, T3 – mjesec dana od početka korištenja zubne paste s fluorom i T4 – dva mjeseca od početka korištenja zubne paste s fluorom.

Analiza varijance potvrdila je statistički značajnu razliku između testiranih skupina koje su dalje bile podijeljene prema duljini izloženosti i prema korištenim zubnim pastama te su testirane za sljedeće parametre: broj stanica s mikronukleusom i binuklearne stanice, stanica s mostovima, pupovima, piknozom, kondenziranim kromatinom, karioreksom i kariolizom. Razlike za parametre mikronukleus testa prije i nakon korištenja testiranih zubnih pasta, s obzirom na vrijeme proteklo od početka korištenja istih, dodatno su potvrđene Studentovim t-testom.

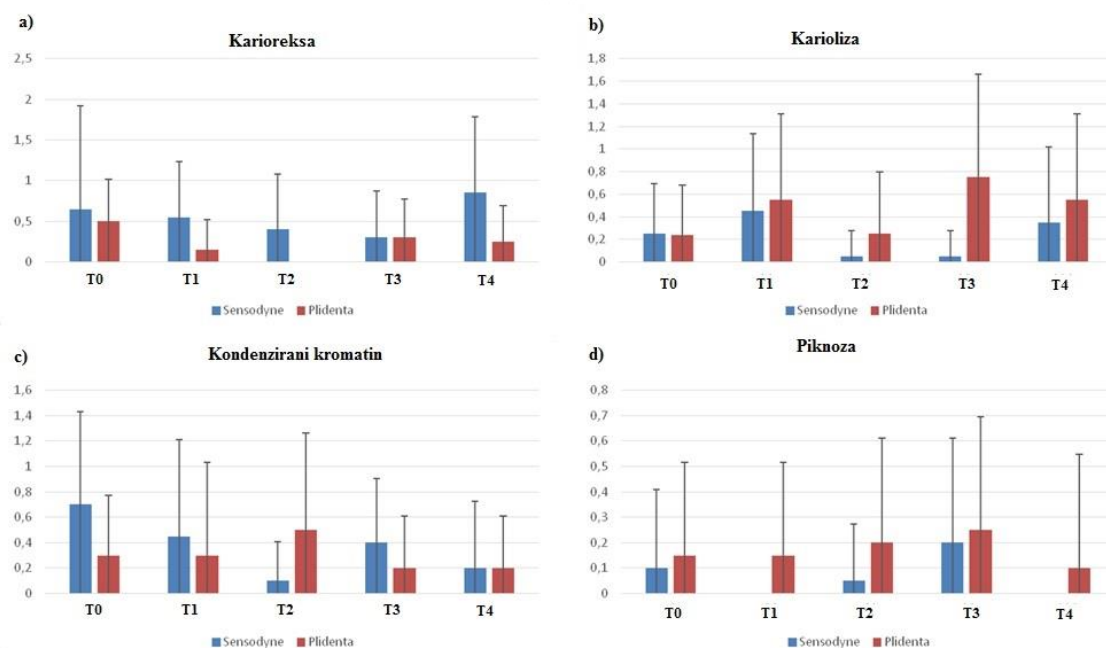
Kod grupe ispitanika koja je koristila paste robne marke Sensodyne, nakon prvih 30 dana korištenja paste koja nije imala fluor uočen je značajan porast broja binuklearnih stanica

u odnosu na početne vrijednosti ($P = 0,001$). Nakon 60 dana od početka korištenja testirane paste, broj binuklearnih stanica značajno je pao u odnosu na povećanje koje je uslijedilo nakon 30 dana korištenja ($P = 0,009$) te se približio vrijednostima na početku istraživanja. Nakon 60 dana korištenja zubne paste bez fluora došlo je i do povećanja broja stanica s kondenziranim kromatinom u odnosu na početne vrijednosti ($P = 0,002$). Potom je ispitanicima dana na korištenje zubna pasta istog proizvođača, ali s fluorom. Nakon 30 dana korištenja te paste uočeno je značajno povećanje broja stanica s mostom u odnosu na početne vrijednosti ($P = 0,002$) kao i u odnosu na vrijednosti paste bez fluora nakon 30 i 60 dana korištenja ($P = 0,001$ i $P = 0,038$). Važno je spomenuti da je, nakon početka korištenja paste s fluorom, uočen i porast piknotičnih stanica u odnosu na vrijeme kad je ispitanik koristio pastu bez fluora 30 dana ($P = 0,042$), te porast broja stanica s kondenziranim kromatinom u odnosu na 60 dana korištenja zubne paste bez fluora ($P = 0,30$). Nastavkom korištenja paste s fluorom kroz sljedećih 30 dana (60 od početka korištenja) broj piknotičnih stanica se smanjio ($P = 0,042$), a broj stanica s karioreksom se značajno povećao ($P = 0,032$) u odnosu na vrijednost 30 dana korištenja iste paste.

