

Genotoksični učinak preparata za izbjeljivanje vitalnih zubi na oralnu sluznicu

Ivona Profeta¹, Matej Par²

Eva Klarić, dr.dent.med³, prof.dr.sc. Zrinka Tarle³

[1] studentica 3. godine

[2] student 5. godine

[3] Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Danas, kada svi žele imati lijepi, bijeli osmijeh (od kojeg zaboje oči), izbjeljivanje zubi kao estetski i terapijski zahvat postaje dio svakodnevnog prakse doktora dentalne medicine. Upravo iz tog razloga, javila se potreba, za dubljim proučavanjem ovog postupka. Izbjeljivanje zubi je postupak kojim se tretiraju te u određenom stupnju otklanjaju različite diskoloracije zubi. Kemijska sredstva koja se koriste za izbjeljivanje zubi su vodikov peroksid, karbamid peroksid i natrijev perborat različitih koncentracija.

Točan mehanizam izbjeljivanja zubi još uvijek u potpunosti nije razjašnjen (1). Aktivni spoj svih sredstava za izbjeljivanje zubi je vodikov peroksid koji ima sposobnost stvaranja slobodnih radikala kisika. Vodikov peroksid, kao i slobodni radikali kisika koji nastaju njegovim raspadom, mogu difundirati kroz tvrda zubna tkiva i pritom reagirati s kromogenim molekulama. Takve molekule, velike molekulske mase, sadrže konjugirane dvostruke veze između ugljikovih atoma i prilikom relaksacije emitiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra, što se očituje kao diskoloracija zubi. Slobodni radikali cijepaju te konjugirane dvostruke veze i tako mijenjaju apsorpcijsku energiju kromogenih molekula, koje se razlažu na manje i emitiraju zračenje nižih valnih duljina u nevidljivom dijelu spektra.

Na samu reakciju izbjeljivanja utječu i različiti uvjeti u kojima se ona odvija - temperatura, pH, svjetlosna aktivacija, te

prisutnost nekih iona. Na primjer, povećanje temperature za 10 °C dvostruko ubrzava reakciju (2).

Genotoksičnost vodikova peroksida

Sam vodikov peroksid nema sposobnost oštećenja DNA. Međutim, u stanici on dolazi u kontakt s metalnim ionima (bakar i željezo), pa kroz Fentonovu reakciju daje slobodne radikale kisika: superoksidni anion, hidroksilni radikal i perhidroksilni radikal (3). Ovi slobodni radikali imaju sposobnost oštećenja mnogih staničnih tvorbi i makromolekula, uključujući i DNA. Slobodni radikali kisika mogu kemijski promijeniti dušične baze u DNA, što će dovesti do kidanja vodikovih veza između baza ili do krivog sparivanja baza te mogu uzrokovati lomove jednog ili oba lanca DNA. Na taj način slobodni radikali kisika sudjeluju u patogenezi tumora, razvoju kroničnih degenerativnih bolesti te procesima starenja. Slobodni radikali nastaju svakodnevno u organizmu u mnogim metaboličkim procesima, kao što je oksidativna fosforilacija (4). No unatoč tome, oštećenja ne nastaju jer organizam ima snažne mehanizme zaštite protiv "fizioloških" koncentracija slobodnih radikala. Međutim, svaka veća koncentracija endogenih ili egzogenih slobodnih radikala predstavlja potencijalnu opasnost za organizam, povećava mogućnost nastanka oštećenja DNA, a time i mogućnost nastanka mutacija u stanicama.

Istraživanja genotoksičnosti in vitro i in vivo

Genotoksični učinak vodikova peroksida dokazan je in vitro, u kulturama bakterijskih (5, 6, 7) i nekih eukariotskih stanica (8, 9). No, genotoksičnost vodikova peroksida in vivo je dvojbena – brojne studije pokazuju da on nema genotoksično, karcinogeno niti promotorsko djelovanje (10, 11, 12). U nekoliko studija rađenih na animalnim modelima zabilježena je povećana incidencija duodenalne hiperplazije i njena zloćudna preobrazba (13, 14, 15), ali tek nakon dugotrajne oralne ingestije vodikovog peroksida.

