

Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Margareta Ognjanović, Marko Zlendić

**UČINAK RAZLIČITIH PREPARATA FLUORA SA SLINOM PUŠAČA I NEPUŠAČA
NA STVARANJE ALKALNO TOPLJIVIH FLUORIDA NA POVRŠINI ČAKLINE**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Katedri za farmakologiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s Kliničkim zavodom za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom doc. dr. sc. Kristine Peroš i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

POPIS KRATICA I OZNAKA

AmF	aminofluorid
HNO₃	dušična kiselina
ICP-MS	induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa (engl. <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy</i>)
KOH	kalijev hidroksid
NaF	natrijev fluorid
RPM	mjerna jedinica za broj okretaja u minuti (engl. <i>Revolutions Per Minute</i>)
TISAB	pufer otopina koja održava stalnu aktivnost komponenata u otopini (engl. <i>Total Ionic Strength Adjustment Buffer</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. CILJ RADA I HIPOTEZE.....	2
3. MATERIJALI I METODE.....	2
3. 1. Prikupljanje uzoraka sline	3
3. 2. Određivanje minerala u slini	3
3. 3. Uzorci cakline	4
3. 4. Tretiranje caklinskih blokova i analiza fluoridnih iona	4
4. REZULTATI.....	6
5. RASPRAVA.....	7
6. ZAKLJUČAK.....	9
7. ZAHVALE	10
8. POPIS LITERATURE	11
9. SAŽETAK.....	13
10. SUMMARY	14

1. UVOD

Fluoridirane zubne paste najrašireniji su oblik opskrbe ionima fluora u prevenciji karijesa i trenutačno ih koristi više od 500 milijuna ljudi (1). Još je 1980-ih ustanovljeno da topikalno primijenjeni fluoridi sprječavaju razvoj karijesne lezije, tako što inhibiraju demineralizaciju te potiču remineralizaciju (2). Od svih izvora fluora za značajno smanjenje prevalencije karijesa najzaslužnije su fluoridirane zubne paste, a njihova je učinkovitost zamijećena širom svijeta (3).

U fluoridiranim zubnim pastama nalaze se različiti spojevi fluora koji se razlikuju po kemijskoj strukturi koja određuje mehanizam djelovanja svakoga spoja. Prema Axelssonu (4), postoje tri glavne skupine spojeva fluora. Prvoj pripadaju anorganski spojevi, odnosno lako topljive soli koje osiguravaju slobodne fluoride. Toj skupini pripada natrijev fluorid (NaF). U drugoj se skupini nalaze spojevi koji sadržavaju monofluorfosfat, a treću skupinu čine organski spojevi, poput aminofluorida (AmF), u kojima je fluor vezan za organsku komponentu.

Najzastupljenije paste za zube sadrže NaF ili natrijev monofluorfosfat (NaMFP), dok su u nekim zemljama, u koje se ubraja Hrvatska, dostupni i proizvodi s kositrovim fluoridom (SnF_2) i aminofluoridima (5).

S obzirom na to da zubne paste koje sadržavaju različite spojeve fluora sličnih koncentracija fluora imaju različitu sposobnost otpuštanja iona fluora u oralnom okolišu, Issa i sur. (6) zaključili su kako aminofluoridi ostvaruju veću koncentraciju fluora u slini u odnosu na NaF.

Nedavne *in vitro* i *in vivo* studije (7, 8), kao i klinička zapažanja (8), naglašavaju važnost održavanja određene razine fluoridnih iona, koja ima kariostatsku učinkovitost, u oralnim tekućinama. Da bi ioni fluora interferirali s dinamikom razvoja karijesa, moraju biti neprestano prisutni u oralnim tekućinama u niskim koncentracijama (9).

U oralnom se okolišu, prema Arendsu i sur. (10), nalaze različiti "bazeni" fluora, koji se mogu podijeliti u pet kategorija. Petu kategoriju čine globuli slični CaF_2 odloženi na caklinu i biofilm, koji djeluju kao rezervoari iona fluora i kalcija kontrolirani promjenom pH (11).

Još je prije 70 godina dokazano kako topikalnom primjenom otopine NaF na površini cakline dolazi do stvaranja globula sličnih CaF_2 (12). Uočeno je da CaF_2 nastaje nakon kratkog izlaganja površine zuba fluoridiranim zubnim pastama, a dostupnost kalcijevih iona predstavlja važan čimbenik za njegovo formiranje (11). Izvori kalcijevih iona su caklina, slina i zubni plak (13).

Slina se sastoji od više od 99 % vode i manje od 1 % krutih tvari, najviše elektrolita i proteina (14). Proteini slini daju njezinu karakterističnu viskoznost i utječu na mineralni sastav sline, posebno na kalcij (15). Slina je prva tjelesna tekućina koja dolazi u kontakt s cigaretnim dimom, koji dugoročno

dovodi do značajnog smanjenja salivarnoga protoka (16). Osim toga, mijenja se i kvaliteta sline koja postaje gusta u usporedbi sa slinom nepušača, koja je više vodenasta (17).