Kod druge grupe ispitanika, koji su koristili paste robne marke Plidenta, nakon prvih 30 dana korištenja zubne paste bez fluora uočeno je značajno smanjenje broja stanica s karioreksom ($P = 0,018$) i mostom ($P = 0,041$) u odnosu na početne vrijednosti. Nakon 60 dana korištenja iste paste bez fluora, broj stanica s karioreksom i mostom je u padu i vrijednosti su statistički značajno smanjene u odnosu na početne vrijednosti ($P = 0,000$ i $P = 0,010$), ali je došlo do povećanja broja stanica s kondenziranim kromatinom ($P = 0,002$) prema početnim vrijednostima. U nastavku istraživanja, ispitanicima su dane na korištenje zubne paste iste robne marke, ali s fluorom. Nakon 30 dana korištenja, uočeno je značajno smanjenje broja stanica mosta ($P = 0,010$) dok je broj stanica s pupom bio povećan ($P = 0,036$) u odnosu na početne vrijednosti, ali i na vrijednosti kada su ispitanici koristili paste bez fluora 30 i 60 dana ($P = 0,006$ i $P = 0,006$). Povećao se i broj stanica s kariolizom u odnosu na početne vrijednosti ($P = 0,033$) kao i u odnosu na 60-dnevno korištenje paste bez fluora ($P = 0,044$). Ovdje je važno uočiti kako je, nakon uključenja paste s fluorom, značajno porastao i broj stanica s mikronukleusom ($P = 0,013$) i karioreksom ($P = 0,010$) u odnosu na 60 dana korištenja paste bez fluora. Nakon daljnjeg nastavka korištenja paste s fluorom, broj stanica s pupom, mostom i karioreksom se povećao u odnosu na isto vrijeme korištenja pasta bez fluora ($P = 0,019$, $P = 0,042$ i $P = 0,021$; redom), kao i broj stanica mosta u odnosu na 30-dnevno korištenje iste paste ($P = 0,042$).



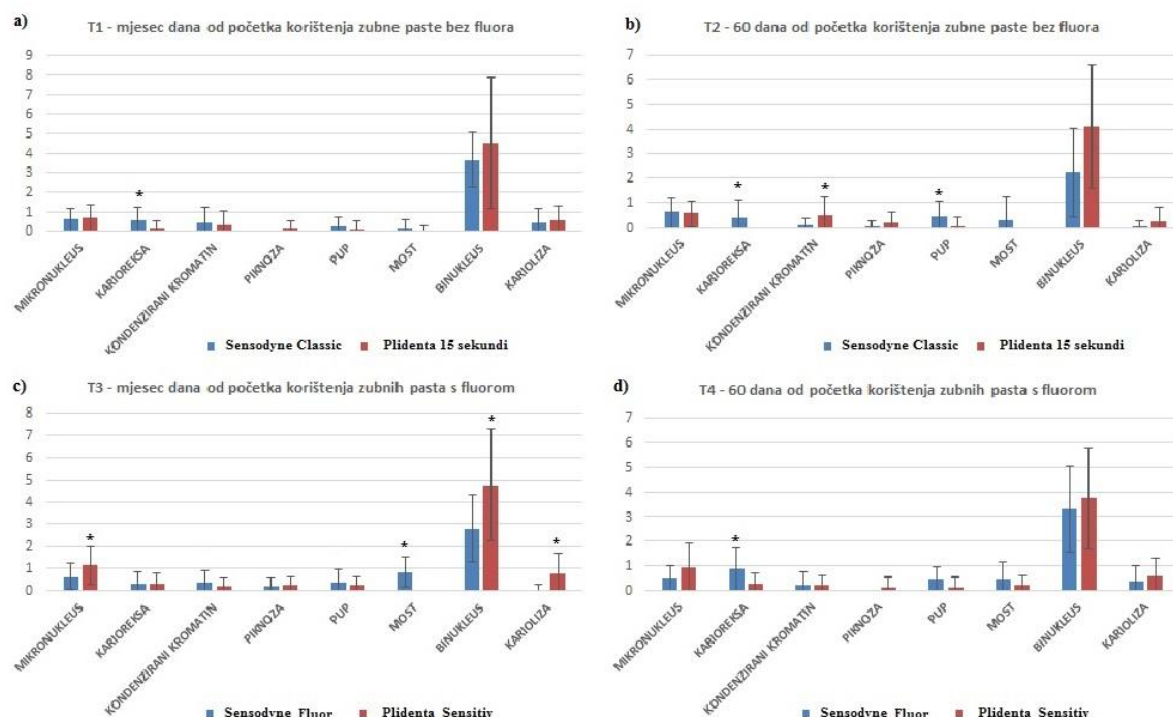
Slika 2. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa (mikronukleus, most, pup, binuklearna stanica) prije i nakon izloženosti ispitanika testiranim zubnim pastama robnih marki Sensodyne i Plidenta, na 1000 prebrojanih bukalnih stanica.



Slika 3. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa (kariorekxa, karioliza, kondenzirani kromatin i piknoza) prije i nakon izloženosti ispitanika testiranim zubnim pastama robnih marki Sensodyne i Plidenta, na 1000 prebrojanih bukalnih stanica.

4.1. Usporedba tretmana

Student T test, prema vremenu izloženosti i vrsti korištene zubne paste, pokazao je statistički značajnu razliku između testiranih skupina za parametre kariorekse kod korištenja zubnih pasta bez fluora nakon 30 dana ($P = 0,029$) (Slika 4a); kariorekse, kondenziranog kromatina i nuklearnih pupova za paste bez fluora nakon 60 dana korištenja ($P = 0,007$, $P = 0,333$ i $P = 0,001$; redom) (Slika 4b); mikronukleusa, nuklearnih mostova, kariolize i binuklearnih stanica za paste s fluorom nakon 30 dana korištenja ($P = 0,027$, $P = 0,000$, $P = 0,003$ i $P = 0,000$; redom) (Slika 4c) te karioreksu među pastama s fluorom nakon 60 dana korištenja ($P = 0,015$) (Slika 4d).



Slika 4. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa prema vremenu izloženosti i vrsti korištene zubne paste, na 1000 prebrojanih bukalnih stanica.