Razlike u rezultatima in vivo i in vitro istraživanja objašnjavaju se različitim uvjetima kojima su eksperimentalne stanice bile izložene. Naime, stanice in vitro, za razliku od onih in vivo, dolaze u direktan kontakt s visokim koncentracijama vodikova peroksida, a uz to im manjkaju i zaštitni mehanizmi protiv slobodnih radikala. Stoga su stanice in vivo, zahvaljujući aktivnosti zaštitnih mehanizama, sposobnije oduprijeti se genotoksičnom učinku slobodnih radikala nego one u kulturi.

Klinička istraživanja genotoksičnosti

Dosadašnja klinička istraživanja većinom su usmjerena na nuspojave izbjeljivanja u vidu preosjetljivosti i iritacije gingive, dok podaci o genotoksičnosti i karcinogenosti manjkaju (sažetak u [16]). Iako se iritacija gingive često javlja,



Slika 1. Uzimanje brisa



Slika 2. Čišćenje zubi profilaktičkom pastom



Slika 3. Izolacija gingive zaštitnim Liquidam gelom

ne smatra se rizičnim faktorom za razvoj karcinoma. Do danas ne postoje klinički izvještaji koji bi povezali pojavljivanje karcinoma usne šupljine s primjenom sredstava za izbjeljivanje (16). Također, nije dokazan niti promotorski učinak vodikova peroksida na karcinogenezu u pušača i osoba koje konzumiraju veće količine alkohola (17).

U vezi s dostupnim podacima o genotoksičnosti i karcinogenosti vodikova peroksida, International Agency for Research on Cancer (IARC) 1999. donosi sljedeće zaključke (18):

- postoje ograničeni dokazi o genotoksičnosti i karcinogenosti dobiveni na eksperimentalnim životinjama
- postoje neadekvatni dokazi o genotoksičnosti dobiveni na ljudima.

Sukladno tome, IARC vodikov peroksid klasificira u skupinu 3 – not classifiable as to its carcinogenicity to humans (nemoguće ga je klasificirati prema karcinogenosti za ljude).

Istraživanje genotoksičnosti mikronukleus testom

Mikronukleus test je minimalno invazivan i relativno jednostavan postupak kojim se mogu detektirati ošteće-

nja DNA in vivo uzrokovana različitim genotoksičnim čimbenicima. U stanici koja je pretrpjela oštećenja genetskog materijala, tijekom mitoze nastaju tvorbe nazvane mikronukleusi (MN). MN predstavljaju dijelove kromosoma ili cijele kromosome koji nisu migrirali na suprotne polove stanica tijekom anafaze. Takve promjene nastaju zbog prekomjerne izloženosti stanice genotoksičnim tvarima te pogreškama koje se javljaju tijekom mitoze ili popravka DNA (19). Broj MN po stanici varira, ovisno o težini oštećenja DNA.

Uz broj MN određuju se i drugi markeri genotoksičnosti (nukleoplazmatski mostovi, jezgri pupovi, binuklearne stanice) i citotoksičnosti (karioreksa, karioliza). Određivanjem ovih dodatnih markera moguće je preciznije kvantificirati oštećenja DNA te razlikovati genotoksične od citotoksičnih učinaka istraživane tvari. U novije vrijeme (posljednjih 20-ak godina) MN test sve je više korišten i prihvaćen kao pouzdana i osjetljiva metoda za procjenu oštećenja DNA (20, 21, 22).

Svrha rada

Svrha ovog rada bila je istražiti mogući genotoksični učinak dvaju preparata za izbjeljivanje vitalnih zubi na oralnu sluzni-

cu u kliničkim uvjetima, uz odgovarajuću primjenu gingivne zaštite.

Ispitanici i postupci

Istraživanje je provedeno na 12 ispitanika koji su dobrovoljno pristali na postupak izbjeljivanja zubi. Ispitanici su osobe muškog i ženskog spola, pripadnici mlađe dobne skupine (18 – 25 godina), bez kontraindikacija za izbjeljivanje zubi. Nasumično su raspoređeni u dvije skupine po 6 ispitanika, ovisno o preparatu koji se koristio za izbjeljivanje zubi. Korištena su dva preparata na bazi vodikovog peroksida. U prvoj skupini primijenjen je 25% vodikov peroksid potpomognut svjetlosnom aktivacijom, preparat tvorničkog imena Zoom2 (Discus Dental, SAD), a u drugoj skupini primijenjen je 38% vodikov peroksid bez svjetlosne aktivacije, preparat tvorničkog imena Opalescence Boost (Ultradent, SAD). Svakom ispitaniku su u dva odvojena brisa uzeti uzorci stanica s područja gingive (prvi bris) i sluznice unutarnje strane gornje usnice (drugi bris). Brisovi su učinjeni 3 puta: neposredno prije, neposredno nakon, te 72 sata nakon postupka izbjeljivanja zubi.

