

Utjecaj kalcija i fosfata na odlaganje fluorida u caklinu

Ana Marija Jurinić, dr. med. dent.
Doc. dr. sc. Kristina Peroš²

[1] diplomirala u ak. godini 2017./18.

[2] Katedra za farmakologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

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 (2). Postoje i preparati u čijem se sastavu osim fluorida nalazi i kompleks kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fosfat (CPP-ACP). Njihova prednost je dostupnost fluoridnih, kalcijevih i fosfatnih iona u jednom proizvodu (3). Temeljni mehanizam djelovanja topikalnih fluorida je stvaranje kalcijevog fluorida (CaF_2) na površini cakline (4). 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 daljnju demineralizaciju, a ubrzati remineralizaciju. (5, 6). Važan čimbenik za formiranje CaF_2 je dostupnost kalcijevih iona. Izvori kalcijevih iona su caklina, slina i zubni plak (7). Larsen i Richards (8) pokazali su da je slina čak i u malim količinama važna za uspjeh topikalne fluoridacije, vjerojatno zato što sadržava kalcij.

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 klorida, fluora, joda te fosfati i bikarbonati (9). Fosfati, ioni kalcija i fluora djeluju kariostatski i sudjeluju u reminerali-

zaciji tvrdih zubnih tkiva (10).

Poznato je da pušenje cigareta dovodi do promjene elektrolita na sustavnoj, staničnoj i molekularnoj razini. 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 (11, 12). Postoji istraživanje kojim je utvrđena povećana, ali ne statistički značajna koncentracija kalcija u slini mladih, umjerenih pušača (13).

CPP-ACP (ACFP) i mehanizam djelovanja

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) (14). Antikariogenost CPP-ACP kompleksa dokazana je na životinjama i kod karijesnog modela in vitro (15 – 17). Istraživanja provedena na humanim karijesnim modelima in situ pokazala su da CPP-ACP može spriječiti demineralizaciju cakline i potaknuti remineralizaciju (18 – 20).

Vezivanjem 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 (21). 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 vezanjem 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 (22).

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. Djelovanje kazein fosfopeptid-amorfno kalcij-fluorofosfata (CPP-ACFP-a) na remineralizaciju cakline pripisuje se stvaranju CPP stabiliziranog amorfno 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.

U terapiji početnih karijesnih lezija kombinacija kazein fosfopeptid-amorfno kalcijevog fosfata (CPP-ACP) s fluoridima, pokazala se značajnijom u odnosu na paste koje ne sadrže CPP-ACP (23).

Svrha istraživanja

Svrha ovog 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. Kalcij i fosfati trebali bi olakšavati odlaganje fluorida u caklinu služeći poput nosača fluorida.

Materijali i postupci

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

fakulteta.

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. Fiziološka otopina mijenjana je jednom tjedno. Od svakog su zuba dijagnostičkim 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 vlažnosti. Tako pripremljeni blokovi do eksperimenta bili su pohranjeni u hladnjaku, a na sam dan eksperimenta na sobnoj temperaturi.

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 prikupljeni su u prethodno izvagane plastične posudice kroz 15 minuta (24). Svaki uzorak sline izvagan je nakon skupljanja te je izračunat protok sline. Od svakog uzorka otpipetirano je 400 μ L sline 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.

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). Zubna krema korištena u ovom istraživanju je MI Paste Plus (GC, Alsip, Illinois, SAD) (Tablica 1.) Za uporabu u tretmanu pripremljena 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.

Analiza fluora

Alkalno topljivi fluoridi stvoreni na površini cakline određeni su prema metodi Časlavske i suradnika (25). Količina alkalno topljivog fluorida izračunata je kao što su opisali Dijkman i Arends (26).

Statistička analiza

Za ispitivanje ukupne razine značajnosti za podatke korišten je Friedmanov test. Ne-parametrijski 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 1.

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 nije 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.

Količina alkalno topljivih fluorida na površini cakline u skupini A, koja je tretirana

Tablica 1. Sastav MI Paste Plus

	Proizvođač	Fluor	Sastojci
MI Paste Plus	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

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.