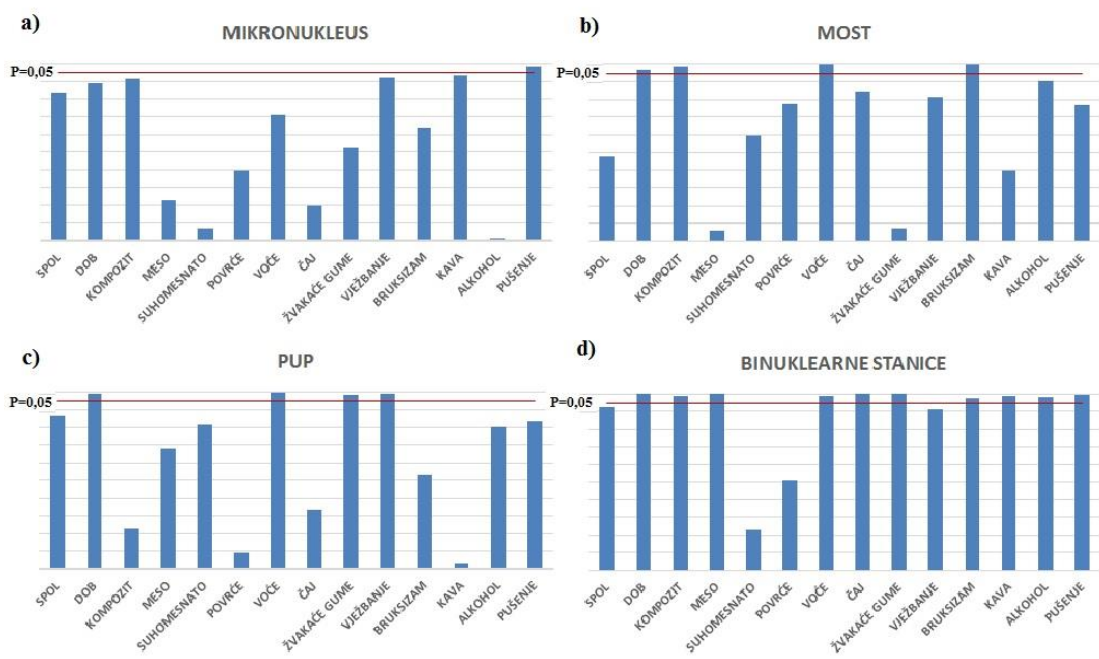
* $P < 0,05$.

4.2. Višestruka regresijska analiza

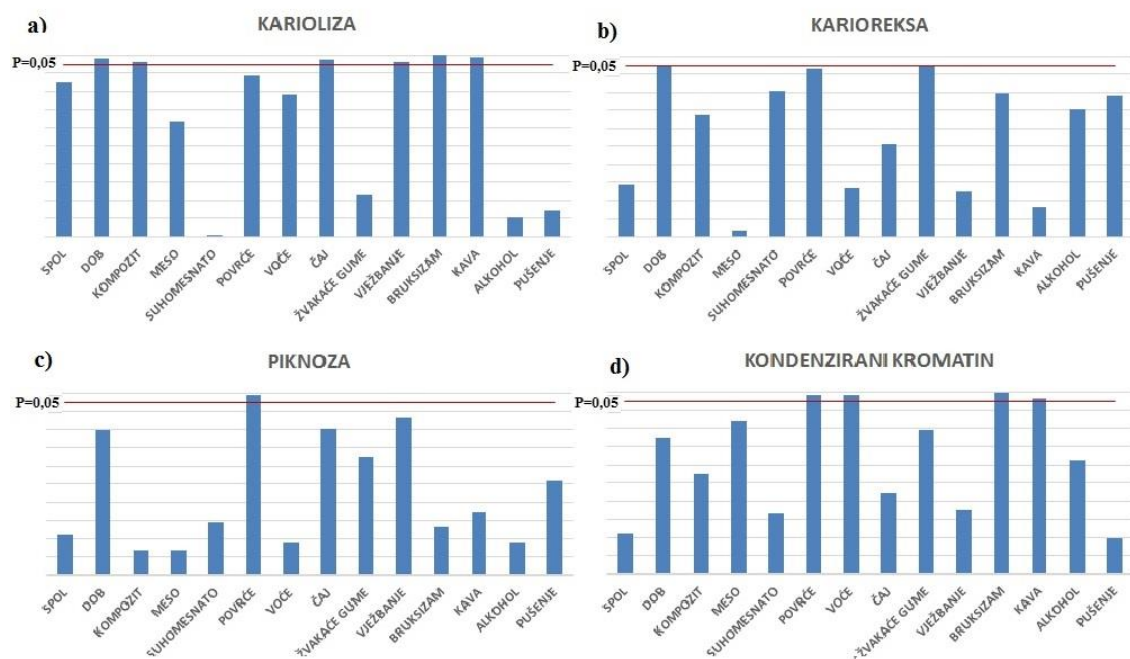
Ovisnost parametara mikronukleus testa o svim prediktorskim varijablama u ukupnoj ispitnoj skupini, utvrđena je generalnim regresijskim modelom i prikazana u obliku Pareto dijagrama (Slika 5 i 6).