Prije uzimanja brisa, ispitanici su isprali usta vodom. Zatim je sterilnom gazom uklonjen površinski, odumrli sloj stanica



Slika 4. Izolacija gingive zaštitnim Opaldam gelom



Slika 5. Nanošenje Zoom2 gela za izbjeljivanje na labijalne plohe zubi



Slika 6. Osvjetljavanje zubi izvorom svjetlosti



Slika 7. Nanošenje Opalescence Boost gela za izbjeljivanje

s gingive u području prednjih zubi te je sterilnom citološkom četkicom uzet bris (slika 1). Uzorak stanica je pohranjen u sterilnu Eppendorf tubu te čuvan na temperaturi od +4°C do transporta na Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Na isti način uzet je bris sluznice s unutarnje strane usnice. Zubi su očišćeni profilaktičkom pastom Proxyt (RDA 7) (Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein) (slika 2), nakon čega su usta temeljito isprana vodom. Zubi su posušeni pusterom i postavljen je retraktor.

Gingiva je u prvoj skupini izolirana zaštitnim Liquidam gelom (Discus Dental, SAD) (slika 3), a u drugoj zaštitnim Opaldam gelom (Ultradent, SAD) (slika 4). Zaštitni gelovi osvijetljeni su pomoću polimerizacijskog uređaja (Bluephase, Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein). U prvoj skupini na labijalne plohe zubi 14-24 i 34-44 nanesen je sloj gela debljine 1-2 mm, pomoću kista iz originalnog pakiranja (slika 5) te su zubi osvijetljeni izvorom svjetlosti tijekom 15 minuta (slika 6). U drugoj skupini, prema uputi proizvođača, pomiješan je osnovni gel (38% vodikov peroksid) s aktivatorom. Tako zamiješani gel nanesen je originalnim nastavkom za aplikaciju na labijalne plohe zubi 14 - 24 i 34 - 44 u sloju debljine 0.5 - 1 mm (sli-

ka 7). Nakon završenih 15 minuta, gel je u obje skupine uklonjen Heidemannovim instrumentom 5/6 i svitcima staničevine. Postupak nanošenja gela, u obje skupine, ponovljen je tri puta, u trajanju od 15 minuta svaki, koliko traje jedan tretman preparatom Zoom2 (Discus Dental, SAD) odnosno preparatom Opalescence Boost (Ultradent, SAD).

Po završetku izbjeljivanja, uklonjen je zaštitni gel i retraktor, a usta su isprana vodom. Ponovno su uzeti brisovi s gingive i usnice. Ispitanici su naručeni za tri dana, kada su im još jednom uzeti brisovi s istih mjesta.

Po dostavi na Institut, uzorci su pripremljeni za analizu mikronukleus testom po standardnom laboratorijskom protokolu. Praćene su promjene broja MN i morfološke promjene jezgre među pojedinim uzorcima. Za svako uzorkovanje analizirano je 2000 stanica.

Na temelju dobivenih vrijednosti pojedinih markera genotoksičnosti izračunate su srednje vrijednosti prije izbjeljivanja, neposredno nakon izbjeljivanja i 72 sata nakon izbjeljivanja. Budući da podaci nisu bili normalno distribuirani, korišten je neparametrijski hi-kvadrat test uz razinu značajnosti od 0,05.

