

Utjecaj kalcija i fosfata na odlaganje fluorida u caklinu

Jurinić, Ana Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:897285>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Ana Marija Jurinić

UTJECAJ KALCIJA I FOSFATA NA ODLAGANJE FLUORIDA U CAKLINU

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Rad je ostvaren na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Katedri za farmakologiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Kristina Peroš, Katedra za farmakologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Lana Jelinek, mag. educ. philol. croat et mag. paed.

Lektor engleskog jezika: Janja Kopačević, univ. bacc. philol. angl. et paed.

Sastav Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Kristina Peroš
2. doc. dr. sc. Ivana Šutej
3. doc. dr. sc. Eva Klarić Sever

Datum obrane rada: 13. 07. 2018.

Rad sadrži:

32 stranice

3 tablice

4 slike

CD

Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu izvorni su doprinos autora diplomskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija, odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

Zahvala

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Kristini Peroš na uloženom vremenu, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem roditeljima na vjeri i požrtvornosti.

Zahvaljujem prijateljima i članovima obitelji na podršci.

Tri zvijezde najsajnije, hvala.

Utjecaj kalcija i fosfata na odlaganje fluorida u caklinu

Sažetak

Svrha ovog *in vitro* istraživanja je procijeniti učinak sline pušača u kombinaciji s preparatom koji sadrži kalcij i fosfate na odlaganje fluorida na zubnu caklinu, uz pretpostavku da postoji razlika u koncentraciji kalcija u slini pušača i nepušača.

Sa svakog od deset ekstrahiranih humanih zuba odrezana su četiri caklinska bloka i podijeljeni u četiri skupine (A, B, C, D). Uzorke nestimulirane sline doniralo je 12 zdravih muškaraca, šest pušača i šest nepušača. Zubna krema korištena u istraživanje je *MI Paste Plus* (GC, Alsip, Illinois, SAD). Caklinski blokovi skupine A tretirani su slinom pušača, a zatim smjesom zubne kreme i deionizirane vode. Skupina B tretirana je slinom nepušača, ostatak postupka isti je kao i za skupinu A. Skupina C tretirana je samo smjesom zubne kreme i deionizirane vode. Skupina D služila je kao kontrola. Alkalno topljivi fluoridi stvoreni na površini cakline određeni su prema metodi Časlavske i suradnika i mjereni ion-selektivnom elektrodom. Koncentracije minerala u slini izmjerene su induktivno spregnutom plazmom sa spektrometrijom masa (ICP-MS). Za analizu podataka korišteni su Friedmanov test i neparametrijski Wilcoxonov test parova.

U slinama pušača i nepušača ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kalcija, magnezija, fosfata te njihovih omjera kao ni u protoku sline. Omjer kalcija i magnezija u slini nepušača bio je skoro dvostruko veći. Nije dobivena statistički značajna razlika između skupina u količini alkalno topljivih fluorida na površini cakline.

Unos fluorida na površinu zubne cakline, uz pastu koja sadrži CPP-ACP kompleks, ne ovisi o mineralnom sastavu sline.

Ključne riječi: kalcij, fosfat, fluoridi, slina, pušenje

The effect of calcium and phosphate on fluoride uptake on enamel

Summary

The aim of this *in vitro* study was to assess the effect of smoker's saliva in combination with tooth crèmetaining calcium and phosphate on the enamel uptake of flouride, assuming that there is a difference in the concentration of calcium in the smoker's and non-smoker's saliva.

Four enamel slabs were cut from each of the ten healthy extracted teeth and arranged into 4 groups (A, B, C, D). Unstimulated saliva samples were donated by twelve male healthy volunteers, six smokers and six non-smokers. The toothcrèmeused in the research was *MI Paste Plus* (GC, Alsip, Illinois, SAD). Enamel slabs of the group A were treated with smokers' saliva, and then with the tooth crèmeslurry. Group B was treated with non-smokers' saliva, rest of the procedure was the same as with the group A. Group C was treated only with tooth crème slurry. Group D served as a control group. KOH-soluble fluorides were determined by the method of Caslavská et al. and measured by ion selective electrodes. The concentrations of minerals in the saliva were measured by inductive coupled plasma with mass spectrometry (ICP-MS). Friedman's test and Wilcoxon signed-rank test were used to analyse the data.

There is no statistically significant difference in the concentration of calcium, magnesium and phosphate in the saliva of smokers and non-smokers, nor is there any significant difference in their flow of saliva. The ratio of calcium and magnesium in the non-smokers' saliva was twice bigger than in smokers' saliva. There is no statistically significant difference between these groups in the amount of KOH-soluble fluorides on the enamel surface.

The uptake of flourides on the enamel surface, along with a tooth crème which contains CPP-ACP complex does not depend on the mineral composition of saliva.

Keywords: calcium, phosphate, fluorides, saliva, smoking

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Mehanizam djelovanja topikalnih fluorida	2
1.2. Mineralni sastav sline i pušenje	4
1.3. Kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fosfat	5
1.3.1. Mehanizam djelovanja CPP-ACP-a	6
1.3.2. Kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fluorid fosfat.....	6
2. SVRHA ISTRAŽIVANJA I CILJEVI RADA	8
3. MATERIJALI I POSTUPCI.....	10
3.1. Uzorci cakline	11
3.2. Prikupljanje uzoraka sline.....	12
3.3. Određivanje minerala u slini	12
3.4. Tretiranje caklinskih blokova	13
3.5. Analiza fluora.....	15
3.6. Statistička analiza	15
4. REZULTATI.....	17
5. RASPRAVA	20
6. ZAKLJUČAK	24
7. LITERATURA.....	26
8. ŽIVOTOPIS.....	31

POPIS SKRAĆENICA

CPP	kazein fosfopeptid
CPP-ACP	kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fosfat (eng. <i>Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate</i>)
CPP-ACFP	kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fluorid fosfat (eng. <i>Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Flouride Phosphate</i>)
HNO ₃	dušična kiselina
ICP-MS	induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa (eng. <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy</i>)
KOH	kalijev hidroksid
ppm	<i>parts per million</i>
REA	faktor relativne caklinske abrazivnosti paste (eng. <i>Relative Effectiveness Assessment</i>)
RPM	mjerna jedinica za broj okretaja u minuti (eng. <i>Revolutions Per Minute</i>)
TISAB	puffer otopina koja održava stalnu aktivnost komponenata u otopini (eng. <i>Total Ionic Strength Adjustment Buffer</i>)