Utjecaj na incidenciju broja stanica s mikronukleusom, od ispitivanih prediktorskih varijabli, jedino ima pušenje ($\beta = 0,765$; $P = 0,018$) (Slika 5a). Dob ispitanika, broj kompozitnih ispuna ($\beta = -0,040$; $P = 0,016$), učestalost konzumacije voća ($\beta = -0,210$; $P = 0,000$) te bruksizam ($\beta = -0,732$; $P = 0,001$) utječu na pojavnost stanica s nuklearnim mostom (Slika 5b). Nadalje, dob ($\beta = 0,375$; $P = 0,011$), učestalost konzumacije voća ($\beta = -0,386$; $P = 0,001$), vježbanje ($\beta = 0,515$; $P = 0,009$) i korištenje žvakaćih guma ($\beta = 0,018$; $P = 0,018$) imaju utjecaj na pojavnost stanica s nuklearnim pupom (Slika 5c). Statistički je potvrđeno da značajan učinak na pojavu binuklearnih stanica imaju sljedeće varijable: dob ($\beta = 1,839$; $P = 0,000$), broj kompozitnih ispuna ($\beta = 0,205$; $P = 0,008$), učestalost konzumacije mesa ($\beta = -6,409$; $P = 0,000$), voća ($\beta = 0,632$; $P = 0,013$), čaja ($\beta = 3,199$; $P = 0,000$),

žvakaćih guma ($\beta = -2,837$; $P = 0,000$), kave ($\beta = 1,164$; $P = 0,007$), alkohola ($\beta = -0,653$; $P = 0,019$), pušenje ($\beta = -2,218$; $P = 0,000$) te bruksizam ($\beta = -2,304$; $P = 0,023$) (Slika 5d). Karioliza je u ovisnosti s dobi ispitanika ($\beta = -0,173$; $P = 0,019$), brojem kompozitnih ispuna ($\beta = -0,040$; $P = 0,036$), konzumacijom čaja ($\beta = -0,310$; $P = 0,024$) i kave ($\beta = 0,250$; $P = 0,009$), učestalosti vježbanja ($\beta = 0,236$; $P = 0,037$) te bruksizma ($\beta = 0,968$; $P = 0,000$) (Slika 6a). Na pojavnost kariorekse utječe upotreba žvakaćih guma ($\beta = -0,788$; $P = 0,047$) (Slika 6b), na piknozu učestalost konzumacije povrća ($\beta = -0,007$; $P = 0,007$) (Slika 6c), a na pojavnost stanica s kondenziranim kromatinom konzumacija voća ($\beta = -0,252$; $P = 0,019$) i povrća ($\beta = 0,327$; $P = 0,015$), uživanje u kavi ($\beta = -0,369$; $P = 0,037$) te bruksizam ($\beta = 1,426$; $P = 0,002$) (Slika 6d).



Slika 5. Pareto dijagram povezanosti pojave stanica s mikronukleusom, nuklearnim mostom, nuklearnim pupom i binuklearnih stanica s prediktorskim varijablama.



Slika 6. Pareto dijagram povezanosti pojave stanica s kariolizom, karioreksom, kondenziranim kromatinom i piknotičkom jezgrom s prediktorskim varijablama.

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje je bilo usmjereno na procjenu mogućih DNK oštećenja u stanicama bukalne sluznice u ispitanika izloženih zubnim pastama s fluorom, uzimajući u obzir učinak onih bez fluora. Ispitanici su bili odabrani među studentima dentalne medicine i podijeljeni u dvije skupine. Svaka skupina je koristila pastu bez fluora prva dva mjeseca, potom pastu s fluorom istog proizvođača sljedeća dva mjeseca. Oralne epitelne stanice sakupljane su prije početka korištenja te 30, 60, 90 i 120 dana nakon početka korištenja testiranih zubnih pasta. Genotoksičnost i citotoksičnost je bila procijenjena mikronukleus testom. Nulta hipoteza djelomično je potvrđena; zubne paste s fluorom, u 30-om danu korištenja, pokazale su značajno veću pojavnost većine ispitivanih parametara DNK oštećenja u odnosu na vrijeme korištenja zubnih pasta bez fluora.

Sredstva za oralnu higijenu su klasificirana kao kozmetički proizvodi koji ne moraju proći rigorozne kontrole kao lijekovi. Zubne paste sadrže mnoge potencijalno štetne sastojke, uključujući neke koji mogu dovesti do ozbiljnih, dugoročnih zdravstvenih problema (18). Budući da se svakodnevna upotreba proizvoda za oralno zdravlje povećala, sukladno tome se povećala i potreba za informiranjem zdravstvenih djelatnika i potrošača o potencijalnim koristima i rizicima povezanih s ovim proizvodima. Stanice oralne sluznice su prva zapreka potencijalno toksičnim tvarima iz sredstava za oralnu higijenu te su sposobne metabolizirati neposredne karcinogene u reaktivne produkte (19). Sloj bazalnih stanica oralnog epitela može sadržavati matične stanice koje mogu izraziti genetsko oštećenje u obliku mikronukleusa tijekom diobe jezgre. Brza obnova epitelnog tkiva dovodi stanice na površinu gdje dolazi do ljuštenja. Ovi mali jezgrini ogranci, ako se pravilno identificiraju, mogu biti važni biomarkeri genotoksičnosti s visokim potencijalom za probir, ali i okolišne izloženosti karcinogenima. Mikronukleus test je jednostavna, brza i relativno lako izvodiva metoda koja se široko koristi za procjenu genotoksina u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (20-22).