Nadalje, pušenje cigareta povezano je s povećanim rizikom nastanka dentalnoga karijesa, no nema dovoljno dokaza koji bi potvrdili pušenje kao faktor odgovoran za nastanak karijesa (18). Utjecaj pušenja na sastav sline još nije u cijelosti razjašnjen. Osim toga, potrebna su i daljnja istraživanja o utjecaju sastava sline pušača na odlaganje alkalno topljivih fluorida na površini cakline.

Svrha ovoga rada jest istražiti učinkovitost dviju različitih fluoridiranih pasti za zube na odlaganje alkalno topljivih fluorida na površinu cakline, u odnosu na njihovu interakciju sa slinom pušača i slinom nepušača. Dobivena saznanja mogla bi biti korisna u individualiziranju oralne higijene u odnosu na pušački status, tj. mogli bismo pušačima preporučiti učinkovitiju zubnu pastu.

2. CILJ RADA I HIPOTEZE

Cilj ovoga istraživanja jest usporediti utjecaj sline pušača i sline nepušača, primjenjene uz dva različita preparata fluora – aminofluoridni i natrij fluoridni, na stvaranje alkalno topljivih fluorida na površini cakline.

Nulte hipoteze jesu:

1. nema razlike u mineralnom sastavu sline pušača i nepušača
2. nema razlike u utjecaju sline pušača i sline nepušača na ugradnju KOH-topljivih fluorida u caklinu
3. nema razlike u utjecaju natrij fluoridne i aminofluoridne paste na ugradnju KOH-topljivih fluorida u caklinu.

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je u skladu s temeljnim načelima Helsinške deklaracije, te je odobreno od strane Etičkoga povjerenstva Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: 05-PA-30-IV-2/2019). Provedeno je na Katedri za farmakologiju Stomatološkoga fakulteta.

3. 1. Prikupljanje uzoraka sline

Uzorci nestimulirane sline prikupljeni su od 12 muških dobrovoljaca prosječne dobi 21.75 ± 0.86 godina. Šest uzoraka čini nestimulirana slina pušača koji su pušili više od 20 cigareta na dan kroz pet godina. U prosjeku puše 6,3 godine (najmanje četiri godine, a najviše sedam godina). Drugih šest uzoraka nestimulirane sline prikupljeno je od nepušača koji nisu nikad pušili. Kratka povijest bolesti, uključujući korištenje lijekova i navike pušenja, te stanje oralne higijene dobiveni su anketnim upitnikom. Prije prikupljanja nestimulirane sline ispitanici su informirani o ciljevima i planu istraživanja, te su potpisali informirani pristanak. Nestimulirana slina skupljana je ujutro između 8 i 12 sati na Katedri za Farmakologiju Stomatološkoga fakulteta u Zagrebu. Ispitanicima je rečeno da dva sata prije skupljanja sline ne konzumiraju hranu i piće, osim obične vode, a pušači nisu smjeli pušiti taj dan, sve do nakon doniranja sline.

Prilikom skupljanja važno je da se osoba umiri, ugodno sjedi i izbjegava kretanje. Neposredno prije prikupljanja sline, usta je potrebno isprati običnom vodom. Slinu koja se u ustima skupi tijekom prve minute treba progutati. Potrebni uzorci nestimulirane sline prikupljeni su u plastične posudice tijekom sljedećih 15 minuta, i to na način da su dobrovoljci lagano sklopljenih usta pustili da se slina skupi u ustima te lagano ispljunuli u prethodno izvaganu posudicu (19). Svaki uzorak sline izvagan je i nakon skupljanja, te je izračunat protok sline u jedinici vremena. Od svakog uzorka otpipetirano je (Eppendorf Research plus pipette, Sigma- Aldrich, Hamburg, Germany) 400 μL sline u posebne plastične posudice (Eppendorf tubes, Sigma- Aldrich, Hamburg, Germany) za određivanje koncentracije minerala. Nakon pohranjivanja u posudice uzorci su smrznuti na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prije početka eksperimenta uzorci nestimulirane sline bili su odmrznuti na sobnu temperaturu ($18\text{ }^{\circ}\text{C}$), a zatim je 1 mL sline iz svakog uzorka nestimulirane sline pušača premješten u plastičnu posudu koja je činila *pool* sline pušača. Isto tako, 1 mL sline iz svakog uzorka nestimulirane sline nepušača premješten je u plastičnu posudu koja je činila *pool* sline nepušača, ukupno po 6 mL sline u svakom *poolu*.