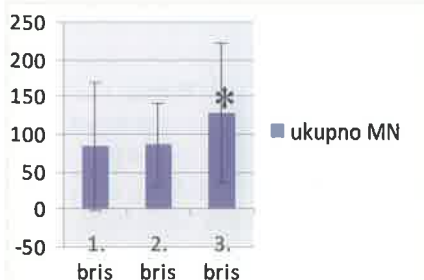
Rezultati i rasprava

Nakon postupka izbjeljivanja uzeta su dva uzorka stanica: prvi neposredno nakon i drugi 72 sata nakon izbjeljivanja. To vrijeme potrebno je stanicama da prođu kroz diobu, odnosno da se genotoksični učinak primijenjenih preparata očituje kao povećanje broja MN. Naime, za nastanak MN, kao morfološke manifestacije oštećenja genoma, stanica mora proći barem jedan stanični ciklus. Uzorak uzet neposredno nakon izbjeljivanja služio je

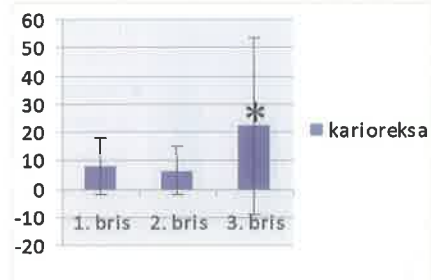
kao kontrola budući da je uzet sat vremena nakon početka primjene preparata za izbjeljivanje, a to vrijeme nije dostatno da se oštećenja DNA manifestiraju u obliku MN. Prema tome, bilo je za očekivati da će do eventualnog porasta broja MN doći tek u uzorku uzetom 72 sata nakon izbjeljivanja.

U uzorcima stanica uzetih s gingive ispitanika koji su prošli postupak izbjeljivanja preparatom Zoom2, zabilježen je statistički značajan ($p < 0.01$) porast broja MN 72 sata nakon izbjeljivanja, u odnosu na uzorke uzete neposredno prije i neposredno nakon postupka izbjeljivanja (slika 8). Porast broja MN nije zapažen u uzorku uzetom s usnice. Razdioba broja MN po stanicama nije pokazala statistički značajnu razliku između pojedinih uzoraka ni u stanicama s gingive ni u stanicama s usnice. Ovo upućuje na činjenicu da oštećenja detektirana porastom ukupnog broja MN nisu zahvaćala veći postotak genoma. Naime, veći broj MN u pojedinoj stanici upućuje na opsežnija oštećenja genoma.

U uzorku s gingive uzetom 72 sata nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2 zapažen je i statistički značajan porast broja stanica s morfološkim promjenama jezgre: karioreksom ($p < 0.05$) i kariolizom ($p < 0.01$) u odnosu na uzorke uzete neposredno prije i neposredno nakon postupka izbjeljivanja (slika 9, 10). Karioreksa se smatra markerom apoptoze, a karioliza je morfološka manifestacija nekroze (23). Treba napomenuti da nekroza može biti djelomično potaknuta i mehaničkim oštećenjima prilikom uzimanja brisa. Povećani broj karioreksa upućuje na indukciju apoptoze (24). Stanična smrt apoptozom uzrokovana je različitim čimbenicima u stanici i izvan stanice, a između ostalog, može biti posljedica izravnog oštećenja genetskog



Slika 8. Ukupni broj MN u uzorcima s gingive kod primjene preparata Zoom2.



Slika 9. Broj stanica s karioreksom u uzorcima s gingive kod primjene preparata Zoom2.



Slika 10. Broj stanica s kariolizom u uzorcima s gingive kod primjene preparata Zoom2.

materijala i oksidacijskog stresa koji pak posredno dovodi do oštećenja genetskog materijala. Povećan broj apoptotičkih stanica, zajedno s povećanim brojem MN, upućuje na zaključak da je nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2 u stanicama uzorka s gingive došlo do oštećenja genoma. U uzorcima s usnice, uzetim 72 sata nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2, nije zabilježen statistički značajan porast niti jednog od navedenih markera.

Ni u jednom od uzoraka nije zabilježen porast broja binuklearnih stanica. Broj binuklearnih stanica je indikator toksičnog djelovanja na proteinske strukture u stanicama, ponajprije citoskelet, u slučaju kojeg se zbog nemogućnosti odvijanja citokineze pojavljuju stanice s dvije jezgre (25). Dakle, postupak izbjeljivanja nije imao učinka na proteinske strukture u stanicama. Povećan broj binuklearnih stanica značio bi da su, uz ostale proteinske tvorbe, oštećeni mikrotubuli diobenog vretena. Uslijed toga bi došlo do zaostajanja čitavih kromosoma u anafazi koji bi formirali MN. Budući da to nije slučaj, može se zaključiti da uočeni MN potječu od fragmenta DNA što znači da preparati za izbjeljivanje izravno oštećuju molekulu DNA uzrokujući lomove što rezultira formiranjem MN (25).