U našem istraživanju, obje testirane zubne paste s fluorom u 30-om danu korištenja pokazale su povećane parametre genotoksičnosti i citotoksičnosti u odnosu na vrijeme kada su se koristile zubne paste bez fluora. Tako je kod grupe ispitanika koji su koristili zubnu pastu proizvođača Sensodyne uočeno statistički značajno povećanje broja stanica mosta ($0,85 \pm 0,671$) u odnosu na 30 i 60 dana korištenja zubne paste bez fluora ($0,20 \pm 0,410$ i $0,20 \pm 0,923$, $P = 0,001$ i $P = 0,038$; redom), broj stanica s piknozom ($0,02 \pm 0,410$) u odnosu na vrijednosti dobivene 30-og dana korištenja paste bez fluora ($0,00 \pm 0,000$ i $P = 0,042$) te broja stanica s kondenziranim kromatinom ($0,40 \pm 0,503$) u odnosu na vrijeme od 60 dana korištenja paste bez fluora ($0,10 \pm 0,308$ i $P = 0,030$). S druge strane, kod ispitanika koji su koristili Plidenta zubnu pastu s fluorom došlo je do povećanja broja mikronukleusa ($1,15 \pm$

0,875) u odnosu na 60 dana korištenja paste bez fluora ($0,55 \pm 0,510$ i $P = 0,013$), broja stanica s pupom ($0,25 \pm 0,444$) u odnosu na 30 i 60-dnevno korištenje paste bez fluora ($0,10 \pm 0,366$ i $0,05 \pm 0,410$, $P = 0,014$ i $P = 0,006$; redom), broja stanica s karioreksom ($0,30 \pm 0,875$) u odnosu na 60 dana korištenja zubne paste bez fluora ($0,00 \pm 0,520$, $P = 0,044$) te broja stanica s kariolizom ($0,75 \pm 0,910$) u odnosu na 60-ti dan korištenja zubne paste bez fluora ($0,25 \pm 0,555$ i $P = 0,044$). Ove povećane parametre genotoksičnosti i citotoksičnosti možemo dovesti u korelaciju s fluorom jer smo u istraživanju upotrijebili paste iste robne marke, najbližnije po sastavu, s bitnom razlikom da jedna u sebi sadrži fluor, a druga ne.

Djelotvornost fluorida u sprječavanju karijesa je nesporna dok su rasprave o genotoksičnom potencijalu često kontradiktorne. Dokazano je da se fluor može apsorbirati u oralnu sluznicu (23) te kako upotreba sredstava za oralnu higijenu koja sadrže 1500 ppm F, tijekom 4 mjeseca može povećati razinu fluora u oralnoj sluznici (24). Ponavljana i rasprostranjena upotreba različitih dentalnih proizvoda može dovesti do nakupljanja fluorida u usnoj šupljini (25), a ondje višak fluorida može uzrokovati oštećenje DNK, potaknuti apoptozu i promijeniti stanični ciklus (26). Poznato je da su mukozne abnormalnosti često popratna pojava skeletalne fluoroze. Više koncentracije fluora utječu na sintezu kolagena, inhibiraju enzime koji su dio puta pentoze fosfata, antioksidativni obrambeni mehanizam te put temozin ATPaze. Općenito, male doze nekog toksina mogu uzrokovati reverzibilna oštećenja dok više koncentracije istog toksina mogu dovesti do trenutne smrti stanice ili sporih procesa koji dovode do stanične smrti. Što će se dogoditi, ovisi o tipu stanice na koju djeluje i njenoj prilagodljivosti. U brisu bukalne sluznice štakora nakon sistemske primjene fluora pokazalo se kako su stanične promjene poput oksidativnog stresa, oštećenja DNK, apoptoze i promjene staničnog ciklusa bile usko povezane s jačinom fluoroze (27). Nadalje, dokazano je da kod ljudi s fluorozom dolazi do promjena unutar stanica bukalnih sluznica u vidu povećanja veličine jezgre i smanjenja veličine stanice. To je uzrokovano fluorom induciranim oksidativnim stresom, DNK oštećenjem i apoptozom (28). Jeng i sur. (25) su na ljudskim oralnim fibroblastima ustanovili kako je natrijev fluorid toksičan *in vitro* zbog inhibicije sinteze proteina, ometanja funkcije mitohondrija i osiromašivanja staničnog ATP – a. Može se nagađati kako je ta inhibicija sekundarni učinak na DNK jer ne postoji očiti mehanizam kojim bi fluor izazvao genotoksične učinke izravnom interakcijom s DNK (29). Citotoksičan učinak na ljudske fibroblaste gingive i mukoze te na stanice pulpe, ovisi o dozi i vremenu (25, 32). Obje naše ispitivane zubne paste s fluorom sadržavale su natrij fluorid za koji je *in vitro* dokazano kako inhibira rast ljudskih diploidnih stanica u kulturi i izaziva kromosomske aberacije (30, 31). Nasuprot gore navedenim podacima koji govore u prilog

toksičnosti fluora, jedna studija provedena na ljudima je za dugotrajnu izloženost fluoridima u vodi za piće čak i na povišenoj razini, dokazala kako, neovisno o prehranbenim navikama, fluor ne uzrokuje kromosomska oštećenja na ljudskim limfocitima (33). Isto tako, *in vitro* ispitivanje utjecaja koncentracija NaF 0, 7, 28, 56 i 100 ppm putem komet-testa na oralnu sluznicu štakora, uključujući i bukalnu sluznicu, nisu pokazala genotoksične promjene na keratinocitima, s ili bez lize citoplazme (34).