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 (27). Kalcij u slini najčešće je istraživan 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 (28). 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 (29 – 31). Rezultati istraživanja K. S. Rajesha i suradnika (32) 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 (37), 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 (33) 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 (34). 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 (35). I Kiss i suradnici (36) 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 (37). Smanjenu koncentraciju kalcija u slini zdravih pušača pronašli su i Kolte i suradnici (38). Manea i Nechifor (39) 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 (40) pokazalo je da koncentracija kalcija s godinama pušenja kod žena raste, dok kod muškaraca opada. U sličnom istraživanju Šutej i suradnika (13) nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji kalcija u slini pušača i slini nepušača. U rezultatima ovog istraživanja također

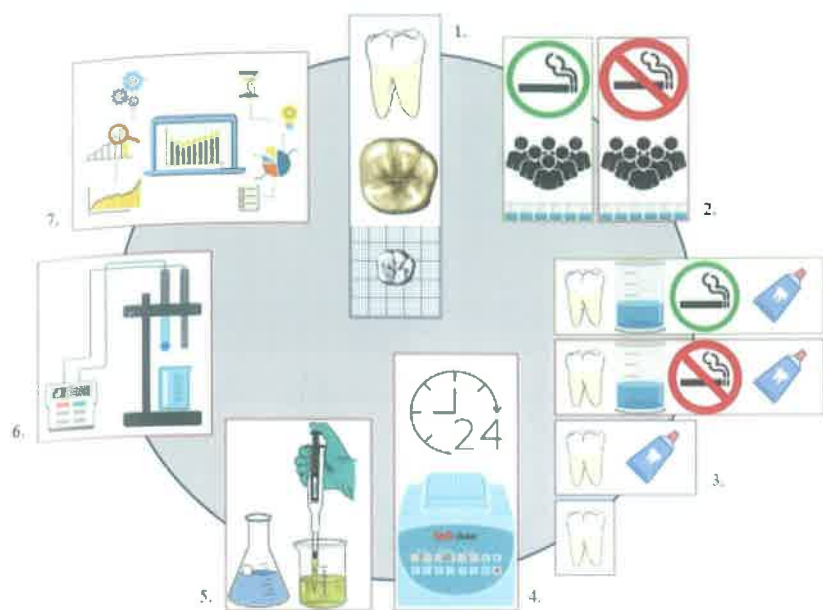
nije bilo statistički značajne razlike između koncentracije kalcija u slini pušača i nepušača, što je u skladu s rezultatima koje su dobili Kambalyal i suradnici i Kolte i suradnici (37, 38). Ispitanici ovog istraživanja bili su mlađe dobi, kao i ispitanici Šutej i suradnika (13), za razliku od ispitanika istraživanja Kiss i suradnici (36), koji su imali oko 50 godina. Svi ispitanici ovog istraživanja bili su zdravi muškarci, dok su ispitanici u istraživanju Kiss i suradnika (36) bile žene, od kojih je većina imala parodontitis. U istraživanju Manea i Nechifora (39) 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 (13). Istraživanje koje su proveli Rad M. i suradnici (41) pokazuje da dugoročno pušenje značajno smanjuje protok sline. Ispitanici u studiji Rada i suradnika (41) puše prosječno 12,5 godina, ispitanici ovog istraživanja 6,5 godina, a ispitanici istraživanja Šutej i suradnika (13) pet godina, značajna razlika

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

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/cm2	Značajnost
		Srednja vrijednost ± SD	
A	Slina pušača + smjesa MI Paste Plus	0,14 ± 0,09	-
B	Slina nepušača + smjesa MI Paste Plus	0,90 ± 1,73	-
C	Samo smjesa MI Paste Plus	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)			




Slika 1. 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.

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 razlike između remineralizacije i demineralizacije ovisi o koncentraciji kalcija i fosfatnih iona u okolišu (42). U istraživanju Poursamija i suradnika (43) 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 (44), 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 (45) 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 (44). 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 fluoroapatita koji je otporniji na djelovanje kiselina (46). 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 (44) 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.

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. U mehanizmu djelovanja CPP-ACP kompleksa važne su druge komponente sline, a ne njen mineralni sastav. 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. 

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. Rošin-Grget K, Linčir I, Current concept on the anticaries fluoride mechanism of the
 5. Linčir I i sur. *Farmakologija za stomatologe.* 3rd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
 6. 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.
 7. 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(51):45-51.
 8. 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.
 9. Šutalo, J, *Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva.* Zagreb: Naklada Zadro; 1994
 10. 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.
- Ostali izvori poznati uredništvu.