Nukleoplazmatski mostovi najčešće nastaju fuzijom kromosoma u predjelu telomera zbog čega se oni ne mogu pravilno rasporediti u anafazi (26). Njihova pojava predstavlja značajnije narušavanje integriteta genoma, a kako u ni jednom od uzoraka uzetih nakon izbjeljivanja nije došlo do povećane pojavnosti nukleoplazmatskih mostova, može se zaključiti da integritet genoma nije ozbiljnije narušen.

U uzorku s usnice i u uzorku s gingive zabilježen je porast broja stanica s jezgre-

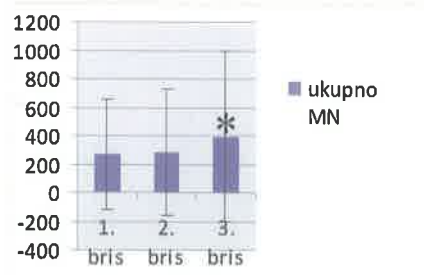
nim pupovima 72 sata nakon izbjeljivanja preparatom Zoom2, ali on nije bio statistički značajan. Jezgri pupovi su morfološka manifestacija izdvajanja amplificiranog ili teško oštećenog dijela genoma iz jezgre. Pup sadrži izdvojeni dio genetskog materijala, a odvajanjem od jezgre oblikuje MN koji putuje prema staničnoj membrani te se ponovnim pupanjem izbacuje iz stanice. Pojavljivanje jezgrenih pupova upućuje na činjenicu da dio zapaženih MN ne potječe od fragmenta molekule DNA iz anafaze, već nastaje izdvajanjem težih oštećenja nastalih tokom interfaze staničnog ciklusa.

Nakon primjene preparata Zoom2 nisu zapažene statistički značajno povišene vrijednosti nijednog markera u stanicama s usnice. Stoga se može zaključiti da je tijekom postupka izbjeljivanja sluznica usnice bila dobro zaštićena od genotoksičnog učinka preparata za izbjeljivanje. Zapaženi genotoksični učinak na gingivu može biti posljedica izravnog djelovanja preparata uslijed neadekvatno postavljene zaštite, ili može nastati djelovanjem vodikova peroksida i produkata njegove razgradnje koji se otpuštaju iz tvrdih zubnih tkiva po završenom postupku izbjeljivanja (27), što je vjerojatnije jer kod nijednog ispitanika nije zapaženo propuštanje gingivne zaštite tijekom postupka izbjeljivanja.

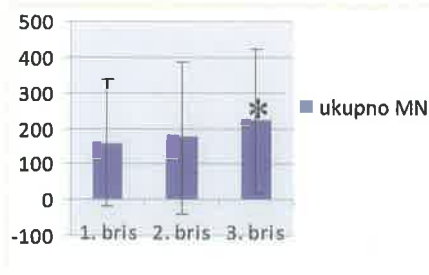
Kod ispitanika koji su prošli postupak izbjeljivanja preparatom Boost, statistički je bio značajan ($p < 0.01$) porast ukupnog broja MN u uzorcima s gingive i usnice uzetim 72 sata nakon izbjeljivanja, a u odnosu na uzorke uzete neposredno prije i neposredno nakon postupka izbjeljivanja (slika 11, 12). Također je zapažena i razlika u razdiobi MN, pri čemu je broj stanica s više od 3 MN statistički značajno ($p < 0.05$) povećan u uzorku s gingive uzetom 72 sata