Osim fluora kao toksične tvari, često se spominje natrij lauril sulfat koji je sastavnica velikog broja zubnih pasta. Dokazana je njegova toksičnost na stanicama mukoze gdje izaziva deskvamaciju epitela (35). Nijedna od naših ispitivanih pasta nije sadržavala taj sastojak, tako da se njihova genotoksičnost i citotoksičnost ne može povezati s njim. Ostali sastojci, uključujući silicij dioksid, hidratizirani silicijev dioksid, natrij benzoat, konzervanse, boje, okusi i esencije, također mogu imati toksični učinak (35).

Većina ispitivanih parametara se nakon 60 dana korištenja pasta s fluorom smanjila i nije ostala statistički značajna u odnosu na vrijeme kada su se koristile paste bez fluora te vrijeme od trideset dana korištenja pasta s fluorom. Ovo se vjerojatno može pripisati različitim adaptivnim mehanizmima unutar stanica ili zaštitnim faktorima unutar okruženja usne šupljine poput sline, sluzi, razine kreatinina, cirkulacije i oralne fluore (36, 37). Satoh i sur. (37) su u *in vitro* uvjetima na tri ljudske oralne stanične linije (fibroblasti gingive, fibroblasti parodonta i stanice pulpe) dokazali porast otpornosti na NaF sa starenjem. Razlog tome može biti povećanje staničnog i nuklearnog volumena i/ili staničnog proteinskog sadržaja koje može dovesti do razrijeđenja NaF blizu ciljnog mjesta. NaF nije izazvao apoptozu što može biti posljedica ograničenog stupnja aktivacije kaspaze.

Kada smo promatrali vrijeme izloženosti i uspoređivali međusobno dva korištena brenda zubnih pasta, uočene su neke razlike među njima. Tako je Sensodyne zubna pasta bez fluora u odnosu na Plidentinu dovela do značajnog povećanja broja stanica s kariolizom nakon 30 dana korištenja ($P = 0,029$) te kariorekse i nuklearnih pupova nakon 60 dana ($P = 0,007$ i $P = 0,001$; redom). Sensodyne zubna pasta s fluorom je nakon 30 dana korištenja, u odnosu na Plidentinu, imala značajno više stanica s nuklearnim mostovima ($P = 0,000$), a Plidentine veći broj stanica s mikronukleusom, kariolizom i binuklearnih stanica ($P = 0,027$, $P = 0,003$ i $P = 0,000$; redom). Iz ovoga se da zaključiti kako je Sensodyne zubna pasta bez fluora više citotoksična od Plidenta zubne paste dok je u usporedbi pasta s fluorom nešto citotoksičnija bila ona Plidentina. Navedene razlike u brojčanim vrijednostima su minimalne, a kada se pogledaju u odnosu na kontrolni bris uzet prije korištenja ispitivanih zubnih pasta, razlika nema.

Brojni biološki, ekološki i demografski čimbenici mogu ometati *in vivo* istraživanje. Isto tako je usna šupljina multifaktorijalno okruženje te s obzirom da svaki pacijent ima vlastite specifične biološke varijacije, *in vivo* istraživanja nije moguće standardizirati. Kako bi se eliminirala pojedinačna odstupanja, napredak svakog ispitanika je redovito vremenski praćen. Ispitanici su poslužili kao vlastita kontrola te su njihove biološke raznolikosti bile zanemarive u konačnoj procjeni (21). Na pojavnost različitih jezgrinih anomalija utjecale su različite prediktorske varijable. Tako je dob imala utjecaja na pojavnost najvećeg broja anomalija i to stanica s jezgrinim mostom ($\beta = 0,152$; $P = 0,038$), jezgrinim pupom ($\beta = 0,375$; $P = 0,011$) i binuklearnih stanica ($\beta = 1,839$; $P = 0,000$). Spol nije imao utjecaja na nijedno dok je pušenje imalo utjecaj samo na broj stanica s mikronukleusom ($\beta = 0,765$; $P = 0,018$) i binuklearnih stanica ($\beta = -2,218$; $P = 0,000$).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da zubne paste s fluorom mogu izazvati genotoksičan i citotoksičan učinak na stanicama bukalne sluznice. Iako statistička analiza pokazuje značajnu učestalost različitih jezgrinih anomalija nakon trideset dana korištenja zubnih pasta s fluorom, individualni parametri među ispitanicima pokazuju visoku varijabilnost unutar istih vremena uzorkovanja. Većina se ispitivanih parametara mikronukleus testa, kod obje ispitivane zubne paste s fluorom, smanjila nakon 60 dana korištenja u odnosu na 30-i dan korištenja istih te u odnosu na vrijednosti dobivene za vrijeme korištenja zubnih pasta bez fluora. Na temelju ovoga možemo zaključiti da je genotoksičan potencijal pasta s fluorom u *in vivo* uvjetima prolazan i ograničen te dugoročno biološki beznačajan.

S obzirom da zubne paste sadrže veliki broj sastojaka, teško je sa sigurnošću razlučiti koji je od njih ili koja je kombinacija sastojaka dovela do promjena na stanicama. Prema tome, trebalo bi ispitati paste identičnog sastava s i bez fluora, ali i različitih koncentracija fluora kako bi se moglo ustanoviti koja je najviša sigurna za upotrebu. Također, utjecaj bi se trebao promatrati kroz dulje vrijeme te bi bilo dobro ispitati utjecaj i ostalih spojeva fluora, ne samo NaF.

U ovom trenutku nema objektivnog i mjerljivog dokaza o genotoksičnom učinku fluora iz oralno – higijenskih i ostalih dentalnih preparata na oralnim stanicama u *in vivo* uvjetima. Međutim, dokle god je javnost posebno zainteresirana za sigurnost i toksikologiju fluora, zasigurno je potrebno provoditi kontrolirana klinička ispitivanja kako bi se potvrdila njihova biokompatibilnost i sigurna primjena.