1. UVOD

Primjenom topikalnih fluorida uvelike je smanjena prevalencija zubnog karijesa (1). Među preparatima za topikalnu fluoridaciju najprihvaćenije su zubne paste s fluoridima. Fluoridirane zubne paste trebaju imati sposobnost isporučiti slobodni ili topljivi fluorid. Mogu sadržavati fluorid u različitim kemijskim oblicima kao natrij fluorid (NaF), natrijev monofluorofosfat (Na_2FPO_3), olaflur ($\text{C}_{27}\text{H}_6\text{OF}_2\text{N}_2\text{O}_3$), kositreni fluorid (SnF_2) ili njihove kombinacije (2). Postoje i preparati u čijem se sastavu osim fluorida nalazi i kompleks kazein fosfopeptid-amorfni klacijev fosfat (CPP-ACP). Njihova prednost je dostupnost fluoridnih, kalcijevih i fosfatnih iona u jednom proizvodu (3).

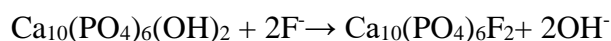
1.1. Mehanizam djelovanja topikalnih fluorida

Zaštitni mehanizmi fluora u djelovanju protiv karijesa, u prvom su redu remineralizacija i mijenjanje metabolizma bakterija (4).

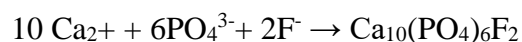
Sve se više ističe važnost slobodnih iona fluora u tekućoj fazi oko kristala apatita, koji bi smanjivali brzinu demineralizacije i ubrzavali remineralizaciju početnih karijesnih lezija (5).

Mehanizam antikarijesnog učinka kemijska je interakcija fluora s caklinom. Tri su moguća načina reakcije fluoridnih iona s hidroksiapatitom:

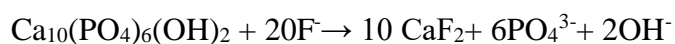
1. Izo-ionska izmjena F^- s hidroksilnim ionima:



2. Stvaranje fluorapatita iz prezasićene otopine:



3. Stvaranje kalcij fluorida:



Reakcije prikazane prvim dvjema jednadžbama nastaju pri dugotrajnoj izloženosti niskoj razini fluorida (0,01 – 10 ppm F), bilo sistemskom, bilo topikalnom primjenom. Rezultat ovih reakcija ugradnja je fluorida u caklinu te se nastali fluoridi nazivaju i *čvrsto* vezanim fluoridima jer su dio apatitske strukture. Treća jednadžba prikazuje stvaranje kalcijevog fluorida (CaF_2) koji se naziva i *labavo* vezanim fluoridom. Za njegovo stvaranje potrebne su mnogo veće koncentracije fluorida (100 – 10 000ppm F) poput onih koje nalazimo u preparatima za topikalnu primjenu (1).

Stvaranje CaF_2 na površini cakline temeljni je mehanizam djelovanja topikalnih fluorida. U slini, pri neutralnom pH, kalcijev fluorid prilično je netopljiv, te tako može biti prisutan tjednima i mjesecima nakon topikalne primjene fluorida. Za dugotrajno zadržavanje kalcijevog fluorida pri neutralnom pH zaslužni su proteini pelikule i sekundarni fosfati koji ga prekrivaju. Padom pH i zrenjem plaka gubi se zaštitni omotač i kalcijev fluorid se otapa (6).

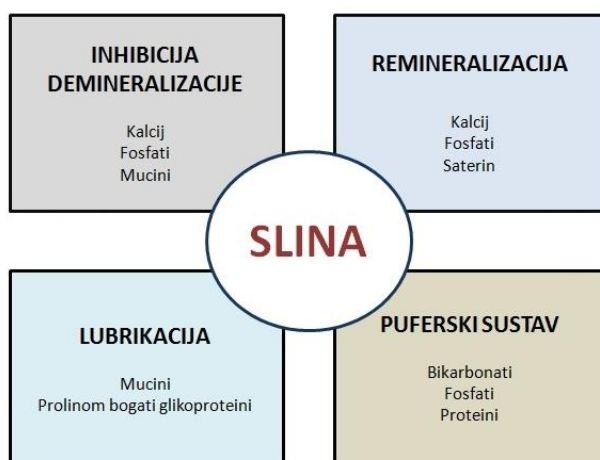
CaF_2 predstavlja rezervoar fluoridnih iona koji se oslobađaju tijekom karijesogenih zbivanja kada se pH spusti ispod kritične vrijednosti za početak demineralizacije. Mobilizacijom fluoridnih iona u tekuću fazu oko kristala apatita, raste njihova koncentracija u slini i plaku. Oslobođeni fluoridni ioni mogu se adsorbirati na površinu kristala i spriječiti daljnji proces demineralizacije, a remineralizaciju ubrzati (5,7).

Važan čimbenik za formiranje CaF_2 je dostupnost kalcijevih iona. Izvori kalcijevih iona su caklina, slina i zubni plak (8). Larsen i Richards (9) pokazali su da je slina čak i u malim količinama važna za uspjeh topikalne fluoridacije, vjerojatno zato što sadržava kalcij.

1.2. Mineralni sastav sline i pušenje

Slina je složena tekućina sastavljena od vode, organskih i anorganskih tvari. Ioni anorganskih tvari koji se nalaze u svim tjelesnim tekućinama postoje i u slini, ali u smanjenim koncentracijama. Kationi u slini su ioni natrija, kalija, kalcija i magnezija. Anionski dio čine ioni klora, fluora, joda te fosfati i bikarbonati (10).