nakon postupka izbjeljivanja u usporedbi s uzorcima uzetim neposredno prije i neposredno nakon izbjeljivanja (slika 13). Iz toga se može zaključiti da je postupak izbjeljivanja preparatom Boost pokazao nešto veću genotoksičnost te da je veći postotak genoma zahvaćen oštećenjima u odnosu na preparat Zoom2. Ostali markeri genotoksičnosti nisu bili statistički značajno promijenjeni. Kako nisu zabilježene promjene u broju nukleoplazmatskih mostova niti jezgrenih pupova, može se zaključiti da je ukupni broj MN porastao isključivo uslijed genotoksičnog učinka koji uzrokuje lomove DNA, a ne izdvajanjem težeg oštećenja genetskog materijala tijekom interfaze. U uzorku stanica s gingive došlo je do neznatnog porasta broja binuklearnih stanica što bi moglo upućivati na visoku razinu oksidacijskog stresa koji dovodi do oštećenja citoskeleta, ali ne u dovoljnoj mjeri da bi to dovelo do smetnji u odvijanju staničnog ciklusa. Također, kao i kod primjene preparata Zoom2, kod primjene preparata Boost genotoksični učinak bio je jače izražen u stanicama s gingive.

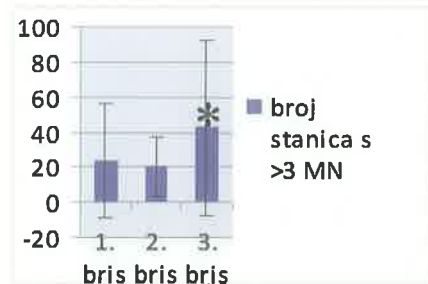
Zapažena je velika varijabilnost vrijednosti praćenih markera genotoksičnosti među pojedinim ispitanicima. Velike razlike pojavile su se u sva tri uzorkovanja (neposredno prije, neposredno nakon i 72 sata nakon postupka izbjeljivanja), a zajedno s malim brojem ispitanika ($n=6$ u svakoj skupini) razlog su izrazito velikoj standardnoj devijaciji. Ovakva varijabilnost vjerojatno je posljedica izlaganja ispitanika različitim genotoksičnim faktorima u svakodnevnom životu, što se zbog izrazite osjetljivosti MN testa očituje kao porast navedenih markera. U svojoj metaanalizi, Ceppi et al. su analizirali 63 studije koje koriste MN test za određivanje geno-



Slika 11. Ukupni broj MN u uzorcima s usnice kod primjene preparata Boost.



Slika 12. Ukupni broj MN u uzorcima s gingive kod primjene preparata Boost.



Slika 13. Broj stanica s 3 i više MN u uzorcima s gingive kod primjene preparata Boost.

toksičnog učinka različitih kemijskih spojeva u profesionalnoj ili slučajnoj izloženosti (28). U kontrolnim skupinama zabilježena su izrazito velika odstupanja među ispitanicima, a i srednje vrijednosti MN se jako razlikuju između pojedinih studija. Stoga vjerujemo da je velika varijabilnost zapažena u ovom istraživanju neizbježna, budući da već u bazalnim uvjetima postoje velike razlike u broju MN među ispitanicima. Kako u kliničkim uvjetima nije moguće smanjiti varijabilnost praćenih markera među ispitanicima, smatramo da bi za precizniju procjenu bilo poželjno povećati broj ispitanika.

Kako u dostupnoj literaturi nisu pronađena istraživanja koja za procjenu genotoksičnosti preparata za izbjeljivanje u kliničkim uvjetima koriste MN test, dobivene rezultate nije moguće usporediti s onima drugih autora. Ovo istraživanje pokazalo je da preparati za izbjeljivanje uzrokuju oštećenja genetskog materijala stanica oralne sluznice, ali nije moguće procijeniti kakve implikacije zapažena oštećenja imaju na eventualnu malignu transformaciju stanica. Naime, zapaženi porasti markera genotoksičnosti su, iako statistički značajni, bili relativno mali s obzirom na veliku individualnu varijabilnost koja postoji već u bazalnim uvjetima (28). Budući da se radi o stanicama s kratkim životnim vijekom, jednokratna izloženost ovako blago genotoksičnoj noksi vjerojatno ima neznan karcinogeni potencijal.

Zaključci

Oba preparata za izbjeljivanje pokazala su genotoksični učinak na stanice oralne sluznice. Kod primjene preparata Boost genotoksični učinak bio je nešto izraženiji: zapažen je na sluznici usnice i gingivi, a kod preparata Zoom2 zapažen je samo na gingivi.

Kod izbjeljivanja preparatom Zoom2 došlo je do pokretanja stanične smrti apoptozom i nekrozom, a preparat Boost uzrokovao je opsežnija oštećenja genoma.