6. ZAKLJUČCI

Iz navedenih rezultata dolazimo do sljedećih zaključaka:

1. Kod ispitanika koji su koristili zubne paste bez fluora i s fluorom uočene su statistički značajne razlike u ispitivanim parametrima citotoksičnosti i genotoksičnosti.
2. Kod ispitanika koji su koristili zubnu pastu Sensodyne s fluorom uočeno je statistički značajno povećanje broja stanica s mostom, piknozom i kondenziranim kromatinom u odnosu na vrijeme kada su koristili zubnu pastu istog proizvođača, ali bez fluora.
3. Kod ispitanika koji su koristili zubnu pastu Plidentu s fluorom uočeno je statistički značajno povećanje broja stanica s mikronukleusom, mostom, pupom, kariolizom i karioreksom u odnosu na vrijeme kada su koristili zubnu pastu istog proizvođača, ali bez fluora.
4. Većina se ispitivanih parametara mikronukleus testa, kod obje ispitivane zubne paste s fluorom, smanjila nakon 60 dana korištenja u odnosu na 30–i dan korištenja istih te u odnosu na vrijednosti dobivene za vrijeme korištenja zubnih pasta bez fluora. Na temelju ovoga možemo zaključiti da je genotoksičan potencijal pasta s fluorom u *in vivo* uvjetima prolazan i nema veliku biološku važnost.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Davies R, Scully C, Preston AJ. Dentifrices - an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(6):e976-82.
2. van Loveren C. Toothpastes. Karger, Amsterdam: Monographs in Oral Science; 2013.
3. 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.
4. Cury JA, Tenuta LM. Evidence-based recommendation on toothpaste use. *Braz Oral Res*. 2014;28 Spec No:1-7.
5. Pretty IA. High Fluoride Concentration Toothpastes for Children and Adolescents. *Caries Res*. 2016;50 Suppl 1:9-14.
6. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik B. Fluoride: A Review of Use and Effects on Health. *Mater Sociomed*. 2016;28(2):133-7.
7. Dhar V, Bhatnagar M. Physiology and toxicity of fluoride. *Indian J Dent Res*. 2009;20(3):350-5.
8. Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res*. 2010;24 Suppl 1:9-17.
9. Chapman PM. Fluoride toxicity. *Environ Toxicol Chem*. 2013;32(6):1215.
10. Del Piero S. Fluoride toxicity. *Environ Toxicol Chem*. 2013;32(6):1215.
11. Fejerskov O, Larsen MJ, Richards A, Baelum V. Dental tissue effects of fluoride. *Adv Dent Res*. 1994;8(1):15-31.
12. Larsen MJ, Kirkegaard E, Poulsen S, Fejerskov O. Dental fluorosis among participants in a non-supervised fluoride tablet program. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1989;17(4):204-6.
13. Larsen MJ, Senderovitz F, Kirkegaard E, Poulsen S, Fejerskov O. Dental fluorosis in the primary and the permanent dentition in fluoridated areas with consumption of either powdered milk or natural cow's milk. *J Dent Res*. 1988;67(5):822-5.
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. *Mutat Res*. 2013;753(2):100-13.
15. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol*. 2011;682:235-48.
16. Torres-Bugarin O, Zavala-Cerna MG, Nava A, Flores-Garcia A, Ramos-Ibarra ML. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis Markers*. 2014;2014:956835.

17. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69-77.
18. Schmalz G, Arenholt - Bindslev D. Biocompatibility of dental material. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2009.
19. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011;2011:603740.
20. Shashikala R, Indira AP, Manjunath GS, Rao KA, Akshatha BK. Role of micronucleus in oral exfoliative cytology. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(Suppl 2):S409-13.
21. 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. *Clin Oral Investig.* 2014;18(1):87-96.
22. Galic E, Tadin A, Galic N, Kasuba V, Mladinic M, Rozgaj R, et al. Micronucleus, alkaline, and human 8-oxoguanine glycosylase 1 modified comet assays evaluation of glass-ionomer cements - in vitro. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2014;65(2):179-88.
23. Gabler WL. Absorption of fluoride through the oral mucosa of rats. *Arch Oral Biol.* 1968;13(6):619-23.
24. Jacobson APM SR, Stephen KW. Mixed salivary and buccal mucosal fluoride levels with Non-F and 1500 ppm F dentifrices. *Caries Res.* 1992;26:222-23.
25. 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 Biol Toxicol.* 1998;14(6):383-9.
26. 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.
27. 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.
28. Rao SM, Sherlin HJ, Anuja N, Pratibha R, Priya P, Chandrasekar T. Morphometry of buccal mucosal cells in fluorosis - a new paradigm. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(11):1761-8.
29. Ribeiro DA, Alves de Lima PL, Marques ME, Salvadori DM. Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Braz Dent J.* 2006;17(2):91-4.
30. Tsutsui T, Suzuki N, Ohmori M, Maizumi H. Cytotoxicity, chromosome aberrations and unscheduled DNA synthesis in cultured human diploid fibroblasts induced by sodium fluoride. *Mutat Res.* 1984;139(4):193-8.