3. 2. Određivanje minerala u slini

Mjerenje koncentracije kalcija, magnezija i fosfata u slini provedeno je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkoga bolničkog centra Zagreb. Korišten je Agilent 7500 cx (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka), induktivno spregnuta plazma sa spektrofotometrijom masa (ICP-MS). Uzorci sline (400 μL) digestirani su dušičnom kiselinom (2 mL 65 %-tne HNO_3 i 1 mL H_2O) pomoću visokotlačne mikrovalne digestije (UltraCLAVE, Milestone, Italija). Nakon hlađenja razrjeđuju se 1 %-tnom (v/v) HNO_3 do ukupnog volumena od 15 mL, a kalcij, magnezij i fosfati analizirani su ICP-

MS-om. Sve standardne otopine pripravljene su od 1 g/L PlasmaCAL standarda (SCP Science, Kanada). Seronorm® TraceElements Serum Control Level I i Level II (Sero AS, Billingstad, Norveška) korišteni su za kontrolu točnosti mjerenja.

3. 3. Uzorci cakline

U istraživanju je korišteno 20 kirurški izvađenih, humanih premolara i molara koji su izvađeni zbog ortodontskih razloga (Zavod za oralnu kirurgiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska). Nakon vađenja, sa svakog je zuba mehanički, kiretom, očišćen ostatak organskoga tkiva. Korijeni su najprije uronjeni u 3 %-tni vodikov peroksid na 15 minuta, a zatim ostrugani kiretom. Kruna zuba oprana je četkicom. Uzorci su dezinficirani 2,6 %-tnim natrijevim hipokloritom u trajanju od 30 minuta. Uzorci su zatim pohranjeni u fiziološku otopinu te čuvani u hladnjaku na temperaturi od 4 °C do samog eksperimenta. Fiziološka otopina mijenjana je svježom jednom tjedno.

Zubi su nasumično podijeljeni u dvije glavne skupine po deset zubi. Od svakog su zuba dijamantrnim diskom odrezana četiri caklinska uzorka, ukupno 80 uzoraka. Uzorci pojedinoga zuba dodijeljeni su jednoj od četiri podskupine (A, B, C, D). Radi lakšeg rukovanja, sve su površine, osim površine cakline, prekrivene stomatološkim voskom Crowax (E&H Renfert, Singen, Germany) na koji je bila pričvršćena ortodonska ligaturna žica. Caklinske površine mjerila je jedna osoba (M. Z.), mjere su šestarom prenesene na milimetarski papir, a zatim je izračunata caklinska površina svakog uzorka. Nakon mjerenja, svaki je uzorak pohranjen u zatvorenu plastičnu čašicu s pet kapi destilirane vode radi očuvanja vlažnosti. Tako pripremljeni uzorci su do eksperimenta bili pohranjeni u hladnjaku na temperaturi od 4 °C, a na sâm dan eksperimenta na sobnoj temperaturi od 18 °C.

3. 4. Tretiranje caklinskih blokova i analiza fluoridnih iona

Ovaj dio eksperimenta odvijao se tijekom tri uzastopna dana. Uzorci podskupine A uronjeni su u *pool* sline pušača i miješani pet minuta, zatim su miješani u smjesi zubne paste s fluorom i deionizirane vode kroz tri minute, nakon čega su ispirani miješanjem u destiliranoj vodi 30 sekundi. Uzorci podskupine B uronjeni su u slinu nepušača i miješani pet minuta, ostatak postupka isti je kao i za podskupinu A. Podskupina C tretirana je samo smjesom zubne paste s fluorom i deionizirane vode kroz tri minute. Podskupina D služila je kao kontrola, stoga nije tretirana.

Nakon tretmana uzorci cakline su vraćeni u zatvorene čašice s pet kapi destilirane vode. Postupak je ponovljen nakon šest sati za svaku skupinu, a nakon toga uzorci cakline ponovno su vraćeni u zatvorene čašice s pet kapi destilirane vode i pohranjeni u hladnjak na temperaturi od 4 °C do idućeg jutra kada je svaki uzorak uronjen u 1,5 mL kalijeva hidroksida (KOH) i tijekom 24 sata ostavljen na laboratorijskoj tresilici VIBROMIX 314 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenia) na brzini od 100 RPM na sobnoj temperaturi (18 °C).

Nakon isteka 24 h, količina alkalno topljivih fluorida stvorenih na površini cakline određena je prema metodi Časlavske i sur. (20). Otopine su neutralizirane s 1,5 mL HNO₃ i puferirane s 0,15 mL TISAB-a III[®] (Orion Research Inc., Cambridge, MA, SAD). Fluor je analiziran ion selektivnom fluoridnom elektrodom (Orion 96-09, Boston, MA., SAD). Količina alkalno topljivoga fluorida izračunata je prema Dijkman i Arends (21).

U tretmanu prve skupine korištena je zubna pasta s aminofluoridima, Elmex (GABA International AG, Münchenstein, Švicarska), dok se za drugu skupinu koristila zubna pasta koja sadrži natrijev fluorid, Aquafresh My big teeth (SmithKline Beecham Consumer Healthcare, Brentford, UK). Zubna pasta s aminofluoridima sadržavala je 1400 ppm (parts per milion) fluorida, a zubna pasta s natrijevim fluoridom 1450 ppm fluorida. Za uporabu u tretmanu pripremljena je smjesa zubne paste s fluorom i deionizirane vode u omjeru 1:3, jednom gramu paste dodana su tri mililitra deionizirane vode. Smjesa se pripremala 15 minuta prije svakog tretmana.