Fosfati, ioni kalcija i fluora djeluju kariostatski i sudjeluju u remineralizaciji tvrdih zubnih tkiva. Ionski kalcij osobito je važan jer pomaže u održavanju ravnoteže između kalcija i kalcij fosfata u zubu i njegovoj okolini. Padom pH koncentracija ionskog kalcija u slini raste. Neionski kalcij vezan je za fosfate, bikarbonate i organske molekule. Koncentracija ionskog fosfata također ovisi o pH, oko 10 – 25 % fosfata nalazi se u ionskom obliku, dok je ostatak vezan za kalcij ili proteine. Udio fluorida u slini u velikoj mjeri određen je njihovim vanjskim unosom. Topikalnom primjenom stvara se kalcij fluorid, a u maloj količini nastaje i magnezijev fluorid (11). Za proces remineralizacije važni su i saterin i prolinom bogati proteini, oni spadaju u skupinu organskih tvari koje pomažu u održavanju supersaturacije kalcija i fosfata. Saterin je fosfoprotein s jakim afinitetom za kalcij, caklinu i druge apatitske površine. Inhibira precipitaciju i rast kristala kalcij fosfata. Slično djeluju i prolinom bogati proteini (12). Bikarbonati i fosfati čine puferski sustav sline. Važni su za održavanje optimalnog pH oko 6,5, čime je onemogućen razvoj patogenih mikroorganizama kojima odgovara kisela ili bazična sredina. Zaštitno djelovanje sline na tvrda zubna tkiva pregledno je prikazano na Slici 1. (13, 14).



Slika 1. Funckija sline u zaštiti tvrdih zubnih tkiva

Pušenje cigareta dovodi do promjene elektrolita na sustavnoj, staničnoj i molekularnoj razini. Dim cigarete kombinacija je brojnih kemikalija, ukupno više od 4000 komponenta, uključujući nikotin, amonijak, akrolein, fenol, acetaldehid, benzopiren, dušikov oksid, ugljikov monoksid, polonij, radij i trijum. U dimu cigarete prisutni su i slobodni radikali koji oštećuju stanice (15). S druge strane, o učincima pušenja na sastav sline, posebno na njezin anorganski dio, ne zna se puno. Istraživanja su pokazala smanjenu koncentraciju kalcija i magnezija u slini pušača u odnosu na slinu nepušača (16, 17). Postoji istraživanje kojim je utvrđena povećana, ali ne statistički značajna koncentracija kalcija u slini mladih, umjerenih pušača (18).

1.3. Kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fosfat

Kompleks kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fosfat (CPP-ACP) bioaktivni je agens, njegove sastavnice su kazein fosfopeptid (CPP) i amorfni kalcijev fosfat (ACP).

Kazein fosfopeptid (CPP) ima sposobnost stabilizacije kalcijeva fosfata u otopini kao amorfni kalcijev fosfat (ACP). Nastaje cijepanjem kazeina iz mlijeka pomoću enzima tripsina. Važnost CPP-a u stabilizaciji amornog kalcijevog fosfata (ACP) na površinu cakline, otkrio je Reynolds sa svojim suradnicima u istraživanju antikariogenih svojstva mlijeka (19). Antikariogenost CPP-ACP kompleksa dokazana je na životinjama i kod karijesnog modela *in vitro* (20 – 22). Istraživanja provedena na humanim karijesnim modelima *in situ* pokazala su da CPP-ACP može spriječiti demineralizaciju cakline i potaknuti remineralizaciju (23 – 25).

Kazein fosfopeptid sadrži sekvenciju Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu, koja stabilizira kalcijev fosfat na svoj višestruki ostatak fosfoserina. CPP se veže za meka tkiva, pelikulu, zubni plak i caklinu (26). Svaka molekula CPP-a može vezati do 25 kalcijevih iona, 15 fosfatnih iona i 5 fluoridnih iona. Kalcij fosfat u tim kompleksima biološki je dostupan za remineralizaciju zubne cakline (27).

CPP-ACP se kao dodatni preventivni agens preporučuje osobama s visokim karijes rizikom i kod onih s lošom kontrolom plaka, trudnicama, u terapiji erozija i bijelih mrlja, kod pacijenata s preosjetljivošću nakon izbjeljivanja zuba i u terapiji dentinske preosjetljivosti. Primjena je vrlo jednostavna, a jedina kontraindikacija za primjenu ove skupine preparata je preosjetljivost na derivate mlijeka jer sadrže mliječni protein kazein (28).

1.3.1. Mehanizam djelovanja CPP-ACP-a

Veživanjem za površinu zuba, zubni plak i sluznicu usne šupljine kompleks CPP-ACP stvara rezervoar iona kalcija i fosfata. Pri padu pH u usnoj šupljini i plaku, oslobađaju se ioni kalcija i fosfata. Slobodni ioni održavaju stanje prezasićenosti na površini cakline i uključuju se u proces remineralizacije (29).

CPP ima puferski i antibakterijski utjecaj na plak i ometa rast i adheziju *Streptococcus mutans*-a i *Streptococcus sobrius*-a. CPP-ACP može se ugraditi u supragingivni plak vežanjem za površinu bakterijskih stanica i međustanični matriks plaka kao i za makromolekule adsorbirane na površini zuba. Na taj način dolazi do formiranja manje kariogenog plaka (30). CPP-ACP značajno smanjuje aktivnost karijesa ovisno o dozi. Površina zuba tretirana preparatima na bazi kazein fosfopeptid-amorfnog kalcijevog fosfata otpornija je na djelovanje kiselina (31). Jedan postotni CPP-ACP dovodi do smanjenja karijesa glatkih ploha za 55 % i do smanjenja karijesa fisura za 46 %. Taj učinak odgovara učinku fluorida u koncentraciji od 500 ppm (21).

1.3.2. Kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fluorid fosfat

Iako se fluoridi navode kao najznačajniji u prevenciji i terapiji početnih karijesnih lezija, istraživanja su pokazala da postoje ograničenja u njihovoj sposobnosti remineralizacije i da nedovoljna koncentracija iona kalcija i fosfata u biofilmu utječe na njihovu učinkovitost. Za formiranje jedne molekule fluorapatita potrebna su 2 iona fluora, 10 kalcijevih i 6 fosfatnih iona (19).