31. Oguro A, Cervenka J, Horii K. Effect of sodium fluoride on growth of human diploid cells in culture. *Pharmacol Toxicol.* 1990;67(5):411-4.
32. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(2):230-4.
33. Li Y, Liang CK, Katz BP, Brizendine EJ, Stookey GK. Long-term exposure to fluoride in drinking water and sister chromatid exchange frequency in human blood lymphocytes. *J Dent Res.* 1995;74(8):1468-74.
34. Ribeiro DA SD, Assis GF, Marques MEA. Does fluoride cause DNA damage? An 'in vitro' evaluation using rats oral mucosa cells. *Braz J Oral Sci.* 2003;2(6):268-71.
35. Herlofson BB, Barkvoll P. Oral mucosal desquamation caused by two toothpaste detergents in an experimental model. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(1):21-6.
36. 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. *J Int Oral Health.* 2015;7(3):39-43.
37. Satoh R, Kishino K, Morshed SR, Takayama F, Otsuki S, Suzuki F, et al. Changes in fluoride sensitivity during in vitro senescence of normal human oral cells. *Anticancer Res.* 2005;25(3B):2085-90.

8. SAŽETAK

Naziv diplomskog rada: Citotoksični i genotoksični učinak zubnih pasta s fluorom i bez fluora na stanicama bukalne sluznice

Cilj istraživanja: Paste za zube sadrže mnoge potencijalno štetne sastojke, uključujući neke koje mogu dovesti do ozbiljnih dugoročnih zdravstvenih problema. Svakodnevna upotreba proizvoda za oralnu zdravstvenu zaštitu je velika što naglašava potrebu da zdravstveni djelatnici i potrošači budu informirani o potencijalnim prednostima i rizicima povezanim s tim proizvodima. Ovo istraživanje bilo je usmjereno na procjenu mogućih DNK oštećenja u oralnim epitelnim stanicama kod sudionika koji su bili izloženi zubnim pastama s fluorom u usporedbi s onima bez fluora.

Materijali i metode: Četrdeset volontera izabrano je među studentima dentalne medicine i podijeljeno u dvije eksperimentalne skupine. Svaka grupa koristila je prvo zubnu pastu bez fluora kroz prva dva mjeseca, nakon čega je slijedila uporaba fluoridiranih vrsta istog proizvođača kroz isto vrijeme korištenja. Oralne epitelne stanice su uzorkovane na početku te 30, 60, 90 i 120 dana od početka uporabe ispitanih vrsta zubnih pasta. Kromosomska oštećenja analizirana su mikronukleus testom.

Rezultati: Obje testirane zubne paste s fluorom pokazale su povećane parametre genotoksičnosti i citotoksičnosti nakon trideset dana korištenja. Većina ispitivanih parametara se smanjila se nakon 60 dana i nisu se značajno razlikovali od rezultata dobivenih u vrijeme kada su se koristile zubne paste bez fluorida.

Zaključak: Na temelju rezultata može se zaključiti kako uporaba pasta za zube s fluorom može izazvati prolaznu i ograničenu toksičnost, međutim dugoročno biološki beznačajan.

Ključne riječi: fluoridirane zubne paste, citogenetsko oštećenje, oljuštene bukalne stanice, mikronukleus test

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Cytotoxic and genotoxic effects of different kinds of toothpaste with and without fluoride on oral mucosa cells

Aim: Toothpastes contain many potentially harmful ingredients, including some that can lead to serious long-term health problems. Everyday use of oral health care products has increased, highlighting a need for healthcare clinicians and consumers alike to be informed of the potential benefits and risks associated with these products. This study aimed to evaluate possible DNA damage to oral epithelial cells in participants exposed to fluoride kinds of toothpaste considering the effect of non-fluoride kinds of toothpaste.

Materials and methods: Forty volunteers were found among students of dental medicine and assigned into two experimental groups. Each group used regular toothpaste without fluoride for initial two months, followed by the use of fluoride kinds of toothpaste of the same brand for the next two months. The oral epithelial cells were sampled at baseline and 30, 60, 90 and 120 days after the beginning of the use of tested types of toothpaste. Chromosomal damage was analysed by micronucleus assay.

Results: Both tested fluoride kinds of toothpaste showed increased parameters of genotoxicity and cytotoxicity after thirty days of use. Most of the studied parameters decreased after 60 days of use and were not significantly different from the results obtained at the time when the participants used toothpaste without fluoride.

Conclusion: Based on the results, we can conclude that the use of toothpaste with fluoride may cause transient limited toxicity, long-term biologically insignificant.

Key words: fluoride toothpaste, cytogenetic damage, exfoliated buccal cells, micronucleus assay

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Tanja Gović

Datum i mjesto rođenja: 13.4.1993., Split

Državljanstvo: Hrvatsko

Adresa: Zvonimirova 21, 21312 Podstrana

Telefon: +385915726221

Email: tanja.govic.2@gmail.com

OBRAZOVANJE

- 1999. – 2007. Osnovna škola „Strožanac“
- 2007. – 2011. I. gimnazija, Split
- 2011. – 2017. Medicinski fakultet u Splitu, integrirani studij Dentalna medicina

MATERINJI JEZIK

- Hrvatski

OSTALI JEZICI

- Engleski – tečno
- Talijanski – osnovno
- Španjolski – osnovno

AKTIVNOSTI

- Demonstrator na katedri Dentalna morfologija i antropologija (akademska godina 2013./2014., 2014./2015., 2015./2016.)
- Demonstrator na katedri Restaurativna dentalna medicina i Endodoncija (akademska godina 2014./2015., 2015./2016.)
- Članica studentske organizacije „Zubolina“ pri Medicinskom fakultetu u Splitu

NAGRADE

- Dobitnica Dekanove nagrade za akademsku godinu 2013./2014.