3. 5. Statistička analiza

Za određivanje značenja promjena u količini alkalno topljivih fluorida stvorenih na površini cakline između ispitnih skupina korišten je neparametrijski Wilcoxonov test parova. Normalnost distribucije podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom s Lilliefors korekcijom te Shapiro-Wilkovim testom. Friedmanov test korišten je za testiranje ukupne razine značajnosti. $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim. Sve statističke analize obavljene su programskim paketom Statistica (verzija 13.1, StatSoft, Inc).

4. REZULTATI

U slinama pušača i nepušača ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kalcija, magnezija, fosfata, u njihovim omjerima kao ni u protoku sline. Treba istaknuti omjer kalcija i magnezija koji je u slini nepušača bio skoro dvostruko veći. (Tablica 1.)

Podatci o količini ugradnje alkalno topljivih fluorida na površini cakline, po skupinama za pojedinu pastu, prikazani su u Tablici 2 i Tablici 3.

Tablica 1. Usporedba koncentracijskih vrijednosti minerala i protoka sline pušača i nepušača (Srednja vrijednost ± SD)			
Skupina	Pušač n=6	Nepušač n=6	Značajnost *p
Ca (mmol/L)	1,18 ± 0,67	1,44 ± 0,76	ns
Mg (mmol/L)	0,49 ± 0,30	0,34 ± 0,19	ns
P (mmol/L)	8,23 ± 2,65	5,95 ± 1,40	ns
Ca/Mg	2,77 ± 1,52	5,64 ± 3,92	ns
Ca/P	0,14 ± 0,06	0,25 ± 0,13	ns
Mg/P	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,03	ns
Protok (ml/min)	0,21 ± 0,11	0,45 ± 0,22	ns
*t-test značajan (p<0.05); ns: nema statističke značajnosti (p>0.05)			

Tablica 2. Količina alkalno topljivih fluorida stvorenih na površini zubne cakline nakon tretmana slinom i smjesom zubne paste s aminofluoridom, AmF. n=10				
Podskupina	Tretman	KOH topljivi fluoridi µg/cm ² Srednja vrijednost ± SD		Značajnost ^{*a,b,c,d}
A	Slina pušača + AmF pasta	0.692458	± 0.751246	**b,c,d
B	Slina nepušača + AmF pasta	0.326554	± 0.206195	**a,d
C	Samo AmF pasta	0.540465	± 0.761854	**a,d
D	Bez tretmana	0.093463	± 0.057127	**a,b,c
*Friedmanov ANOVA test značajan (p<0.05)				
**Wilcoxonov test parova značajan (p<0.05): ^a uspoređeno s vrijednosti iz skupine A, ^b uspoređeno s vrijednosti iz skupine B, ^c uspoređeno s vrijednosti iz skupine C, ^d uspoređeno s vrijednosti iz skupine D				

Tablica 3. Količina alkalno topljivih fluorida stvorenih na površini zubne cakline nakon tretmana slinom i smjesom zubne paste s natrijevim fluoridom, NaF. n=10				
Podskupina	Tretman	KOH topljivi fluoridi $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Srednja vrijednost \pm SD		Značajnost ^{*a,b,c,d}
A	Slina pušača + NaF pasta	0,051845	\pm 0,089986	**d
B	Slina nepušača + NaF pasta	0,036618	\pm 0,06665	**d
C	Samo NaF pasta	0,012443	\pm 0,014781	**d
D	Bez tretmana	0,000694	\pm 0,000446	**a,b,c
*Friedmanov ANOVA test značajan ($p < 0.05$)				
**Wilcoxonov test parova značajan ($p < 0.05$): ^a uspoređeno s vrijednosti iz skupine A, ^b uspoređeno s vrijednosti iz skupine B, ^c uspoređeno s vrijednosti iz skupine C, ^d uspoređeno s vrijednosti iz skupine D				

5. RASPRAVA

Dosadašnje studije o mineralnom sastavu sline pušača i nepušača malobrojne su, i bez jasnih zaključaka. Rezultati analize mineralnoga sastava sline pušača i nepušača u ovom istraživanju nisu pokazali statistički značajne razlike u mineralnom sastavu sline pušača i nepušača, što potvrđuje istinitost prve hipoteze.

Dok u našim rezultatima nije pronađena statistički značajna razlika u količini kalcija, u drugim je istraživanjima ustanovljeno da pušenje kod pacijenata bez parodontitisa nejasno utječe na kalcij u slini. Tako su Kiss i sur. (22) pronašli značajno veću količinu kalcija u slini kod pušača u odnosu na nepušače. Dok su Manea i Nechifor (23) pokazali da pušenje ne utječe na koncentraciju kalcija u slini, odnosno da je koncentracija kalcija u slini bila slična kod pušača i nepušača bez parodontne bolesti, kao i kod pušača i nepušača s parodontnom bolesti, iako su pronašli statistički značajno veću koncentraciju kalcija u slini onih koji su imali parodontnu bolest u odnosu na zdrave ispitanike.

U istraživanju koje su proveli Poles i sur. (24) pronađeno je da koncentracija kalcija s godinama pušenja kod žena raste, dok kod muškaraca opada. Ni naši rezultati, ni rezultati istraživanja koje su proveli Šutej i sur. (25), nisu pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji kalcija između sline pušača i sline nepušača. No, dok su naši ispitanici, kao i ispitanici Šutej i sur. (25), bili mlađe dobi, ispitanici istraživanja koje su proveli Kiss i sur. (22) imali su oko 50 godina. Isto tako, naši su ispitanici bili zdravi muškarci, dok su ispitanici istraživanja koje su proveli Kiss i sur. (22) bile žene, od kojih je većina imala parodontitis. To bi moglo objasniti naše rezultate, kao i rezultate istraživanja koje su proveli Šutej i sur. (25), u kojima nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji kalcija

između sline pušača i nepušača. A parodontna bolest mogla bi biti uzrok statistički značajno većoj količini kalcija u slini pušača u istraživanju Kissa i sur (22).

U našem istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika između koncentracije magnezija u slini pušača i slini nepušača, kao ni između njihovih omjera, što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Kolte i sur. (26). No, važno je napomenuti kako je omjer kalcija i magnezija bio skoro dva put veći u slini nepušača.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da nema statistički značajne razlike u protoku sline između pušača i nepušača. To je sukladno onome što su pronašli Šutej i sur. (25). Rezultati istraživanja koje su proveli Rad i suradnici (16) pokazuju da dugoročno pušenje značajno smanjuje protok sline. S obzirom na to da ispitanici u studiji Rada i sur. (16) puše prosječno 12,5 godina, naši 6,5 godina, a ispitanici istraživanja koje su proveli Šutej i sur. (25) pet godina, nije dobivena značajna razlika u protoku sline, vjerojatno zbog kraćeg vremena izloženosti pušenju.

Studije (27, 28, 29) utjecaja sastava sline na odlaganje fluorida na površini zubne cakline temeljene su na *in vitro* modelima i nude različita objašnjenja mehanizma unosa fluorida u ovisnosti o sastavu minerala korištenih u modelima i sastavu fluoridnih preparata.

U našem istraživanju pronađena je statistički značajno veća količina alkalno topljivih fluorida na površini cakline u onim uzorcima koji su tretirani pastom s aminofluoridima i slinom pušača u odnosu na uzorke koji su tretirani aminofluoridnom pastom i slinom nepušača, uzorke tretirane samo aminofluoridnom pastom, te uzorke kontrolne skupine, što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Bašić i sur. (27). No, dok su Bašić i sur. (27) pronašli i dvaput veću koncentraciju kalcija u slini pušača u odnosu na nepušače, te su veću količinu alkalno topljivih fluorida pripisali djelovanju kalcija, rezultati naše studije, u kojima također nije pronađena statistički značajno veća količina kalcija, navode nas na zaključak kako kalcij nije utjecao na odlaganje povećane količine alkalno topljivih fluorida na površinu cakline.

Rezultati istraživanja koje su proveli Larsen i Richards (28) objašnjavaju da je slina, čak i u malim količinama, važna za uspjeh topikalne fluoridacije, vjerojatno jer sadržava kalcij. To je u suprotnosti s našim rezultatima koji su pokazali kako slina nema utjecaj na stvaranje KOH-topljivih fluorida na površini cakline, osim u slučaju kada se u tretmanu koristila slina pušača s aminofluoridnom pastom.

Slično istraživanje o utjecaju sline s aminofluoridima na stvaranje alkalno topljivih fluorida radili su Rošin-Grget i sur. (29), čiji su rezultati u skladu s rezultatima naše studije. Time je druga hipoteza odbačena, što znači da postoji razlika između sline pušača i sline nepušača u utjecaju na ugradnju KOH-topljivih fluorida na površini cakline.

No, s obzirom na to da nismo pronašli statistički značajne razlike u mineralnom sastavu sline pušača i nepušača, rezultati nas navode na zaključak kako postoji neka druga komponenta u slini pušača,

moguće organskoga porijekla, koja bi mogla pospješiti djelovanje aminofluoridne paste za zube na stvaranje alkalno topljivih fluorida na površini cakline.

S obzirom na to da rezultati našeg istraživanja pokazuju da postoji razlika u ugradnji KOH-topljivih fluorida u caklinu nakon primjene NaF paste u odnosu na primjenu aminofluoridnih paste, treća hipoteza se odbacuje. NaF i AmF paste različito reagiraju sa sastavom sline pušača i nepušača, odnosno AmF paste, za razliku od NaF paste, poboljšavaju stvaranje KOH-topljivih fluorida uz prisustvo sline pušača. Stvaranje KOH-topljivih fluorida uz prisustvo sline (pušača ili nepušača) ovisi i o tipu fluorida: za AmF paste izraženije je uz slinu pušača, dok djelovanje NaF paste nije vezano za sastav sline.

Petzold i sur. (30) ustanovili su kako se korištenjem kiselih aminofluoridnih otopina prvi globuli CaF_2 formiraju već nakon 20 sekundi, dok se korištenjem kiselih natrij fluoridnih preparata stvaraju nešto kasnije. Naš tretman caklinskih uzoraka nije se vremenski razlikovao, što može biti jedan od čimbenika koji su utjecali na nepronalazak statistički značajno veće količine KOH-topljivih fluorida u podskupinama tretiranim s natrij fluoridnom pastom. Odnosno, mogli bismo pretpostaviti da je NaF paste bilo potrebno više vremena da reagira sa slinom pušača te stvori veću količinu alkalno topljivih fluorida na uzorcima cakline.

CaF_2 smatra se najvažnijim produktom koji nastane na caklini nakon topikalno primijenjenih fluoridiranih preparata (31). Zbog toga je važno znati čimbenike koji utječu na njegovo povećano stvaranje u cilju što boljeg iskorištavanja fluoridiranih preparata.

Točan mehanizam stvaranja statistički značajno veće količine KOH-topljivih fluorida na uzorcima cakline koji su bili tretirani slinom pušača i smjesom aminofluoridne paste u odnosu na uzorke koji su bili tretirani slinom nepušača i smjesom aminofluoridne paste te na uzorke tretirane samo smjesom aminofluoridne paste nije nam poznat, te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnio uspješniji učinak aminofluoridne paste sa slinom pušača, koji je doveo do značajno veće adsorpcije KOH-topljivih fluorida na površinu cakline.

6. ZAKLJUČAK

Pušenje uzrokuje promjene u slini, koja potom, s aminofluoridima ima bolji učinak na stvaranje alkalno topljivih fluorida na površini cakline. Statistički značajno veća količina alkalno topljivih fluorida stvara se na onim uzorcima cakline koji su tretirani slinom pušača i smjesom paste s aminofluoridima u odnosu na caklinske uzorke tretirane istom smjesom i slinom nepušača te na caklinske uzorke tretirane samo smjesom paste za zube.

Razlike u utjecaju sline pušača i nepušača na stvaranje alkalno topljivih fluorida s natrij fluoridnom pastom nisu pronađene.

Nije pronađena statistički značajna razlika u protoku sline te u koncentraciji kalcija, magnezija i fosfata između sline pušača i sline nepušača. No, važno je napomenuti da je omjer kalcija i magnezija u slini nepušača bio skoro dvostruko veći.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo mentorici, doc. dr. sc. Kristini Peroš, na uloženom vremenu, savjetima, razumijevanju i ugodnoj suradnji prilikom izrade ovoga znanstvenog rada.

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Ivani Šutej i Krešimiru Bašiću dr. med. dent. na suradnji i podršci.

Zahvaljujemo se Ankici Tečić, lab. teh., na pomoći pri pripremi eksperimentalnoga dijela.

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Dunji Rogić, predstojnici Kliničkoga zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb na pomoći pri određivanju minerala u slini.

Zahvaljujemo mr. sc. Sanji Marinov, lektorici engleskog jezika, na izdvojenom vremenu.

8. POPIS LITERATURE

1. World Health Organization. Oral health [Internet]. Geneva:World Health Organization; c2019 [cited 2019 Apr 14]. Available from: http://www.who.int/oral_health/media/en/index1.html.
2. Cate JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res.* 1990;69:614–9.
3. Bratthall D, Hänsel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4):416–22.
4. Axelsson P. Preventive materials, methods and program. 1st ed. Chicago: Quintessence Pub; 2004. Use of fluorides; p. 263–68.
5. Ellwood RP, Fejerskov O, Cury JA, Calrkson B. Fluoride in caries control. In: Fejerskov O, Kidd EAM, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 287–323.
6. Issa AI, Toumba KJ. Oral fluoride retention in saliva following toothbrushing with child and adult dentifrices with and without water rinsing. *Caries Res.* 2003;38(1):15-9.
7. Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(5):461–5.
8. Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(7):887–99.
9. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monog Oral Sci.* 2011;22:97–114.
10. Arends J, Christoffersen J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res.* 1990;69(S2):601–5.
11. Rølla G, Saxegaard E. Critical evaluation of the composition and use of topical fluorides, with emphasis on the role of calcium fluoride in caries inhibition. *J Dent Res.* 1990;69(S2):780-5;820–3.
12. Gerould CH. Electron microscope study of the mechanism of fluorine deposition in teeth. *J Dent Res.* 1945;24:223–33.
13. Petzold M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive in vitro study of the CaF₂ precipitation and microstructure. *Caries Res.* 2001;35(1):45–51.
14. Bardow A, Lagerlöf F, Nauntofte B, Tenovuo J. The role of saliva. In: Fejerskov O, Kidd EAM, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management.* 2nd ed. Oxford, Blackwell Munksgaard; 2008. p. 189–207.
15. Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2013;4(1):267–76.

16. Rad M, Kakoie S, Niliye Brojeni F, Pourdamghan N. Effect of long-term smoking on whole- mouth salivary flow rate and oral health. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2010;4(4):110-4.
17. Petrušić N, Posavec M, Sabol I, Mravak Stipetić M. The effect of tobacco smoking on salivation. *Acta Stomatol Croat*. 2015;49(4):309–15.
18. Benedetti G, Campus G, Strohmenger L, Lingström P. Tobacco and dental caries: a systematic review. *Acta Odontol Scand*. 2013;71:363-71.
19. Navazesh M, Kumar SKS. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(S2):35-40.
20. Caslavaska V, Moreno E, Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. *Arch Oral Biol*. 1975;20(5-6):333-9.
21. Dijkman TG, Arends J. The role of “CaF₂-like” material in topical fluoridation of enamel in situ. *Acta Odontol Scand*. 1988;46(6):391-7.
22. Kiss E, Sewon L, Gorzó I, Nagy K. Salivary calcium concentration in relation to periodontal health of female tobacco smokers: a pilot study. *Quintessence Int*. 2010;41(9):779–85.
23. Manea A, Nechifor M. Research on plasma and saliva levels of some bivalent cations in patients with chronic periodontitis (salivary cations in chronic periodontitis). *Rev Med Chir Soc Me Nat Iasi*. 2014;118(2):439–49.
24. Poles AA Jr, Balcão VM, Chaud MV, Vila MMDC, Aranha N, Yoshida VMH, et al. Study of the elemental composition of saliva of smokers and nonsmokers by X-ray fluorescence. *Appl Radiat Isot*. 2016;118:221-7.
25. Šutej I, Peroš K, Benutić A, Capak K, Bašić K, Rošin-Grget K. Salivary calcium concentration and periodontal health of young adults in relation to tobacco smoking. *Oral Health Prev Dent*. 2012;10(4):397–403.
26. Kolte AP, Kolte RA, Laddha RK. Effect of smoking on salivary composition and periodontal status. *J Indian Soc Periodontol*. 2012;16(3):350-3.
27. Bašić K, Peroš K, Šutej I, Rošin-Grget K. The Effect of salivary calcium and fluoride toothpaste on the formation of KOH-soluble fluoride: in vitro study. *Acta Stomatol Croat*. 2015;49(3):221-7.
28. Larsen MJ, Richards A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. *Caries Res*. 2001;35(1):57–60.
29. Rošin-Grget K, Šutej I, Linčir I. The effect of saliva on the formation of KOH-soluble fluoride after topical application of amine fluoride solutions of varying fluoride concentration and pH. *Caries Res* 2007;41:235-8.
30. Petzold M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: A descriptive in vitro study of the CaF₂ precipitation and microstructure. *Caries Res* 2001;35(1):45–51.
31. Rölla G, Ögaard B, Cruz R. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanisms of interaction. *J Clin Periodontol* 1993;20:105–8.

9. SAŽETAK

Margareta Ognjanović, Marko Zlendić

UČINAK RAZLIČITIH PREPARATA FLUORA SA SLINOM PUŠAČA I NEPUŠAČA NA STVARANJE ALKALNO TOPLJIVIH FLUORIDA NA POVRŠINI CAKLINE

Uvod: Fluoridirane zubne paste najrašireniji su oblik opskrbe ionima fluora u prevenciji karijesa. Postoje različiti spojevi fluora koji se mogu pronaći u zubnim pastama, a koji se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi koja određuje mehanizam djelovanja svakoga spoja. Nakon kratkog izlaganja površine zuba fluoridiranim zubnim pastama nastaje kalcijev fluorid. Svrha ovog istraživanja bila je usporediti utjecaj sline pušača i sline nepušača s različitim preparatima fluora na stvaranje alkalno topljivih fluorida na površini cakline.

Materijali i metode: 20 humanih zubi podijeljeno je u dvije glavne skupine po deset zubi. Od svakog zuba odrezana su četiri caklinska uzorka, ukupno 80 uzoraka. Uzorci pojedinoga zuba dodijeljeni su jednoj od četiri podskupine (A, B, C, D). Uzorci nestimulirane sline prikupljeni su od 12 zdravih muških dobrovoljaca, šest pušača i šest nepušača. Koncentracije kalcija, magnezija i fosfata u slini izmjerene su induktivno spregnutom plazmom sa spektrometrijom masa. Uzorci cakline podskupine A tretirani su slinom pušača te smjesom zubne paste s fluorom i deionizirane vode. Uzorci cakline podskupine B tretirani su slinom nepušača te smjesom zubne paste s fluorom i deionizirane vode. Podskupina C tretirana je samo smjesom zubne paste s fluorom i deionizirane vode. Podskupina D služila je kao kontrola, stoga nije tretirana. Postupak je ponovljen nakon šest sati za svaku skupinu. U tretmanu prve skupine korištena je zubna pasta s aminofluoridima, dok se za tretiranje druge skupine koristila zubna pasta koja sadrži natrijev fluorid. Količina KOH-topljivih fluorida određena je metodom po Časlavskoj.

Rezultati: Uzorci cakline podskupine A, tretirani slinom pušača i pastom s aminofluoridima, pokazali su statistički značajno veću količinu alkalno topljivih fluorida stvorenih na površini cakline od uzoraka iz podskupina B, C i D ($p < 0.05$). Među podskupinama koje su u tretmanu sadržavale pastu za zube s natrijevim fluoridom nije pronađena statistički značajno veća količina alkalno topljivih fluorida ($p > 0.05$). Između sline pušača i sline nepušača ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kalcija, magnezija, fosfata, u njihovim omjerima, kao ni u protoku sline ($p > 0.05$).

Zaključak: Pušenje uzrokuje promjene u slini, koja potom s aminofluoridima ima bolji učinak na stvaranje alkalno topljivih fluorida na površini cakline. Statistički značajno veća količina alkalno

topljivih fluorida stvara se na onim uzorcima cakline koji su tretirani slinom pušača i smjesom paste s aminofluoridima u odnosu na caklinske uzorke tretirane istom smjesom i slinom nepušača te na caklinske uzorke tretirane samo smjesom paste za zube. Razlike u utjecaju sline pušača i sline nepušača na stvaranje alkalno topljivih fluorida s natrij fluoridnom pastom nisu pronađene.

Ključne riječi: pušenje, aminofluorid, natrijev fluorid, slina, kalcijev fluorid

10. SUMMARY

Margareta Ognjanović, Marko Zlendić

THE EFFECT OF DIFFERENT FLUORIDE DENTIFRICES WITH SMOKERS' AND NON-SMOKERS' SALIVA ON FORMATION OF KOH-SOLUBLE FLUORIDES ON ENAMEL SURFACE

Introduction: Fluoridated toothpastes are the most widespread form of fluoride ion delivery in caries prevention. Toothpastes may contain different fluoride compounds which differ in the chemical structure that determines the mechanism of action of each compound. A short exposure of the tooth surface to a fluoridated toothpaste results in the production of calcium fluoride. The aim of this research was to compare the impact of smokers' saliva and non-smokers' saliva with different fluoride dentifrices on the formation of alkali-soluble fluoride on the enamel surface.

Materials and methods: Twenty human teeth were randomly divided into two main groups of ten teeth. Four enamel samples were cut from each tooth making a total of 80 samples, distributed into four subgroups (A, B, C, D). Samples of unstimulated saliva were collected from twelve healthy males, six smokers and six non-smokers. The concentration of Calcium, Magnesium and Phosphate in saliva were measured with inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS). Enamel samples from subgroup A were treated with smokers' saliva, and after that with fluoride dentifrice and deionized water. Enamel samples from subgroup B were treated with non-smokers' saliva, fluoride dentifrice and deionized water. Enamel samples from subgroup C was only treated with a fluoride dentifrice and deionized water. Subgroup D was a control group and thus not treated. The procedure was repeated after

six hours for each group. The treatment of each group differed by the fluoride dentifrice used. For the treatment of the first subgroup (A), toothpaste with amine fluorides was used. The second subgroup (B) was treated with sodium fluoride. KOH-soluble fluorides formed on the surface of enamel were determined by applying the method introduced by Časlavská et al., measured by ion selective electrode.

Results: Enamel samples from subgroup A, treated with smokers' saliva and amine fluoride toothpaste showed statistically significantly higher amount of KOH-soluble fluoride created on the enamel surface than it was the case in subgroups B, C and D ($p < 0.05$). Among subgroups that used sodium fluoride toothpaste there was no statistically significant difference in the amount of KOH-soluble fluoride ($p > 0.05$). There was no statistically significant difference in the concentration of Calcium, Magnesium and Phosphate in the saliva of smokers' and non-smokers', nor any difference in the flow of saliva ($p > 0.05$).

Conclusion: Smoking leads to changes in saliva, which then reacts better with amine fluorides. Statistically significantly higher amount of KOH-soluble fluoride was formed on those enamel samples that were treated with smokers' saliva and amine fluoride toothpaste, compared to enamel samples treated with the same toothpaste and non-smokers' saliva and those treated with the toothpaste only. Difference in the influence of smokers' and non-smokers' saliva with sodium fluoride toothpaste on formation of KOH-soluble fluoride was not found.

Key words: smoking, amine fluoride, sodium fluoride, saliva, calcium fluoride