Djelovanje CPP-ACFP-a na remineralizaciju cakline pripisuje se stvaranju CPP stabiliziranog amorfnog kalcijevog fluoridnog fosfata. Primjenom na površinu zuba povećava se broj fluoridnih iona u plaku i koncentracija biodostupnih iona kalcija i fosfata. Kazein fosfopeptid omogućava ionima kalcija i fosfata da uz pomoć fluorida remineraliziraju površinski sloj cakline i formiraju fluorapatit (32).

Zbog sadržaja fluorida, njegova primjena ne preporučuje se kod djece mlađe od šest godina, niti prije izbjeljivanja. Indiciran je kod kompromitiranih pacijenata; kod sindroma suhih usta, refluksa želučanog sadržaja, bulimije (33).

U terapiji početnih karijesnih lezija kombinacija kazein fosfopeptid-amorfnog kalcijevog fosfata (CPP-ACP) s fluoridima, pokazala se značajnijom u odnosu na paste koje ne sadrže CPP-ACP (32).

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA I CILJEVI RADA

Svrha ovog *in vitro* istraživanja je procijeniti učinak sline pušača u kombinaciji s preparatom koji sadrži kalcij i fosfate na odlaganje fluorida u zubnu caklinu, uz pretpostavku da postoji razlika u koncentraciji kalcija u slini pušača i nepušača. Kalcij i fosfati trebali bi olakšavati odlaganje fluorida na caklinu služeći poput nosača fluorida.

Ciljevi ovog rada su utvrditi:

1. Postoji li razlika u protoku sline u pušača u odnosu na nepušače.
2. Postoji li razlika u koncentracijama kalcija, magnezija i fosfata u slini pušača u odnosu na nepušače.
3. Postoji li razlika u stvaranju KOH-topljivih fluorida nakon tretmana zubne cakline slinom pušača i CPP-ACP preparata i tretmana slinom nepušača i CPP-ACP preparata.

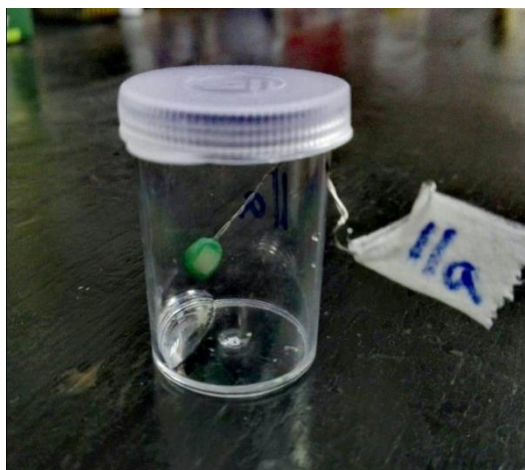
3. MATERIJALI I POSTUPCI

Istraživanje je u skladu s temeljnim načelima Helsinške deklaracije, te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: 05-PA-26-4-205/06), a provedeno je na Katedri za farmakologiju Stomatološkog fakulteta.

3.1. Uzorci cakline

U istraživanju je korišteno 10 kirurški izvađenih, humanih zuba (Zavod za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska). Nakon vađenja, svaki zub očišćen je od ostataka tkiva, dezinficiran 2,6-postotnim natrijevim hipokloritom u trajanju od 30 minuta i pohranjen u fiziološku 0,9-postotnu otopinu natrijeva klorida do samog eksperimenta. Svježa fiziološka otopina mijenjana je jednom tjedno. Od svakog su zuba dijamantrnim diskom odrezana četiri caklinska bloka, ukupno 40 blokova.

Blokovi su podijeljeni u četiri skupine (A, B, C, D). Radi lakšeg rukovanja, sve su površine, osim površine cakline, prekrivene stomatološkim voskom *Crowax* (*E&H Renfert*, Singen, Njemačka) na koji je bila pričvršćena ortodontska ligaturna žica. Caklinske površine mjerene su kaliperom, prenesene na milimetarski papir i izražene su u mm². Nakon mjerenja, svaki je blok pohranjen u zatvorenu plastičnu čašicu s nekoliko kapi destilirane vode radi očuvanja vlažnost (Slika 2.). Tako pripremljeni blokovi do eksperimenta bili su pohranjeni u hladnjaku, a na sam dan eksperimenta na sobnoj temperaturi.



Slika 2. Primjer caklinskog bloka pripremljenog za eksperiment

3.2. Prikupljanje uzoraka sline

Uzorke sline doniralo je 12 muških osoba. Šest uzoraka sline donirali su pušači koji su pušili više od 20 cigareta na dan kroz pet godina, u prosjeku puše 6,3 godine. Drugih šest uzoraka 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. Dobrovoljci su dobili informacije o ciljevima i planu istraživanja, te su potpisali pristanak. Svi su ispitanici bili zdravi muškarci, prosječne dobi od $21,75 \pm 0,86$ godina.

Nestimulirana slina skupljana je ujutro između 8 i 12 sati na Katedri za Farmakologiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Svi ispitanici bili su obaviješteni o tijeku prikupljanja sline. Rečeno im je da dva sata prije skupljanja sline ne konzumiraju hranu i piće, osim obične vode. Pušači nisu smjeli pušiti taj dan do doniranja sline. Prije samog početka zamoljeni su da se umire i da usta isperu običnom vodom. Potrebni uzorci nestimulirane sline prikupljani su u plastične posudice kroz 15 minuta, dobrovoljci su lagano sklopljenih usta pustili da se slina skupi u ustima i lagano ispljunuli u prethodno izvaganu posudicu (34). Svaki uzorak sline izvagan je nakon skupljanja te je izračunat protok sline.

Od svakog uzorka otpipetirano je 400 μ Lsline u posebne plastične posudice za određivanje koncentracije minerala. Uzorci su smrznuti na -20° C. Prije početka eksperimenta po 1 ml sline svakog uzorka pušača premješten je u jednu posudu koja čini *pool* sline pušača. Isto je napravljeno i sa slinom nepušača.

3.3. Određivanje minerala u slini

Mjerenje koncentracije kalcija, magnezija i fosfata u slini provedeno je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Korišten je *Agilent 7500 cx* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Njemačka), induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa (ICP-MS). Uzorci sline (400 μ L) digestiraju se dušičnom kiselinom (dva mililitra 65 % HNO_3 , jedan mililitar H_2O) pomoću visokotlačne mikrovalne digestije (*UltraCLAVE*, Milestone, Italija).

Nakon hlađenja razrjeđuju se 1-postotnom (v/v) HNO₃ 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.

3.4. Tretiranje caklinskih blokova

Zubna krema korištena u ovom istraživanju je *MI Paste Plus* (GC, Alsip, Illinois, SAD) (Slika 3.). Svojstva preparata i sastav, kako je naveo proizvođač, prikazani su u Tablici 1.

Za uporabu u tretmanu pripravljena je smjesa *MI Paste Plus* i deionizirane vode u omjeru 1:3, jednom gramu paste dodana su tri mililitra deionizirane vode. Smjesa se pripremala 15 minuta prije svakoga tretmana.

Uzorci skupine A uronjeni su u slinu pušača i miješani pet minuta, zatim su miješani u smjesi zubne kreme i deionizirane vode kroz tri minute, nakon čega su ispirani miješanjem u destiliranoj vodi 30 sekundi. Uzorci skupine B uronjeni su u slinu nepušača i miješani pet minuta, ostatak postupka isti je kao i za skupinu A. Uzorci skupine C tretirani su samo smjesom zubne kreme i deionizirane vode, a skupina D služila je kao kontrola.

Nakon tretmana blokovi su vraćeni u zatvorene čašice s nekoliko kapi destilirane vode. Postupak je ponovljen nakon šest sati za svaku skupinu, a nakon toga blokovi su ponovno vraćeni u zatvorene čašice s nekoliko kapi destilirane vode.



Slika 3. MI Paste Plus

Tablica 1. Sastav *MI Paste Plus*

	Proizvođač	Fluor	Sastojci
<i>MI Paste Plus</i>	GC, Alsip, Illinois, SAD	Natrijev fluorid 900 ppm + CPP-ACP	voda, glicerol, karboksimetil celuloza natrij, propilenglikol, silicij dioksid, titanijev dioksid, ksilitol, fosforna kiselina, sorbitol, aroma, etil p-hidroksibenzoat, propil p-hidroksibenzoat, butil p-hidroksibenzoat

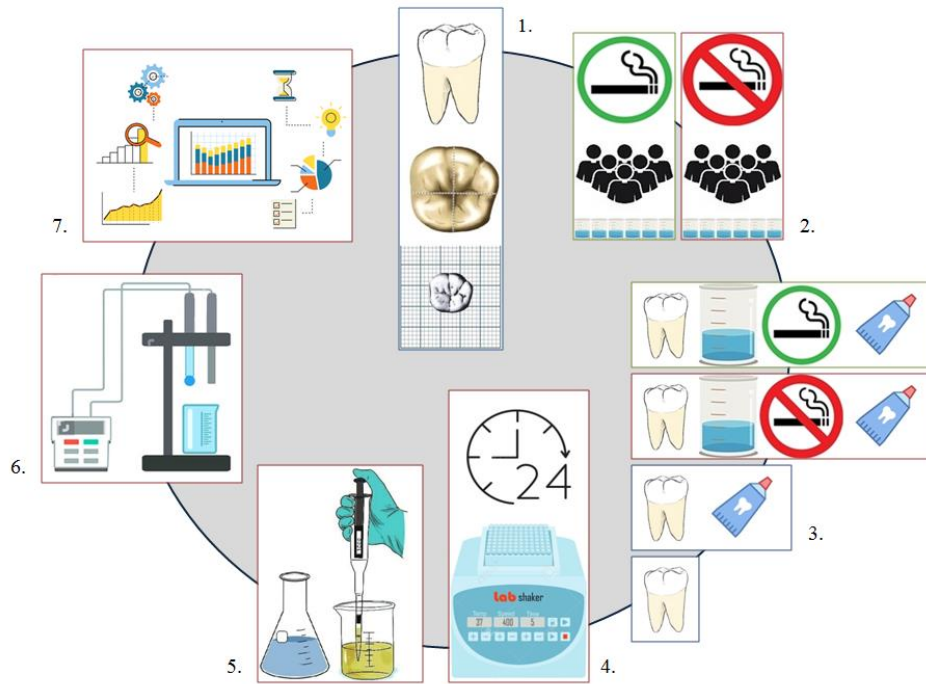
3.5. Analiza fluora

Alkalno topljivi fluoridi stvoreni na površini cakline određeni su prema metodi Časlavske i suradnika (35). Svaki uzorak uronjen je 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. Otopine su neutralizirane s 1,5 ml HNO_3 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 topljivog fluorida izračunata je kao što su opisali Dijkman i Arends (36).

3.6. Statistička analiza

Za ispitivanje ukupne razine značajnosti za podatke korišten je Friedmanov test. Neparametrijski Wilcoxonov test parova korišten je za određivanje značenja promjena u količini alkalno topljivih fluorida stvorenih na površini cakline između ispitnih skupina. Statistički značajnim smatra se $p < 0,05$. Sve statističke analize provedene su programskim paketom *Statistica* (verzija 7.1, *StatSoft, Inc*).

Shematski prikaz tijeka istraživanja vidljiv je na Slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz tijeka istraživanja

1. Ekstrahirani zub izrezan na caklinske blokove; 2. Skupina pušača i nepušača, donatori nestimulirane sline; 3. Tretman pojedine skupine; 4. Nakon tretmana uzorci cakline uronjeni su u 1,5 ml KOH, lagano tresući kroz 24 h; 5. Uzorcima je dodano 1,5 ml HNO₃ i 0,15 ml TISAB III; 6. Određivanje fluora elektrodom; 7. Obrada podataka.

4. REZULTATI

U slinama pušača i nepušača ne postoji statistički značajna razlika za promatrane parametre. Koncentracija kalcija u slini nepušača je veća, ali ne pokazuje statističku značajnost. Koncentracija magnezija i fosfata veća je u slini pušača, ali ne i statistički značajna. Omjer kalcija i magnezija u slini nepušača gotovo je dvostruko veći.

Protok sline u nepušača veći je nego u pušača, ali nema statističku vrijednost.

Dobivene vrijednosti koncentracije minerala i protoka sline prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Usporedba koncentracijskih vrijednosti minerala i protoka sline pušača i nepušača

Skupina	Pušač n = 6	Nepušač n = 6
	Srednja vrijednost ± SD	
Ca(mmol/L)	1,18 ± 0,67	1,44 ± 0,76
Mg(mmol/L)	0,49 ± 0,30	0,34 ± 0,19
P(mmol/L)	8,23 ± 2,65	5,95 ± 1,40
Ca/Mg	2,77 ± 1,52	5,64 ± 3,92
Ca/P	0,14 ± 0,06	0,25 ± 0,13
Mg/P	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,03
Protok(ml/min)	0,21 ± 0,11	0,45 ± 0,22

Količina alkalno topljivih fluorida na površini cakline u skupini A, koja je tretirana slinom pušača i smjesom zubne kreme ne pokazuje statističku značajnost u odnosu na skupinu B, C i D.

Količina alkalno topljivih fluorida u skupini koja je tretirana slinom nepušača i smjesom zubne kreme (skupina B), veća je u odnosu na skupine A, C i D, ali nije statistički značajna.

Podatci o količini ugradnje alkalno topljivih fluorida na površinu cakline nalaze se u Tablici 3.

Tablica 3. Podatci o količini ugradnje alkalno topljivih fluorida na površinu cakline nakon tretmana slinom i smjesom *MI Paste Plus* (0,09%F) n=10

Skupina	Tretman	KOH-topljivi fluoridi μg/cm ² Srednja vrijednost ± SD	Značajnost
A	Slina pušača + smjesa <i>MI Paste Plus</i>	0,14 ± 0,09	-
B	Slina nepušača + smjesa <i>MI Paste Plus</i>	0,90 ± 1,73	-
C	Samo smjesa <i>MI Paste Plus</i>	0,26 ± 0,32	-
D	Bez tretmana	0,46 ± 1,01	-
Friedmanov ANOVA test ne pokazuje značajnost (p < 0,05)			
Wilcoxonov test parova ne pokazuje značajnost (p < 0,015)			

5. RASPRAVA

Slina ima važnu ulogu u inicijaciji, sazrijevanju i metabolizmu plaka. Protok sline i njezin sastav utječu na formiranje zubnog kamenca, razvoj karijesa i parodontne bolesti. Glavne anorganske komponente plaka su kalcij i fosfati (37).

Kalcij u slini najčešće je istraživana u svezi s parodontnom bolesti. U brojnim istraživanjima istaknuto je da pušenje znatno utječe na razvoj parodontitisa te je pušenje identificirano kao jedan od rizičnih čimbenika za njegovo nastajanje (38).

Studije koje govore o mineralnom sastavu sline pušača i nepušača malobrojne su i bez jasnih zaključaka.

U nekim istraživanjima pronađena je statistički značajna razlika u koncentraciji kalcija u slini. Povišena razina salivarnog kalcija zabilježena je kao karakteristika parodontoloških bolesnika (39 – 41).

Rezultati istraživanja K. S. Rajesha i suradnika (42) pokazuju statistički značajno veću koncentraciju kalcija u slini nepušača s parodontitisom u odnosu na koncentraciju kalcija u slini nepušača bez parodontitisa. I u istraživanju koje su proveli Kambalyal i suradnici (47), u nepušača s parodontitisom vrijednost salivarnog kalcija bila je veća u odnosu na vrijednosti dobivene u zdravih ispitanika. Isto tako, u istraživanju koje su proveli Khalili i suradnici (43) pronađena povećana koncentracija kalcija u slini povezana je s parodontitisom.

Sewón i suradnici povećanu koncentraciju kalcija u slini povezali su s destrukcijom kosti do koje dolazi u pacijenta s parodontitisom (44). U drugom istraživanju pronašli su veću koncentraciju kalcija u slini u ispitanika koji puše više od deset cigareta dnevno. Otkrili su da pušači imaju manju mineralnu gustoću kostiju pa pretpostavljaju da je povećana koncentracija kalcija u slini povezana sa skeletnim poremećajem kalcija (45).

I Kiss i suradnici (46) istraživali su razliku u koncentraciji kalcija u slini pušača i nepušača s parodontitisom i bez njega. Pronašli su značajno veću količinu kalcija u slini kod pušača u odnosu na nepušače.

U istraživanju u kojem su sudjelovali zdravi ispitanici, utvrđena je smanjena koncentracija kalcija i magnezija u slini pušača u odnosu na koncentracije istih minerala u slini nepušača, ali dobivene vrijednosti nisu pokazale statistički značaj (47). Smanjenu koncentraciju kalcija u slini zdravih pušača pronašli su i Kolte i suradnici (48).

Manea i Nechifor (49) pokazali su da pušenje ne utječe na koncentraciju kalcija u slini. Rezultati studije ne pokazuju značajne razlike u koncentraciji kalcija u slini pušača s parodontitisom i pušača bez parodontitisa.

Istraživanje Polesa i suradnika (50) pokazalo je da koncentracija kalcija s godinama pušenja kod žena raste, dok kod muškaraca opada.

U sličnom istraživanju Šutej i suradnika (18) nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji kalcija u slini pušača i slini nepušača.

U rezultatima ovog istraživanja također nije bilo statistički značajne razlike između koncentracije kalcija u slini pušača i nepušača, što je u skladu s rezultatima koje su dobili Kambalyal i suradnici i Kolte i suradnici (47, 48). Ispitanici ovog istraživanja bili su mlađe dobi, kao i ispitanici Šutej i suradnika (18), za razliku od ispitanika istraživanja Kissa i suradnici (46), koji su imali oko 50 godina. Svi ispitanici ovog istraživanja bili su zdravi muškarci, dok su ispitanici u istraživanju Kissa i suradnica (46) bile žene, od kojih je većina imala parodontitis.

U istraživanju Manea i Nechifora (49) uočena je statistički značajno veća koncentracija magnezija u slini kod ispitanika s parodontitisom nego kod zdravih. Također pronađena je i značajno veća koncentracija magnezija kod pušača s parodontitisom nego kod nepušača s parodontitisom. Uočen je i veći Ca/Mg omjer kod ispitanika s parodontitisom u odnosu na zdrave.

U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika između koncentracije magnezija u slini pušača i slini nepušača iako je koncentracija magnezija u slini pušača viša. Omjer kalcija i magnezija, iako ne pokazuje statistički značaj bio je skoro dvostruko veći u slini nepušača.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da nema statistički značajne razlike u protoku sline između pušača i nepušača. To je sukladno onome što su pronašli Šutej i suradnici (18).

Istraživanje koje su proveli Rad M. i suradnici (51) pokazuje da dugoročno pušenje značajno smanjuje protok sline. Ispitanici u studiji Rada i suradnika (51) puše prosječno 12,5 godina, ispitanici ovog istraživanja 6,5 godina, a ispitanici istraživanja Šutej i suradnika (18) pet godina, značajna razlika u protoku sline nije dobivena, vjerojatno zbog kraćeg vremena izloženosti pušenju.

Studije koje govore o utjecaju sastava sline na unos fluorida na površinu zubne cakline nude različita objašnjenja mehanizma unosa fluorida, ovisno o sastavu preparata.

Dokazano je da ravnoteža između remineralizacije i demineralizacije ovisi o koncentraciji kalcija i fosfatnih iona u okolišu (52).

U istraživanju Pouresamija i suradnika (53) nakon primjene pasta koje sadrže CPP-ACP ili CPP-ACFP, zabilježeno je dvostruko povećanje koncentracije kalcija i trustruko

povećanje koncentracije fosfatnih iona u slini i u zubnom plaku. Značajno veća je bila koncentracija salivarnog fluorida u skupini CPP-ACFP.

Srinivasan i suradnici (54), pokazali su da slina sama ne čini povoljan okoliš za remineralizaciju, stoga je korištenje proizvoda za remineralizaciju bitno jer pri tome dolazi do uspostave dobrih uvjeta za proces remineralizacije zubne cakline.

Jayrajan i suradnici (55) uspoređivali su remineralizacijske efekte CPP-ACP-a i CPP-ACFP-a. Utvrđeno je da obje paste značajno pridonose remineralizaciji, iako je kod CPP-ACFP-a zabilježena viša stopa remineralizacije, razlika između skupina nije statistički značajna.

U drugom istraživanju, remineralizacija inducirana s CPP-ACFP pastom pokazala se značajno većom u odnosu na remineralizaciju potaknutu CPP-ACP-om, ali u ovom istraživanju korištena humana caklina bila je prethodno razmekšana. Rezultati ukazuju na značajan učinak fluorida i CPP-ACP-a na remineralizaciju (54).

Kombinacija CPP-ACP-a s fluoridima rezultira nakupljanjem kalcija i fosfata na površini cakline zajedno s ionima fluora. Na taj su način osigurani svi potrebni ioni za formiranje kristala fluoroaptita koji je otporniji na djelovanje kiselina (56).

U ovom istraživanju, kombinacija CPP-ACP-a s fluoridima ne pokazuje statističku značajnost u koncentraciji fluorida na površini cakline tretirane slinom pušača ili slinom nepušača kao ni bez tretmana slinom. U ovom su istraživanju korišteni intaktni uzorci cakline, za razliku od Srinivasana i suradnika (54) gdje se uzorci cakline bili erodirani.

Provedeno istraživanje donosi nova saznanja o utjecaju sastava sline u kombinaciji s preparatom koji sadrži kalcij i fosfate na unos fluorida na površinu zubne cakline. Nije pronađena ni jedna druga studija koja uključuje uzorke humane sline mladih zdravih ljudi u istraživanju CPP-ACP pasti. Nedostatak razlike unosa fluorida među skupinama vjerojatno je posljedica sastava korištene paste. Pokazalo se da slina zdravih ljudi uz pastu korištenu u istraživanju nije presudna za unos fluorida. Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu za istraživanjima većih razmjera u koje će biti uključen veći broj uzoraka sline.

6. ZAKLJUČAK

Unos fluorida na površinu zubne cakline, uz pastu koja sadrži CPP-ACP kompleks, ne ovisi o mineralnom sastavu sline. Moguće objašnjenje je visoka koncentracija kalcija već sadržana u pasti. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dobiveni rezultati bolje razjasnili.

U ovoj studiji na rezultate sigurno utječe i mladost i zdravlje pušača. Potrebna su dodatna istraživanja i u smjeru usporedbe CPP-ACP pasti s međudjelovanjem sline i drugih fluoridnih preparata.

7. LITERATURA

1. Rošin-Grget K, Peroš K, Šutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Med Acad.* 2013;42(2):179-88.
2. van Loveren C. *Toothpastes.* Karger, Amsterdam: Monographs in Oral Science; 2013.
3. Rao A, Malhotra N. The role of remineralizing agents in dentistry: A review. *Compend Contin Educ Dent.* 2011;32(6):26-33.
4. Jurić H. i sur. *Dječja dentalna medicina.* Zagreb: Naklada Slap; 2015.
5. Linčir I i sur. *Farmakologija za stomatologe.* 3rd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
6. Rošin-Grget K, Linčir I. Current concept on the anticaries fluoride mechanism of the action. *Coll Antropol.* 2001; 25(2):703-12.
7. 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;69:7805;820-3.
8. 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(S1):45-51.
9. 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.
10. Šutalo, J. *Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva.* Zagreb: Naklada Zadro; 1994
11. Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(5):E449-55.
12. Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JR, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, Amado FM. The role of salivary peptides in dental caries. *Biomed Chromatogr.* 2005;19(3):214-22.
13. Cekić-Arambašin A i suautori. *Oralna medicina.* Zagreb: Školska knjiga; 2005
14. Benn AM, Thomson WM. Saliva: an overview. *N Z Dent J.* 2014;110(3):92-6.
15. Pasupathi P, Saravanan G, Farook J. Oxidative stress bio markers and antioxidant status in cigarette smokers compared to nonsmokers. *J Pharm Sci Res.* 2009;1: 55-62.
16. Bafghi AF, Tabrizi AG, Bakhshayi P. The Effect of Smoking on Mineral and Protein Composition of Saliva. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2015;27(81):301-5.
17. Zuabi O, Machtei EE, Ben-Aryeh H, Ardekian L, Peled M, Laufer D. The effect of smoking and periodontal treatment on salivary composition in patients with established periodontitis. *J Periodontol.* 1999;70(10):1240-6.

18. 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.
19. Reynolds EC. Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate: The Scientific Evidence. *Adv Dent Res.* 2009;21:25-9.
20. Reynolds EC, Johnson IH. Effect of milk on caries incidence and bacterial composition of dental plaque in the rat. *Arch Oral Biol.* 1981;26(5):445-51.
21. Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, Perich JW. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J Dent Res.* 1995;74(6):1272-9.
22. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res.* 1997;76(9):1587-95.
23. Silva MF, Burgess RC, Sandham HJ, Jenkins GN. Effects of water-soluble components of cheese on experimental caries in humans. *J Dent Res.* 1987;66(1):38-41.
24. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res.* 2003;82(3):206-11.
25. Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugarfree chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res.* 2004;38(6):551-6.
26. Zhao, Liu Y, Sun W, Zhang H, Jie Zhao et al. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chem Cent J.* 2011;5:40:1-7.
27. Karlinsey RL, Mackey AC. Solid-state preparation and dental application of an organically modified calcium phosphate. *J Mater Sci.* 2009;44:346-9.
28. Reema SD, Lahiri PK, Roy SS. Review of casein phosphopeptides-amorphous calcium phosphate. *Chin J Dent Res.* 2014;17:7-14.
29. Yengopal V, Mickenautsch S. Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a meta-analysis (Review Article). *Acta Odontol Scand.* 2009;67:321-32.
30. Gupta R, Prakash V. CPP-ACP Complex as a New Adjunctive Agent for Remineralisation: A Review. *Oral Health Prev Dent.* 2011;9:151-65.
31. Somani R, Jaidka S, Singh DJ, et al. Remineralizing potential of various agents on dental erosion. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2014;4:104-108.

32. Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res.* 2008;42(2):88-97.
33. Miletić I, Baraba A, Anić I. Minimalna intervencija. *Sonda.* 2009;10(19):38-41.
34. Navazesh M, Kumar SKS. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc.* 2008;139S:35S-40S.
35. 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.
36. 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.
37. Haake SK, Newman MG, Nisengard RJ, Sanz M. Periodontal Microbiology. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology.* 4th edition Philadelphia: WB Saunders; 2002: 96-112.
38. Johnson GK, Hill M. Cigarette Smoking and the Periodontal Patient. *J Periodontol.* 2004;75(2):196-209.
39. Sewon LA, Karjalainen SM, Sainio M, Seppä O. Calcium and other salivary factors in periodontitis-affected subjects prior to treatment. *J Clin Periodontol.* 1995;22:267-70.
40. Sewón LA, Karjalainen SM, Söderling E, Lapinlaimu H, Simell O. Association between salivary calcium and oral health. *J Clin Periodontol.* 1998;25:915-9.
41. Sewón L, Söderling E, Karjalainen S. Comparative study on mineralization-related intraoral parameters in periodontitis-affected and periodontitis-free adults. *Scand J Dent Res.* 1990;98:305-12.
42. Rajesh KS, Zareena, Hegde S, Arun Kumar MS. Assessment of salivary calcium, phosphate, magnesium, pH, and flow rate in healthy subjects, periodontitis, and dental caries. *Contemp Clin Dent.* 2015;6(4):461-5.
43. Khalili J, Biloklytska HF. Salivary calcium: a risk indicator in periodontal disease. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48:1361-2.
44. Sewón L, Mäkelä M. A study of the possible correlation of high salivary calcium levels with periodontal and dental conditions in young adults. *Arch Oral Biol.* 1990;35(Suppl):211S-2S.

45. Sewón L, Laine M, Karjalainen S, Doroguinskaia A, Lehtonen-Veromaa M. Salivary calcium reflects skeletal bone density of heavy smokers. *Arch Oral Biol.* 2004 ;49(5):355–8.
46. 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.
47. Kambalyal P, Kambalyal P, Hungund S. Comparison of salivary calcium level in smokers and non-smokers with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, and healthy controls *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(Suppl 2):S68–S73.
48. Kolte AP, Kolte RA, Laddha RK. Effect of smoking on salivary composition and periodontal status. *J Indian Soc Periodontol.* 2012;16(3):350-3.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Llana C, Forner L, Baca P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *J Contemp Dent Pract.* 2009;10:1-9.
53. Poureslami H, Hoseinifar R, Khazaeli P, Hoseinifar R, Sharifi H, Poureslami P. Changes in the Concentration of Ions in Saliva and Dental Plaque after Application of CPP-ACP with and without Fluoride among 6-9 Year Old Children.. *J Dent Biomater.* 2017;4(1):361-6.
54. Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan SC. Comparison of the remineralization potential of CPP–ACP and CPP–ACP with 900ppm fluoride on eroded human enamel: An in situ study. *Arch Oral Biol.* 2010;55:541-4.
55. Jayarajan J, Janardhanam P, Jayakumar P, et al. Efficacy of CPP-ACP and CPP-ACPF on enamel remineralization-An in vitro study using scanning electron microscope and DIAGNO-dent. *Indian J Dent Res.* 2011;22:77-82.
56. Somani R, Jaidka S, Singh DJ, et al. Remineralizing potential of various agents on dental erosion. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2014;4:104-8.

8. ŽIVOTOPIS

Ana Marija Jurinić rođena je 27. siječnja 1993. godine u Čakovcu. Nakon završetka osnovne škole u Murskom Središću, upisuje Gimnaziju Josipa Slavenskog u Čakovcu, opći smjer. Po završetku gimnazije upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2017. godine sudjeluje u projektu Hrvatskog farmakološkog društva pod nazivom „Europski certificirani farmakolog - EuCP Program“. Za vrijeme studija bila je članica volonterskog Projekta za promociju oralnog zdravlja slijepih i slabovidnih osoba.