Ovakvi nalazi navode na zaključak da provedeni postupci izbjeljivanja zubi imaju određeni genotoksični učinak na stanice oralne sluznice, ali je teško procijeniti koliko je on klinički značajan. Zbog nedostatka sličnih istraživanja nije moguće raspravljati o eventualnom karcinogenom

potencijalu preparata za izbjeljivanje, iako je on vjerojatno zanemariv u usporedbi sa svakodnevnom izloženosti drugim genotoksičnim čimbenicima. Stoga su potrebna daljnja istraživanja s ciljem kvantifikacije zapaženih genotoksičnih učinaka i njihovih dugoročnih posljedica na stanice oralne sluznice.

* Sve vrijednosti prikazane na slikama izražene su kao srednja vrijednost pojedinog markera genotoksičnosti u uzorku od 2000 stanica +/- standardna devijacija. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (*).

Zahvala

Zahvaljujemo se dr.sc. Davoru Želježiću i dr.sc. Nevenki Kopjar s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu na pomoći pri izvođenju mikronukleus testa, interpretaciji rezultata i statističkoj obradi podataka. Rad je izrađen u okviru projekta MZOŠ „Nanostruktura restaurativnih materijala i interakcije s tvrdim zubnim tkivima“ br. 065-0352851-0410. ☒

LITERATURA

1. **Kwon SR, Ko SH, Greenwall LH.** Tooth whitening in esthetic dentistry: principles and technique. London: Quintessence Pub; 2009.
2. **Joiner A.** The bleaching of teeth: A review of the literature. *J Dent* 2006;34:412-9.
3. **Waris G, Haseeb A.** Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinogen* 2006;5:14-21.
4. **Gamulin S, Marušić M, Kovač Z et al.** Patofiziologija. 6th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2005.
5. **Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA, Ames BN.** A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7445-9.
6. **DeFlora S, Camoirano, A, Zanacchi P, Bennicelli C.** Mutagenicity testing with TA97 and TA102 of 30 DNA-damaging compounds, negative with other Salmonella strains. *Mutat Res.* 1984;134:159-65.
7. **Glatt H.** Mutagenicity spectra in Salmonella typhimurium strains of glutathione, L-cysteine

and active oxygen species. *Mutagenesis* 1989;4:221-7.

8. **Ziegler-Skylakakis K, Andrae U.** Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1987;192:65-7.
9. **Kruszewski M, Green MHL, Lowe JE, Szumiel I.** DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4°C and 37°C in L5178Y sublines. *Mutat Res* 1994;308:233-41.
10. **Li Y, Noblitt T, Zhang A, Origel A, Kafrawy A, Stookey G.** Effect of long-term exposure to a tooth whitener. *J Dent Res* 1993;72:248.
11. **Regnier JF, Clare C, de Gerlache J, Malinverno G, Mayr W, Weiner ML, Trochimowicz H.** Ex vivo and in vitro unscheduled DNA synthesis (UDS) assays in rat liver with hydrogen peroxide (H₂O₂). *Mutat Res* 1997;379:168-9.
12. **Regnier JF, Molinier B, Bentley KS, de Gerlache J, Malinverno G, Mayr W, Weiner ML, Trochimowicz H, Brock W.** Micronucleus tests in mice with hydrogen peroxide. *Fund Appl Toxicol Suppl* 1996;30:233.
13. **Ito A, Naito M, Watanabe H.** Implication of chemical carcinogenesis in the experimental animal - tumorigenic effect of hydrogen peroxide in mice. *Nenpo* 1981;22:147-58.
14. **Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y.** Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide. *GANN* 1981;72:174-5.
15. **Ito A, Naito M, Naito Y, Watanabe H.** Induction and characterization of gastro-duodenal lesions in mice given continuous oral administration of hydrogen peroxide. *GANN* 1982;73:315-22.
16. **Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R.** Tooth whitening products and the risk of oral cancer. *Food Chem Tox* 2006;44:301-15.
17. **Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP).** Hydrogen peroxide and hydrogen peroxide releasing substances in oral health products. 1999; SCCNFP/0058/98.
18. **International Agency on Research on Cancer (IARC).** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. 1999;71.
19. **Holland N, Bolognesi C, Kircsh-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, Fenech M.** The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps.