



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Tadeja Blagec

**UTJECAJ FOTODINAMSKE TERAPIJE
NA AKUMULACIJU I BAKTERIOLOŠKI
SASTAV DENTALNOG PLAKA U
ORTODONTSKIH PACIJENATA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Tadeja Blagec

**UTJECAJ FOTODINAMSKE TERAPIJE
NA AKUMULACIJU I BAKTERIOLOŠKI
SASTAV DENTALNOG PLAKA U
ORTODONTSKIH PACIJENATA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Senka Meštrović

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Tadeja Blagec

**THE EFFECT OF PHOTODYNAMIC
THERAPY ON ACCUMULATION AND
BACTERIAL COMPOSITION OF DENTAL
PLAQUE IN ORTHODONTIC PATIENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Professor Senka Meštrović, PhD

Zagreb, 2026.

Rad je ostvaren na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za ortodonciju.

Lektor hrvatskog jezika: Vanja Nekich, prof. hrvatskog jezika i književnosti

Lektor engleskog jezika: Michael Nekich, stalni sudski tumač za engleski jezik

Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Datum obrane rada: _____

Rad sadrži: 87 stranica

9 tablica

21 sliku

1 CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu izvorni su doprinos autora poslijediplomskoga doktorskog studija. 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 njihova podrijetla.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Senki Meštrović na mogućnosti izrade ovog doktorskog rada. Zahvalna sam na dobivenoj inspiraciji, motivaciji i podršci.

Hvala joj i na vodstvu i mentorstvu proteklih godina koje sam provela na Zavodu.

Hvala kolegi Luki Šimunoviću na statističkoj obradi podataka i odgovoru na svako moje pitanje.

Hvala prof. dr. sc. Ani Budimir na mogućnosti izrade mikrobioloških testova i svim udijeljenim savjetima.

Hvala obitelji, prijateljima i Tinu na nesebičnoj podršci i ljubavi tijekom nastanka ovog rada.

Sažetak

UTJECAJ FOTODINAMSKE TERAPIJE NA AKUMULACIJU I BAKTERIOLOŠKI SASTAV DENTALNOG PLAKA U ORTODONTSKIH PACIJENATA

Svrha istraživanja bila je ispitati utjecaj fotodinamske terapije (PDT) na akumulaciju i sastav plaka, stanje gingive i razvoj inicijalnih karijesnih lezija u ortodontskih pacijenata. Slučajnim odabirom 48 ispitanika raspodijeljeno je u četiri skupine, uključujući negativnu kontrolu. Prvoj skupini ispitanika je na caklinu nanoseno toluidinsko modrilo osvijetljeno laserom valne duljine 660 nm. Ispitanicima u drugoj skupini nanosen je 1% klorheksidin lak (CHX), dok je onima u trećoj nanosen trikalcij fosfatni (TCP) lak s 5% natrijevim fluoridom. Intervencije su izvedene odmah nakon lijepljenja bravica (T0), 6 (T1) i 12 tjedana kasnije (T2). Indeks plaka, masena spektrometrija i broj bakterijskih kolonija (eng. *colony forming unit*, CFU) u supragingivnom plaku te gingivalni indeks određeni su u T0, T1, T2 i T3 (18 tjedana praćenja). Uzimanje uzoraka subgingivnog plaka za reakciju lančane polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) i snimanje intraoralnih fotografija za evaluaciju inicijalnih karijesnih lezija napravljeni su u T0 i T3.

U T2 i T3, u PDT i CHX skupinama primijećene su značajno niže vrijednosti indeksa plaka u usporedbi s kontrolnom skupinom. CFU/ μ L u PDT, CHX i TCP-5% NaF skupinama bio je značajno niži nego u kontrolnoj skupini 6, 12 i 18 tjedana nakon postave fiksne naprave. PDT nije pokazao značajan antibakterijski učinak na subgingivne bakterije u usporedbi s kontrolnom skupinom. U T2 i T3, gingivalni indeks u kontrolnoj skupini bio je značajno viši nego u drugim skupinama. Nove inicijalne karijesne lezije nisu zabilježene u PDT i CHX skupinama. Zaključno, učinci fotodinamske terapije na oralno zdravlje bili su usporedivi s onima koje su proizveli CHX i TCP-5% NaF lakovi, i uglavnom su se značajno razlikovali od onih uočenih u kontrolnoj skupini.

Ključne riječi: fotodinamska terapija; klorheksidin; fluoridi; indeks plaka; gingivalni indeks; inicijalne karijesne lezije; fiksna ortodonska terapija

Summary

THE EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON ACCUMULATION AND BACTERIAL COMPOSITION OF DENTAL PLAQUE IN ORTHODONTIC PATIENTS

Aim: The insertion of a fixed orthodontic appliance has been shown to increase plaque accumulation and alter the oral microbiome. As a result, orthodontic patients frequently develop gingivitis and white spot lesions. They are usually advised to use additional oral hygiene products, such as fluoride and chlorhexidine products. Photodynamic therapy (PDT), a novel antibacterial technique, has recently been introduced. This therapy is a non-invasive form of photochemotherapy that relies on the reaction between a photoreactor (photosensitive agent) and a light source in the presence of oxygen. Many studies have evaluated the effectiveness of photodynamic therapy in reducing plaque accumulation and improving gingival health. Studies in the literature have reported that photodynamic therapy significantly reduces plaque accumulation and gingival inflammation; however, others have found no positive effect on oral health. These results indicate contradictory and inconsistent outcomes. Only two recent studies have investigated the effect of photodynamic therapy on the bacterial composition of supragingival biofilms. Although the authors concluded that photodynamic therapy reduces the total bacterial count in supragingival plaque, there is insufficient literature on this problem. Regarding the bacterial composition of subgingival plaque, the results show that photodynamic therapy effectively reduces the number of periodontal pathogens. Only one study has concluded that photodynamic therapy is effective in remineralizing and preventing white spot lesions, whereas another recent study reported that photodynamic therapy had no effect on the occurrence of white spot lesions. Hence, it remains unclear whether photodynamic therapy affects the onset and development of initial carious lesions.

The primary aim of this study was to assess the impact of photodynamic therapy on the accumulation and bacterial composition of supragingival plaque in patients undergoing fixed orthodontic treatment. The secondary aims were to assess the bacterial composition of subgingival plaque, the condition of the gingiva, and the development of white spot lesions on the buccal surfaces of the upper teeth.

Participants and methods: In all, 48 patients, aged 12–17 years, undergoing fixed orthodontic treatment, were randomly divided into four groups. The participants in the first test group

underwent photodynamic therapy. Toluidine blue was applied around the orthodontic brackets of the upper teeth. After 60 seconds, a saline solution was used to remove the photosensitive dye. Next, a 660 nm laser diode was used to irradiate the examined teeth for 60 seconds. A 1% chlorhexidine varnish was applied to the upper teeth of the subjects in the second test group. Participants in the third group received a tricalcium phosphate varnish containing 5% sodium fluoride. These interventions were performed at T0 (immediately after bonding), T1 (6 weeks) and T2 (12 weeks). The remaining participants did not receive any interventions as they were assigned to the negative control group. The Silness–Löe Plaque Index was used to evaluate plaque accumulation. The bacterial composition of the supragingival plaque was assessed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. After growing bacterial colonies on agar plates, their number was counted, and colony-forming unit/ μL (CFU/ μL) was calculated. The Löe–Silness Gingival Index (GI) was used to assess the condition of the gingiva. The plaque index, bacterial composition of the supragingival plaque, and gingival index were evaluated at T0 (before bonding), T1 (6 weeks), T2 (12 weeks), and T3 (18 weeks of follow-up). The bacterial composition of subgingival plaque was evaluated using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with specific primers and probe sets targeting *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia* and *F. nucleatum*. Samples of subgingival plaque for qPCR analysis were taken at T0 (before bonding) and T3 (18 weeks later). Frontal, left, and right lateral intraoral photographs were taken to evaluate the occurrence of white spot lesions. Photographs captured at T0 and T3 were presented on a monitor and compared. All new and unchanged white spot lesions that increased, decreased, or were completely remineralized during the study period were recorded.

Results: In all, 40 participants were included in the analysis. At T2, the plaque index in the chlorhexidine group was the lowest and highest in the control group ($p < 0.001$). Significantly lower plaque scores were recorded in the photodynamic therapy group compared to the control group ($p = 0.002$). At T3, the plaque index in the photodynamic and chlorhexidine groups was significantly lower than that in the control group ($p = 0.005$ and $p < 0.001$, respectively). Six weeks after the start of the study, the CFU/ μL values in the control group were significantly higher than in the other tested groups ($p < 0.001$). At T2 and T3, in the photodynamic, tricalcium phosphate varnish, and chlorhexidine groups, the mean value of CFU/ μL was significantly lower than that of the control group ($p < 0.001$). The total bacteria count significantly decreased in the photodynamic, chlorhexidine, and tricalcium phosphate varnish groups during the study

period ($p=0.023$ and $p<0.001$, respectively). The application of photodynamic therapy resulted in the eradication of *T. forsythia* in 30% of subjects over the study period. The effect of photodynamic therapy on bacteria in subgingival plaque did not differ significantly from the effect observed in the chlorhexidine, tricalcium phosphate varnish, and control groups. Between the 6th and 12th weeks of follow-up, a significant increase in the gingival index was noted in the control group ($p=0.026$). A reduction was observed in the other groups. This reduction was significant in the photodynamic therapy group ($p=0.016$). At T2, the mean value of the gingival index in the control group was significantly higher than that in the photodynamic therapy, chlorhexidine, and tricalcium phosphate varnish groups ($p<0.001$, $p=0.024$, and $p=0.001$, respectively). Similar findings were observed at 18 weeks after bonding and the start of the study ($p=0.006$, $p=0.034$, and $p=0.005$, respectively). In the photodynamic, chlorhexidine, and tricalcium phosphate varnish groups, an insignificant reduction of the gingival index was observed between T0 and T3. In the control group, nine new white spot lesions appeared over the study period, and none were completely remineralized ($p=0.008$). In the photodynamic therapy group, the total number of lesions remained the same between T0 and T3.

Conclusion: Three consecutive applications of photodynamic therapy, performed at six-week intervals during regular orthodontic appointments, significantly reduce plaque accumulation, gingival inflammation, total bacteria count in supragingival plaque, and the occurrence of white spot lesions compared to the control group. A combination of toluidine blue and a 660 nm laser has been shown to be effective as 1% chlorhexidine varnish and tricalcium phosphate varnish containing 5% sodium fluoride. However, none of the three investigated antibacterial agents was significantly more effective at reducing the number of periodontal pathogens in subgingival plaque compared to the control group.

Keywords: photodynamic therapy; chlorhexidine; fluorides; plaque index; gingival index; white spot lesions; fixed orthodontic treatment

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Prevencija i liječenje promjena na tvrdom i mekom tkivu tijekom fiksne ortodonske terapije	3
1.1.1. Klorheksidinski lakovi.....	4
1.1.2. Fluoridni lakovi	5
1.1.3. Fotodinamska terapija.....	6
1.1.3.1. Utjecaj fotodinamske terapije na akumulaciju plaka	7
1.1.3.2. Antimikrobni učinak fotodinamske terapije	8
1.1.3.3. Utjecaj fotodinamske terapije na stanje gingive	10
1.1.3.4. Utjecaj fotodinamske terapije na razvoj demineralizacijskih lezija	10
2. HIPOTEZA I CILJEVI.....	11
2.1. Hipoteza	12
2.2. Ciljevi.....	12
3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	13
3.1. Ispitanici	14
3.2. Postupci	15
3.2.1. Intervencije	16
3.2.2. Primarne mjere ishoda	17
3.2.2.1. Akumulacija dentobakterijskog plaka.....	17
3.2.2.2. Bakteriološki sastav supragingivnog plaka.....	18
3.2.3. Sekundarne mjere ishoda.....	19
3.2.3.1. Bakteriološki sastav subgingivnog plaka.....	19
3.2.3.2. Stanje gingive.....	20
3.2.3.3. Dijagnostika inicijalnih karijesnih lezija na intraoralnim fotografijama	21
3.3. Izračun veličine uzorka	21
3.4. Randomizacija	22
3.5. Zasljepljivanje	22
3.6. Statistička analiza	22
4. REZULTATI.....	24

4.1. Demografski podaci ispitanika	25
4.2. Utjecaj ispitivanih metoda na akumulaciju dentobakterijskog plaka	25
4.3. Utjecaj ispitivanih metoda na bakteriološki sastav supragingivnog plaka	30
4.4. Utjecaj ispitivanih metoda na bakteriološki sastav subgingivnog plaka	37
4.5. Utjecaj ispitivanih metoda na stanje gingive.....	38
4.6. Utjecaj ispitivanih metoda na razvoj inicijalnih karijesnih lezija	43
5. RASPRAVA.....	46
5.1. Akumulacija dentobakterijskog plaka u fiksnoj ortodontskoj terapiji.....	47
5.2. Bakteriološki sastav supragingivnog plaka u fiksnoj ortodontskoj terapiji	50
5.3. Bakteriološki sastav subgingivnog plaka u fiksnoj ortodontskoj terapiji	54
5.4. Stanje gingive u fiksnoj ortodontskoj terapiji	57
5.5. Inicijalne karijesne lezije u fiksnoj ortodontskoj terapiji.....	61
6. ZAKLJUČAK	65
7. LITERATURA.....	67
8. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	83

Popis skraćenica

PDT	fotodinamska terapija (eng. <i>photodynamic therapy</i>)
CHX	klorheksidin (eng. <i>chlorhexidine</i>)
TCP	trikalcijev fosfat (eng. <i>tricalcium phosphate</i>)
CFU	jedinice koje tvore kolonije (eng. <i>colony forming unit</i>)
NaF	natrijev fluorid
PCR	reakcija lančane polimeraze (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
MALDI TOF	masena spektrometrija (eng. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>)
pH	snaga vodika (lat. <i>potentia hydrogenii</i>); mjera kiselosti
sur.	suradnici
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
RNK	ribonukleinska kiselina
LED	svjetleća dioda (eng. <i>light emitting diode</i>)
FMBS	iznos krvarenja na razini cijelih usta (eng. <i>full mouth bleeding score</i>)
ICDAS	eng. <i>international caries detection and assessment system</i>
TSALD	diskrepancija veličine zuba i zubnog luka (eng. <i>tooth size-arch length discrepancy</i>)
HCCA	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (eng. <i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)

Održavanje oralne higijene tijekom fiksne ortodonske terapije predstavlja izazov za većinu pacijenata. Elementi fiksne ortodonske naprave djeluju kao retencijska mjesta za dentalni plak, čime se znatno povećava njegova akumulacija na zubnim površinama. Poznato je da se dentalni plak u većoj mjeri akumulira na ortodontskim adhezivnim materijalima u odnosu na caklinu, pri čemu se najveća količina plaka nakuplja u području gingivalno od brave (1, 2). Tijekom terapije smanjuje se lučenje sline, čime se umanjuje njezina protektivna uloga u prevenciji karijesa (3). Nadalje, zabilježeno je i sniženje pH vrijednosti sline, uz istovremeni porast broja kariogenih mikroorganizama (4). Sastav supragingivnog dentalnog plaka značajno se razlikuje između ortodontskih pacijenata i onih koji nisu podvrgnuti terapiji - uočena je povećana koncentracija ugljikohidrata i smanjenje pH vrijednosti plaka, što pogoduje procesu demineralizacije cakline (5-7). Osim povećanog rizika za razvoj karijesa, otežano mehaničko uklanjanje plaka doprinosi razvoju upalnih promjena u gingivi. Istraživanja pokazuju da gotovo svi pacijenti u fiksnoj ortodontskoj terapiji, neovisno o kvaliteti oralne higijene ili primjeni antimikrobnih sredstava, razvijaju prolazni gingivitis (8). Marincak i sur. (9) izvještavaju o značajnom porastu indeksa plaka i gingivalnog indeksa tijekom trajanja terapije. Ranije studije pokazale su da su najviše vrijednosti indeksa plaka i indeksa krvarenja na sondiranje zabilježene unutar prva tri mjeseca terapije, nakon čega dolazi do njihovog postupnog smanjenja (10, 11). Jedna recentna pregledna studija utvrdila je umjerenu do visoku razinu dokaza o povezanosti fiksne ortodonske terapije s promjenama u sastavu oralne mikrobiote (6). Tijekom terapije dolazi do značajnog porasta kariogene bakterije *Actinomyces spp.*, dok brojnost parodontopatogenih bakterija uglavnom ostaje nepromijenjena (9). Također je zabilježen porast bakterija *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, kao i različitih Gram-negativnih patogenih mikroorganizama (5, 6, 12-14). Ghijselings i sur. (15) ukazuju na statistički značajno povećanje broja bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. U subgingivnom plaku također dolazi do promjena; primjerice, *Tannerella forsythia* pokazuje veću prevalenciju u ortodontskih pacijenata u usporedbi s kontrolnom skupinom (16). U slučaju neadekvatne oralne higijene, produkti bakterijskog metabolizma mogu dovesti do nastanka inicijalnih karijesnih lezija u obliku tzv. bijelih mrlja, koje se mogu pojaviti već četiri tjedna nakon početka terapije (17, 18). Bijele mrlje predstavljaju najraniji makroskopski znak dentalnog karijesa te su najčešća komplikacija fiksne ortodonske terapije, potencijalno dovodeći i do njezina prekida (5, 19, 20). Prevalencija bijelih mrlja nakon završetka terapije procjenjuje se na 20 – 50% (21, 22). Iako manje lezije mogu spontano remineralizirati tijekom prve godine nakon uklanjanja fiksne naprave, veće i dublje lezije mogu ostati jasno vidljive i

dugoročno, čime se narušava estetika osmijeha. Stoga se preporučuje primjena ciljanih lokalnih preventivnih mjera tijekom terapije kako bi se smanjio rizik za razvoj ovih promjena (23, 24).

1.1. Prevencija i liječenje promjena na tvrdom i mekom tkivu tijekom fiksne ortodonske terapije

Prije početka fiksne ortodonske terapije potrebno je pacijente educirati kako pravilno održavati oralnu higijenu. Osim zubnih pasta koje sadrže fluor potrebno je preporučiti korištenje dodatnih protukarijesnih sredstava, npr. antiseptičkih otopina za usta i interdentalnih četkica. Isto tako, tijekom redovnih kontrola, potrebno je pacijente podsjećati na redovito i pravilno održavanje oralne higijene. Osim toga, poželjna je i profesionalna aplikacija protukarijesnih preparata čija učinkovitost ne ovisi o suradnji pacijenata, što je osobito važno u slučaju terapije adolescenata ili manje suradljivih pacijenata. Takvi preparati za profesionalnu primjenu uključuju klorheksidinske i fluoridne lakove. Najveća prednost lakova je produljeno kontaktno vrijeme aktivne tvari i zubne površine, čime se povećava učinkovitost korištenih sredstava.

Klorheksidinski lakovi se kod ortodonskih pacijenata koriste kao preventivna mjera za redukciju akumulacije plaka, upale gingive i bijelih mrlja. Lak polagano otpušta klorheksidin izravno na zube, pružajući produljeni antibakterijski učinak (25-27). Dokazano je da je aplikacija lakova s klorheksidinom svakih 6 tjedana do 3 mjeseca dovoljna za prevenciju karijesnih lezija tijekom fiksne ortodonske terapije (25).

Fluoridni lakovi se također mogu smatrati učinkovitom preventivnom metodom za poboljšanje otpornosti cakline na karijesne lezije (28, 29). Kao i lakovi koji sadrže klorheksidin, mogu prevenirati upalu gingive, akumulaciju plaka i pojavu bijelih mrlja. Osim fluoridnih iona, ovi lakovi mogu sadržavati druge aktivne tvari, kao što su kazein fosfopeptid-amorfni kalcijev fosfat, trikalcij fosfat, ksilitol itd. Takvi spojevi pojačavaju antikarijesni učinak i remineralizacijski potencijal fluorida (30).

Dakle, profesionalna aplikacija klorheksidinskih i fluoridnih lakova predstavlja vrijedan dodatak mehaničkom čišćenju, posebno kod pacijenata u fiksnoj ortodonskoj terapiji (25-27). U svrhu poboljšanja oralnog zdravlja, osim profesionalne primjene antibakterijskih lakova, u novije vrijeme počela se primjenjivati fotodinamska terapija, odnosno, kombinacija fotosenzitivnog sredstva i lasera odgovarajuće valne duljine. Kako se radi o novijoj metodi, njen učinak na oralno zdravlje, pogotovo u pacijenata u fiksnoj ortodonskoj terapiji, još uvijek nije dovoljno istražen. Prema nedavnoj meta-analizi i sustavnom preglednom radu, fotodinamska terapija može biti alternativa konvencionalnim metodama u kontroli oralnih

parametara, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti ispitao njen učinak (31, 32).

1.1.1. Klorheksidinski lakovi

Klorheksidin (CHX), odnosno spoj u obliku soli klorheksidin-diglukonata, koristi se u dentalnoj medicini kao oralni antiseptik širokog spektra. Klorheksidin je pozitivno nabijena molekula, tako da ima sposobnost adsorpcije na površine negativnog naboja kao što je bakterijska stijenka. Veže se i na mukozu, zubnu površinu, pelikulu i slinu. Pokazuje bakteriostatski učinak ako se koristi u manjim koncentracijama, odnosno disbalansira bakterijsku osmotsku ravnotežu, ili djeluje baktericidno, tako da uzrokuje direktni raspad bakterijske stanice ako se primjenjuje u višim koncentracijama (33).

Klorheksidinski lakovi imaju širok antibakterijski spektar djelujući na streptokoke, aktinomicete, Gram-negativne bakterije, aerobe i anaerobe (34).

Aplikacija klorheksidina, u obliku gela ili laka, dovodi do značajne redukcije bakterija u plaku i slini te je dokazano da inhibira rast više od 99% bakterijskih vrsta izoliranih iz subgingivnog plaka (35-37). Istraživanje Peterssona i sur. (36) navodi da su parodontno patogene bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis* visoko osjetljive na klorheksidin-timol lak. Dokazan je i značajan antibakterijski učinak na *Treponemu denticolu* i *Tannerellu forsythiju* (38). Uočena je i značajna redukcija *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* u plaku i slini nakon primjene 1% klorheksidinskog laka (39).

Također, klorheksidin smanjuje akumulaciju biofilma na površini zuba (37, 40, 41). Prema autorima Rølla i Melsen (42), klorheksidin pokazuje nekoliko mehanizama inhibicije plaka: smanjuje adsorpciju proteina na površinu zuba, odnosno utječe na formiranje pelikule blokiranjem kiselih skupina na glikoproteinima sline, veže se na bakterijsku površinu u subletalnim količinama te taloži faktore aglutinacije u slini i istiskuje kalcij iz matriksa plaka. Klorheksidin direktno interferira s bakterijama koje koloniziraju površinu zuba te i na taj način smanjuje akumulaciju plaka (42). Khan i sur. (43) dokazali su da je jedna aplikacija klorheksidinskog laka dovoljna da reducira plak indeks unutar 3 mjeseca. Njegova je uporaba povezana i sa smanjenom upalom gingive i dubinom džepova (44). Također je dokazano da klorheksidinski lak smanjuje hiperplaziju gingive tijekom fiksne ortodontske terapije (45). Sehgal i sur. (27) zaključuju da aplikacija Cervitec laka (1% klorheksidin + 1% timol) rezultira značajnom redukcijom gingivalnog indeksa u ortodontskih pacijenata šest mjeseci nakon jedne aplikacije.

Međutim, dugotrajna upotreba preparata na bazi klorheksidina dovodi do raznih nuspojava kao što su diskoloracija tvrdih i mekih tkiva, promjena okusa, iritacija i promjene na sluznici usne šupljine, povećano nakupljanje kamenca i reverzibilna oteklina žlijezda slinovnica (46). Upotreba klorheksidina ima i nedostatke jer nije virucid, niti je učinkovit protiv bacila otpornih na kiselinu i alkohol (47).

1.1.2. Fluoridni lakovi

Fluoridni lakovi također spadaju u zlatni standard u borbi protiv karijesa. To su topikalni preparati za profesionalnu primjenu velikih koncentracija fluorida. Indicirani su u visokorizičnih pacijenata za nastanak karijesa, kod dentinske preosjetljivosti, kod pacijenata koji su zračeni u području glave i vrata, hiposalivacije, za liječenje inicijalnih karijesnih lezija te kod pacijenata u fiksnoj ortodontskoj terapiji (33).

U novije vrijeme na tržištu su se počeli pojavljivati preparati s kalcijevim kompleksom, koji osim fluoridnih iona sadrže i kalcijeve i fosfatne soli. Jedan od takvih preparata je trikalcij fosfat. Funkcionalizirani trikalcijev fosfat (TCP) izvor je biološki dostupnih kalcijevih i fosfatnih iona koji djeluju remineralizirajuće i zajedno s fluoridnim ionima razvijaju sinergistički učinak (48). Dodavanjem trikalcijevog fosfata u fluoridne lakove, učinkovitost, iskoristivost, odnosno bioraspoloživost fluoridnih iona je povećana (49, 50). Utvrđeno je da konvencionalni lak s 5% natrijevim fluoridom usporava demineralizaciju i potiče remineralizaciju cakline iskorištavanjem kalcijevih i fosfatnih iona iz sline (51). Međutim, ograničena bioraspoloživost ovih iona (koja ovisi o koncentraciji u slini) u konvencionalnom fluoridnom laku dovela je do razvoja novih lakova koji osiguravaju stalnu opskrbu ionima za poboljšanu remineralizaciju (52). Tijekom demineralizacije manji dio fluoridnih iona ugrađuje se na mjesto iona hidroksilne skupine i pritom dolazi do stvaranja fluorapatita koji je otporniji na kiseline od hidroksiapatita te se otapa tek kad pH usne šupljine padne ispod 4,5 (53, 54). Ako je otopina sline visoko koncentrirana fluorom, a pH je viši od 4,5, umjesto kristala fluorapatita, na površini cakline taložit će se spoj kalcijeva fluorida (33, 54). On služi kao spremište fluoridnih iona koji se počinju otpuštati u slinu pri ponovnom padu pH ispod 5,5 (33, 55). Nekoliko studija je objavilo da je kombinacija trikalcijeva fosfata i fluorida učinkovitiji preparat za sprječavanje demineralizacije, odnosno poticanje remineralizacije od ostalih preparata za topikalnu fluoridaciju te da taj preparat otpušta najviše fluoridnih iona tijekom prvih 6 mjeseci nakon aplikacije (56-62).

Što se tiče antibakterijskog učinka, dokazano je da fluoridni lakovi reduciraju broj kolonija *S. mutansa* i smanjuju proizvodnju kiselina (63). Dodatno, fluoridi inhibiraju razne bakterijske

enzime poput enolaze, kisele fosfataze, pirofosfataze, peroksidaze i katalaze (64, 65). Osim toga, pad broja bakterija tijekom korištenja trikalcijevog fosfatnog laka pripisuje se prisutnošću dodatnih kalcijevih iona koji pridonose visokom alkalnom pH (66, 67). Kombinacija trikalcijeva fosfata s 5% natrijevim fluoridom pokazala je superioran antibakterijski učinak na kariogene bakterije u usporedbi s ostalim fluoridnim lakovima (66).

Poznato je da je adhezija bakterija na površinu zuba preduvjet za stvaranje biofilma (63, 64). Chau i sur. (63) dokazali su da fluoridni lakovi smanjuju akumulaciju biofilma i adheziju *S. mutans* na caklinu te bakterijsku kolonizaciju u plaku.

Kao i klorheksidinski lakovi, fluoridni lakovi također mogu uzrokovati određene nuspojave. Osjetljivost gingive i prolazna diskoloracija cakline neke su od poznatih neželjenih pojava upotrebe spomenutog laka (65).

1.1.3. Fotodinamska terapija

Antimikrobna fotodinamska terapija (eng. *photodynamic therapy, PDT*) predstavlja moguću alternativu antibioticima, ali i antibakterijskim lakovima, jer učinkovito ubija bakterije i njihove toksine. Fotodinamska terapija vrsta je neinvazivne fotokemoterapije koja se temelji na reakciji fotoreaktora (fotosenzitivnog sredstva) i izvora svjetla uz prisutnost kisika (68, 69). Dakle, tri su komponente potrebne za fotodinamsku reakciju: fotosenzitivno sredstvo, odgovarajući izvor svjetlosti i kisik (68). Fotosenzitivno sredstvo, odnosno fotoreaktor, nakon aplikacije ulazi u bakterijsku membranu te se zatim osvjetljava svjetlom odgovarajuće valne duljine (68, 70). Valna duljina izvora svjetla mora odgovarati valnoj duljini pri kojoj fotoreaktor maksimalno apsorbira fotone svjetlosti. Prilikom apsorpcije fotona, elektroni fotosenzitivnog sredstva prelaze u pobuđeno stanje. Prilikom vraćanja iz pobuđenog u nepobuđeno stanje, energija se s elektrona prenosi na kisik, i pritom nastaju kisikovi radikali i singletni kisik (71). Točnije, dolazi do stvaranja dva tipa reakcija. U reakciji tipa 1 nastaju slobodni kisikovi radikali, odnosno superoksidni anion, hidroksilni radikal i hidroperoksidni radikal koji su štetni za integritet stanične membrane uzrokujući ireverzibilna biološka oštećenja. Reakcija tipa 2 karakterizirana je nastajanjem singletnog kisika koji nastaje iz molekularnog kisika (72-75). Singletni kisik ima kratak životni vijek u biološkim sustavima i vrlo kratak radijus djelovanja (0,02 μm). Dakle, reakcija se odvija unutar ograničenog prostora, što dovodi do lokaliziranog djelovanja čineći ga idealnim za primjenu na samo određenim mjestima bez utjecaja na udaljene stanice ili organe (69). Slobodni kisikovi radikali (tip 1) i singletni kisik (tip 2) iznimno su jaki oksidansi koji pridonose razaranju stanične membrane (uglavnom oksidacijom masnih kiselina), inaktivaciji enzima, disfunkciji receptora i oštećenju

bakterijske deoksiribonukleinske kiseline (DNK), ribonukleinske kiseline (RNK), lipida i proteina (72, 76, 77). Reakcija tipa 1 karakteristična je za Gram-pozitivne bakterije, dok se reakcija tipa 2 uglavnom javlja kod Gram-negativnih bakterija i kvasaca (72, 75). Fotodinamska terapija ima širok spektar djelovanja, odnosno jedno fotosenzitivno sredstvo može djelovati na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, gljive, protozoe, itd. (75).

Većina fotosenzitivnih sredstava koja se koriste u medicinske svrhe pripadaju sljedećoj osnovnoj kemijskoj strukturi. Tricikličke boje s različitim mezoatomima: akridin narančasta, proflavin, riboflavin, metilensko modrilo, toluidinsko modrilo, fluorescein i eritrozin. Tetrapiroli: porfirini i njihovi derivati, klorofil, filoeritrin i ftalocijanini te skupina furokumarina: psoralen i njegovi metoksi-derivati, ksantotoksin i bergapten (69).

Toluidinsko modrilo, odnosno toluidin klorid spada u skupinu fenotiazina, sintetskih boja (78). To je pozitivno nabijena molekula (kation) male molekularne mase, dobre topljivosti u vodi, ima hidrofilni karakter i sklonost stvaranju dimera što olakšava njegovo vezanje na stanične membrane mikroorganizama. Toluidinsko modrilo spoj je bez okusa i mirisa, usto je jeftin i netoksičan (76). Zajedno s metilenskim modrilom spada u prvu generaciju fotosenzitivnih sredstava. Ta dva sredstva se najviše koriste u medicini jer zbog svoje pozitivno nabijene molekule mogu djelovati i na Gram-pozitivne i na Gram-negativne bakterije. Dakle, imaju jako širok antibakterijski spektar djelovanja (78, 79).

Maksimalna apsorpcija vodene otopine toluidinskog modrila ovisi o njegovoj koncentraciji. Stoga, izvori svjetlosti koji mogu aktivirati to fotosenzitivno sredstvo mogu biti velikog raspona: od 600 do 660 nm (80). Kada se fotoreaktor osvijetli laserom valne duljine koja odgovara piku njegove apsorpcije, on ulazi u pobuđeno stanje. Tijekom relaksacije u svoje osnovno stanje, prenosi energiju na susjedne atome kisika te generira reaktivni singletni kisik koji oksidira bakterijske stanice (80).

Zasada, koliko je poznato, fotodinamska terapija ne dovodi do nastajanja nuspojava odnosno štete za domaćina, te ovakav oblik terapije nije povezan s bakterijskom rezistencijom koja predstavlja velik problem tijekom upotrebe antibiotika (79).

1.1.3.1. Utjecaj fotodinamske terapije na akumulaciju plaka

Nekoliko je recentnih studija ispitalo utjecaj fotodinamske terapije na akumulaciju dentalnog plaka (40, 81-86). U jednoj od njih, fotodinamska terapija bila je aplicirana supragingivalno, odnosno na caklinu oko ortodontskih bravica. Ispitanici te studije ukupno su četiri puta kroz četiri tjedna bili podvrgnuti aplikaciji kurkumina koji je bio osvijetljen laserom valne duljine

450 nm. Ta kombinacija fotosenzitivnog sredstva i lasera nije dovela do značajne redukcije akumulacije plaka u usporedbi s placebo i klorheksidinskim lakovima (40).

Za razliku od prethodno spomenutog istraživanja, rezultati nekih recentnih studija pokazali su da fotodinamska terapija sama, ili kao adjuvantna terapija ultrazvučnom struganju i poliranju površine korijena može smanjiti nakupljanje plaka u ortodontskih pacijenata (81, 82). Abellan i sur. (81) objavili su da je u ispitanika kojima je aplicirana fotodinamska terapija zabilježena statistički značajna redukcija indeksa plaka 3 i 6 mjeseci nakon prve aplikacije terapije. Također, u istraživanju Gómeza i sur. (82), iznos plaka na razini cijelih usta u ortodontskih ispitanika bio je značajno manji 90 i 180 dana nakon prve aplikacije fotodinamske terapije.

S druge strane, rezultati jednog recentnog istraživanja pokazali su da fotodinamska terapija u kombinaciji s ultrazvučnim čišćenjem površine korijena dovodi do značajne redukcije akumulacije plaka. Međutim, sličan je rezultat dobiven i u skupini koja je bila podvrgnuta samo ultrazvučnom uklanjanju naslaga, odnosno nije bilo statistički značajne razlike među skupinama. Dakle, fotodinamska terapija nije značajno doprinijela smanjenoj akumulaciji plaka (87). Slični su rezultati objavljeni u prethodnim studijama (83-86).

Može se zaključiti da su rezultati istraživanja koja ispituju utjecaj fotodinamske terapije na akumulaciju plaka u ortodontskih pacijenata različiti i nekonzistentni.

1.1.3.2. Antimikrobni učinak fotodinamske terapije

Prema literaturnim podacima, samo su dvije studije istraživale utjecaj fotodinamske terapije na bakteriološki sastav supragingivnog plaka kod pacijenata u fiksnoj ortodontskoj terapiji (88, 89).

Soares i sur. (88) ispitivali su djelotvornost kombinacije dvaju fotosenzitivnih sredstava, metilenskog i toluidinskog modrila. Mješavina dvaju sredstava aplicirana je na caklinu oko bravica donjih premolara. Površina zuba zatim je bila osvijetljena crvenim LED (eng. *light emitting diode*) svjetlom. Nakon terapije je uočena statistički značajna redukcija svih bakterija u supragingivnom plaku. Međutim, autori su ispitali samo kratkotrajni i trenutni antibakterijski učinak fotodinamske terapije (88). U drugoj je studiji ispitivan utjecaj kurkumina s nanomicelama u obliku kapsule koju su ispitanici uzimali jednom tjedno. Uz to, površina gornjih i donjih prednjih zuba u jednom je tretmanu bila osvijetljena LED svjetlom. U toj je skupini zabilježena statistički značajno veća redukcija *S. mutansa* u supragingivnom plaku u usporedbi s ostalim ispitivanim grupama (89).

S druge strane, antimikrobni učinak fotodinamske terapije na subgingivni plak ortodontskih pacijenata ispitan je u brojnim recentnim istraživanjima. U većini njih fotodinamska terapija uspoređivana je s ultrazvučnim struganjem i poliranjem površine korijena (81-87, 90).

U dvije recentne studije ispitanici su bili podijeljeni u dvije ispitne skupine: onu kojoj je aplicirana samo fotodinamska terapija i onu koja je podvrgnuta ultrazvučnom uklanjanju naslaga i poliranju površine korijena (81, 82). U istraživanju Abellana i sur. (81), kombinacija metilenskog modrila i lasera valne duljine 670 nm dovela je do značajne redukcije broja bakterija *P. gingivalis*, *P. intermedia* i *F. nucleatum* u subgingivnom plaku. Autori zaključuju da fotodinamska terapija može biti alternativa ultrazvučnom uklanjanju naslaga s neznatno dugotrajnijim antibakterijskim učinkom (81). Slično istraživanje objavili su i Gómez i sur. (82), u kojem je u obje ispitne skupine uočena značajna redukcija bakterija *P. gingivalis* i *P. intermedia*, s neznatno većom redukcijom zabilježenom u fotodinamskoj skupini ispitanika. Također je bio reducirani broj *S. mutans* u slini (82).

U ostalim studijama fotodinamska terapija korištena je kao adjuvantna terapija ultrazvučnom struganju i poliranju površine korijenova (83-87). U istraživanju Al Nazeha i sur. (87) u ispitnoj skupini u kojoj je korištena kombinacija spomenutih terapija (metilensko modriло i laser valne duljine 670 nm + ultrazvučno struganje i poliranje korijenova), tjedan dana i dva tjedna nakon jedne intervencije, u plaku je značajno bio reducirani broj bakterija *T. forsythia* i *P. gingivalis*. Ispitnoj skupini koja je bila podvrgnuta samo ultrazvučnom čišćenju i poliranju površine korijenova, značajno je bio reducirani broj bakterije *T. forsythia* tjedan dana nakon intervencije (87). Rezultati jedne prethodne studije također su pokazali značajno veću redukciju bakterija *P. gingivalis* i *T. forsythia* u skupini kojoj su aplicirane obje terapije u jednom dolasku (84). Veća redukcija bakterija u subgingivnom plaku u skupinama koje su podvrgnute kombinaciji dviju terapija dokazana je i u ostalim prethodnim istraživanjima (83, 85, 86).

U svim prethodno spomenutim studijama kao fotosenzitivno sredstvo koristilo se metilensko modriло koje je bilo osvijetljeno laserom valne duljine 670 nm. Dakle, u većini recentnih studija zaključeno je da fotodinamska terapija sama ili kao adjuvantna terapija ultrazvučnom uklanjanju naslaga doprinosi značajnoj redukciji bakterija u subgingivnom plaku (81-87, 90).

U svim spomenutim studijama fotodinamska terapija aplicirana je subgingivalno.

Međutim, broj istraživanja u kojima se ispituje utjecaj fotodinamske terapije na sastav supragingivnog plaka je opskuran. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se donio zaključak o njenom utjecaju na bakteriološki sastav supragingivnog plaka.

1.1.3.3. Utjecaj fotodinamske terapije na stanje gingive

Nekoliko je studija ispitivalo utjecaj fotodinamske terapije na stanje gingive kod ortodontskih pacijenata (40, 82-87). U istraživanju Paschoala i sur. (40) gingivalni indeks je mjesec dana nakon ukupno četiri aplikacije fotodinamske terapije bio značajno manji, te se on nije razlikovao od skupine ispitanika kojima je apliciran klorheksidinski lak. Nakon 3 mjeseca, gingivalni se indeks u fotodinamskoj skupini vratio na početne vrijednosti (40).

Dodatno, rezultati jedne prethodne studije pokazali su da je fotodinamska terapija značajno utjecala na stanje gingive, odnosno na iznos krvarenja na razini cijelih usta (eng. *full mouth bleeding score, FMBS*). FMBS je bio značajno manji 90 dana od prve aplikacije (82). Al Nazeh i sur. (87) objavili su pak da fotodinamska terapija u kombinaciji s ultrazvučnim čišćenjem površine korijena dovodi do značajne redukcije upale gingive, međutim sličan rezultat dobiven je i u skupini koja je bila podvrgnuta samo ultrazvučnom uklanjanju naslaga. Odnosno, statistički značajna razlika između te dvije skupine nije zabilježena. Dakle, fotodinamska terapija ipak nije značajno pridonijela redukciji gingivalne upale (87). Slični su rezultati objavljeni u prethodnim recentnim studijama (83-86, 90).

Dakle, kao i u slučaju akumulacije plaka, rezultati istraživanja koja ispituju utjecaj fotodinamske terapije na stanje gingive u ortodontskih pacijenata su različiti i inkonzistentni.

1.1.3.4. Utjecaj fotodinamske terapije na razvoj demineralizacijskih lezija

Prema literaturnim podacima, samo su dva istraživanja ispitivala utjecaj fotodinamske terapije na razvoj inicijalnih karijesnih lezija (82, 89).

Hosseinpour-Nader i sur. (89) su zaključili da fotodinamska terapija ima utjecaj na njihovu redukciju. Kod ispitanika u toj skupini zabilježene su statistički značajno manje vrijednosti na DIAGNOdent uređaju 90 i 120 dana od početka istraživanja. Također, prosječan broj inicijalnih karijesnih lezija po pacijentu se smanjio tijekom trajanja studije (89).

S druge strane, u istraživanju Gómeza i sur. (82), u skupini ispitanika kojima je aplicirana fotodinamska terapija dokazan je neznatan porast ICDAS (eng. *international caries detection and assessment system*) indeksa 6 mjeseci nakon početka istraživanja. Isti je rezultat uočen i u skupini ispitanika koji su bili podvrgnuti ultrazvučnom struganju i poliranju površine korijenova, bez značajne razlike između te dvije ispitne skupine (82).

Dakle, utjecaj fotodinamske terapije na pojavu i razvoj inicijalnih karijesnih lezija još je uvijek nedovoljno istražen. Broj studija koje se time bave vrlo je opskuran te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti ispitao njen učinak.

2. HIPOTEZA I CILJEVI

2.1. Hipoteza

Fotodinamska terapija jednako je učinkovita u smanjivanju akumulacije plaka, redukciji broja bakterija u supragingivnom i subgingivnom plaku, prevenciji upale gingive i prevenciji nastanka inicijalnih karijesnih lezija kod ortodontskih pacijenata kao i 1% klorheksidin lak i trikalcij fosfatni lak s 5% natrijevim fluoridom.

2.2. Ciljevi

Osnovni (opći, generalni) cilj:

Istražiti utjecaj fotodinamske terapije na akumulaciju i bakteriološki sastav supragingivnog i subgingivnog plaka, stanje gingive i razvoj inicijalnih karijesnih lezija u ortodontskih pacijenata tijekom prvih 18 tjedana fiksne ortodontske terapije.

Specifični ciljevi:

1. Usporediti indeks plaka u ortodontskih pacijenata tretiranih različitim antibakterijskim sredstvima (PDT, 1% CHX lak i TCP lak s 5% NaF) prije intervencije i postave fiksne naprave (T0), 6 tjedana (T1), 12 tjedana (T2) i 18 tjedana kasnije (T3)
2. Usporediti bakteriološki sastav supragingivnog plaka pomoću masene spektrometrije (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight*, *MALDI- TOF Mass Spectrometry*) i jedinica koje tvore kolonije (eng. *colony forming unit*, *CFU*) u ortodontskih pacijenata tretiranih različitim antibakterijskim sredstvima (PDT, 1% CHX lak i TCP lak s 5% NaF) prije intervencije i postave fiksne naprave (T0), 6 tjedana (T1), 12 tjedana (T2) i 18 tjedana kasnije (T3)
3. Usporediti bakteriološki sastav subgingivnog plaka pomoću reakcije lančane polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, *PCR*) u ortodontskih pacijenata tretiranih različitim antibakterijskim sredstvima (PDT, 1% CHX lak i TCP lak s 5% NaF) prije intervencije i postave fiksne naprave (T0) i 18 tjedana kasnije (T3)
4. Usporediti gingivalni indeks u ortodontskih pacijenata tretiranih različitim antibakterijskim sredstvima (PDT, 1% CHX lak i TCP lak s 5% NaF) prije intervencije i postave fiksne naprave (T0), 6 tjedana (T1), 12 tjedana (T2) i 18 tjedana kasnije (T3)
5. Usporediti pojavu inicijalnih karijesnih lezija u ortodontskih pacijenata tretiranih različitim antibakterijskim sredstvima (PDT, 1% CHX lak i TCP lak s 5% NaF) prije intervencije i postave fiksne naprave (T0) i 18 tjedana kasnije (T3)

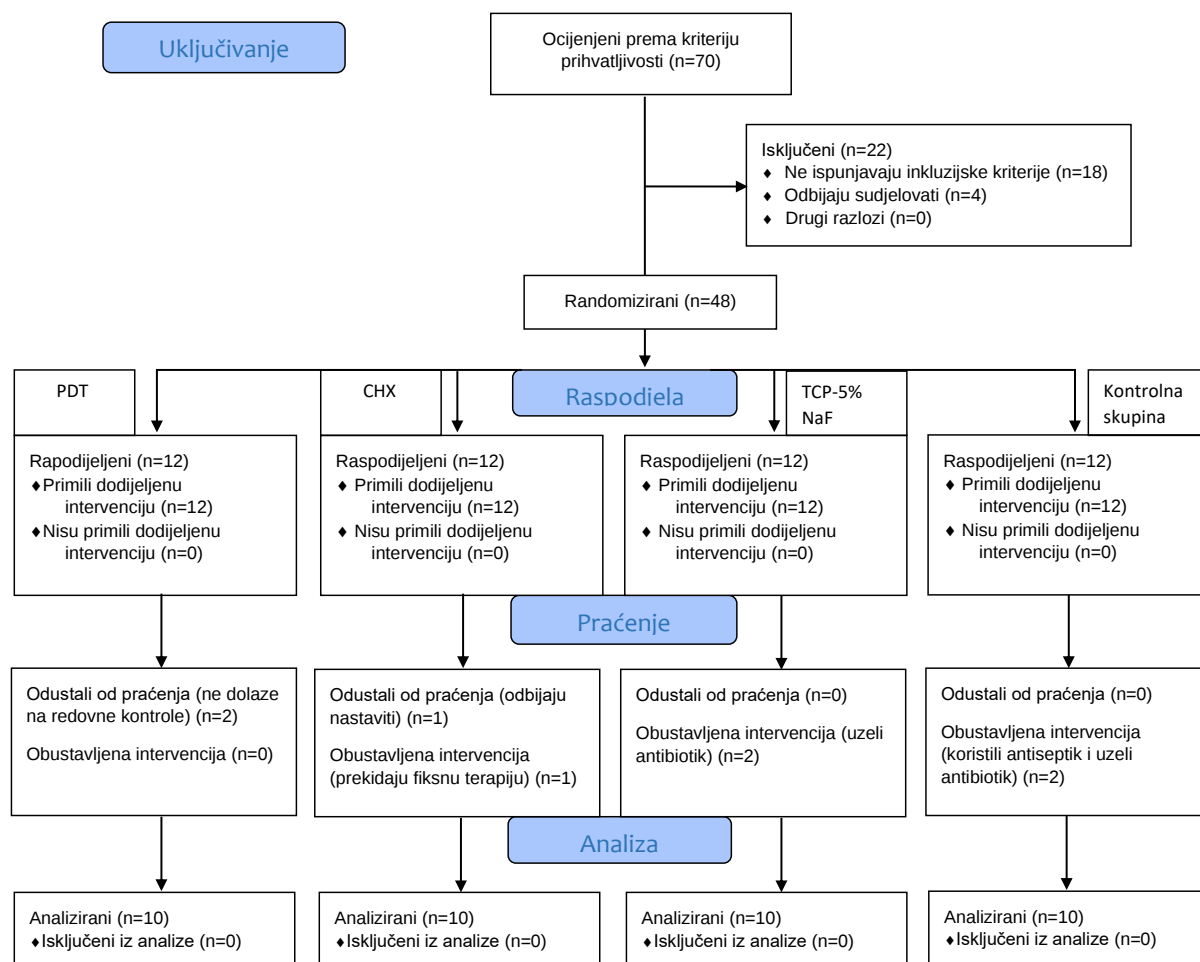
3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici

Pacijenti koji ulaze u fiksnu ortodontsku terapiju na Zavodu za ortodonciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb bili su ispitanici ove studije.

Uključujući kriteriji za ispitanike bili su dob od 12 do 17 godina, indikacija za fiksnom ortodontskom terapijom bez potrebe za ekstrakcijom, diskrepancija veličine zuba i zubnog luka (eng. *tooth size-arch length discrepancy, TSALD*) < 4 mm, trajna denticija (uključujući i druge molare), odsutnost oralnih lezija, pulpnih i periapikalnih bolesti te bolesti gingive i parodonta. Svi koji su bili u prethodnoj ortodontskoj terapiji, uzimali antibiotike i protuupalne lijekove 3 mjeseca prije i tijekom trajanja studije, koristili antiseptičke otopine 3 mjeseca prije i tijekom trajanja studije, uzimali kortikosteroide i imunosupresivne lijekove, pušači i oboljeli od sistemskih stanja koja mogu utjecati na upalni odgovor mekih tkiva i mogućnost održavanja adekvatne kontrole plaka nisu bili uključeni u studiju, odnosno iz nje su bili isključeni.

Od siječnja do ožujka 2024. godine ukupno je bilo pregledano 70 pacijenata. Njih 18 nije zadovoljilo inkluzijske kriterije, a četvero je odbilo sudjelovati u istraživanju. Dakle, 48 ispitanika nasumično je raspoređeno u 4 ispitne skupine, po 12 sudionika u svakoj. Konačno, analizirano je 40 ispitanika nakon što je njih 8 isključeno ili je svojevolumeno prekinulo sudjelovati u studiji (slika 1).



Slika 1. Dijagram tijeka ispitanika.

Roditelji ispitanika potpisali su informirani pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Stomatološkog fakulteta u Zagrebu (05-PA-12-23/2023.) i Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb (02/013 AG).

3.2. Postupci

Svi ispitanici su 2 tjedna prije početka istraživanja, a prilikom uključivanja u studiju dobili istu četkicu i zubnu pastu i detaljne upute o održavanju oralne higijene. Isto tako, zamoljeni su da tijekom trajanja studije ne koriste antiseptičke otopine za usta niti bilo kakva dodatna sredstva za održavanje oralne higijene kako ne bi modificirali rezultate.

Sve intervencije i sva mjerenja ishoda studije izvodili su se na 10 zuba u gornjem zubnom luku (od desnog drugog premolara do lijevog drugog premolara). Intervencije su izvođene odmah nakon postave fiksne ortodonske naprave (T0), 6 tjedana (T1) i 12 tjedana (T2) kasnije.

3.2.1. Intervencije

Ispitanici u prvoj ispitnoj skupini bili su podvrgnuti aplikaciji fotodinamske terapije. Prije intervencije bukalne površine zuba bile su očišćene rotirajućom četkicom bez paste. Fotodinamsko sredstvo na bazi toluidinskog modrila (155 mg/mL; LaserHF Paro-PDT, Hager & Werken GmbH & Co. KG, Duisburg, Njemačka) nanosilo se na površinu zuba oko bravice pomoću sterilne šprice (slika 2). Nakon 60 sekundi, fotosenzitivno sredstvo bilo je isprano fiziološkom otopinom (slika 3). Nakon sušenja zrakom, bukalne površine zuba bile su osvijetljene diodnim laserom valne duljine 660 nm (Laser HF, Hager & Werken GmbH & Co. KG, Duisburg, Njemačka) na udaljenosti 5 mm od površine zuba u trajanju od 60 sekundi (Slika 4). Pritom je izlazna snaga lasera iznosila 100 mW, a gustoća snage $124,3 \text{ W/cm}^2$ uz kontinuirani način rada (91).



Slika 2. Nanošenje fotosenzitivnog sredstva.



Slika 3. Ispiranje fotosenzitivnog sredstva fiziološkom otopinom.



Slika 4 a) i b). Osvjetljavanje laserom.

Ispitanici u drugoj ispitnoj skupini bili su podvrgnuti aplikaciji 1% klorheksidin laka s 1% timolom (Cervitec® Plus, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein). Prije nanošenja laka, bukalne površine zuba bile su očišćene rotirajućom četkicom bez paste. Lak se na bukalne površine zuba oko bravica nanosio prema uputama proizvođača, odnosno pomoću aplikatora u horizontalnim potezima u tankom sloju. Lak se nakon aplikacije sušio 30 sekundi. Ispitanici su zamoljeni da sat vremena nakon nanošenja ne konzumiraju hranu i piće.

Ispitanici u trećoj ispitnoj skupini bili su podvrgnuti aplikaciji trikalcij fosfatnog laka (TCP) s 5% natrijevim fluoridom (Clinpro TM White Varnish, 3M ESPE, 3M Deutschland GmbH, Germany). Prije nanošenja laka, bukalne površine zuba bile su očišćene rotirajućom četkicom bez paste. Lak se na bukalne površine zuba oko bravica nanosio prema uputama proizvođača, odnosno pomoću aplikatora u horizontalnim potezima u tankom sloju. Nakon aplikacije ispitanici su zamoljeni da minimalno 4 sata ne peru zube i ne koriste zubni konac te da tijekom tog razdoblja jedu samo meku hranu i izbjegavaju vruću hranu i napitke.

3.2.2. Primarne mjere ishoda

3.2.2.1. Akumulacija dentobakterijskog plaka

Prije postave fiksne ortodonske naprave, u T0, akumulacija dentobakterijskog plaka mjerila se pomoću indeksa plaka po Silnessu i Löeu (92). Površina svakog zuba bila je podijeljena na 4 područja: distolabijalno, labijalno, meziolabijalno i palatinalno. U svakom od tih područja količina plaka je bila izražena ljestvicom od 0 do 3: 0 - nema plaka; 1 - nema vidljivog plaka, plak na vršku sonde kod sondiranja; 2 - plak vidljiv golim okom; 3 - obilje plaka. Za svaki zub se izračunala srednja vrijednost, a potom i srednja vrijednost za svih 10 zuba u gornjem zubnom luku.

6 (T1), 12 (T2) i 18 (T3) tjedana kasnije, akumulacija dentobakterijskog plaka mjerila se pomoću modificiranog indeksa plaka po Silnessu i Löeu, jer su se na zubima nalazile bravice. Površina zuba oko bravice bila je podijeljena na 4 područja: mezijalno, distalno, gingivalno i okluzalno. U svakom području razina plaka se izrazila ljestvicom 0 - 3: 0 - nema dentobakterijskog plaka; 1 - otoci dentobakterijskog plaka; 2 - kontinuirana linija dentobakterijskog plaka ≤ 1 mm; 3 - kontinuirana linija dentobakterijskog plaka > 1 mm. Za svaki se zub izračunala srednja vrijednost indeksa plaka, a potom i srednja vrijednost za sve ispitivane zube u gornjem zubnom luku (93, 94).

3.2.2.2. Bakteriološki sastav supragingivnog plaka

Prije postave fiksne naprave (T0), 6 (T1), 12 (T2) i 18 tjedana (T3) kasnije, uzorci supragingivnog plaka uzeti su pomoću sterilne sonde s bukalne površine ispitivanih zuba i zatim preneseni na sterilni papirnati štapić veličine 50. Papirnati štapić s uzorkom plaka pohranio se u Eppendorf plastičnu epruvetu koja je sadržavala 1,5 mL fiziološke tekućine. Nakon toga, 0,01 μ L uzorka iz epruvete inokulirano je na krvni/Brucela i Columbia agar koji su prethodno bili pripremljeni prema uputama (95). Inkubacija podloga za anaerobne bakterije provodila se u anaerobnim uvjetima na 35 °C tijekom 48 sati, dok su aerobne bakterije uzgajane u uvjetima atmosferskog kisika u termostatu na 36 – 37 °C tijekom 18 – 24 sata.

Zatim su bakterije bile identificirane pomoću MALDI- TOF masene spektrometrije. Analiza je napravljena na Zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Priprema Matrix otopine:

Za pripremu Matrix otopine upotrebljen je *HCCA matrix portioned* (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina, eng. *α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*), u tubicama koje sadrže 2,5 $\pm$ 0,3 mg matriksa te standardno otapalo koje se sastoji od 50% acetonitrila, 47,5% vode i 2,5% trifluoroctene kiseline (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, SAD).

250 μ L standardnog otapala dodano je u jednu tubu *HCCA matrix portioned* i vorteksirano dok svi kristali matriksa nisu bili kompletno otopljeni (pipetirajuća shema za 1 mL standardnog otapala: 500 μ L acetonitrila, 475 μ L vode, 25 μ L trifluoroctene kiseline).

Priprema uzoraka:

Biološki materijal (jedna kolonija mikroorganizma) je u tankom sloju nanesen na MALDI pločicu pomoću vrška nastavka pipete. Nakon toga je uzorak ostavljen da se osuši na zraku te je zatim prekriven s 1 μ L HCCA matriksa. Nakon sušenja, uzorak je stavljen u analizator.

Postupak nakon stavljanja uzorka u analizator:

Nakon definiranja projekta (naziv koji stroj daje skupini analiza koje se postupno odvijaju na istoj pločici, a rezultati dobivaju zajedno na istom ispisu) i odabira baze podataka, započeta je analiza (MALDI Biotyper®CA System, Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA USA).

Vrijednosti rezultata pouzdanosti veće od 2,0 smatrale su se sigurnom identifikacijom, od 1,7 do 1,99 srednje pouzdanom identifikacijom, a vrijednosti rezultata pouzdanosti ispod 1,699 smatrale su se nepouzdanom identifikacijom i tako nisu uzete u daljnju analizu.

U svrhu određivanja ukupnog broja živih stanica bakterija, izrasle kolonije su se prebrojavale, a njihov je broj bio izražen u jedinicama koje tvore kolonije/ μ L (eng. *colony forming unit*, CFU).

3.2.3. Sekundarne mjere ishoda

3.2.3.1. Bakteriološki sastav subgingivnog plaka

Uzorci subgingivnog plaka uzeti su prije postave fiksne ortodonske naprave (T0) i 18 tjedana (T3) kasnije pomoću dva sterilna papirnata štapića veličine 50 iz gingivnih sulkusa ispitivanih zuba. Papirnati štapić postavio se u sulkus do 4 mm dužine, odnosno dok se nije osjetio otpor, u trajanju od 20 sekundi (96). Nakon toga se uzorak zajedno s papirnatim štapićem pohranio u Eppendorf plastičnu epruvetu koja je sadržavala 1,5 mL fiziološke tekućine. Epruveta s uzorkom je zatim pohranjena na -80 °C do PCR analize.

Izolacija bakterijske DNK

Izolacija bakterijske DNK provedena je pomoću komercijalno dostupnog pribora za ekstrakciju (SaMag Bacterial DNA Extraction kit, Sacace Biotechnologies Srl, Como, Italija). Nakon što su uzorci odmrznuti, držani su na sobnoj temperaturi 15 minuta i vorteksirani 20 – 30 sekundi, te su zatim transportirani u nove Eppendorf epruvete. Da bi se bakterijske stanice istaložile, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 20 000 g (Haraeus Pico 21, ThermoFisher Scientific, Thermo Electron LED GmbH, Osterode am Harz, Njemačka). Supernatant je odbačen, a talog je resuspendiran u 220 μ L BL2B puferske otopine (Sacace Biotechnologies Srl, Como, Italija).

koja je korištena za izvođenje lize bakterijske stanične stijenke. Zatim je 200 µL suspenzije transportirano u nove epruvete. Izolacija je obavljena u instrumentu SaMag-12 EVO (Sacace Biotechnologies Srl, Como, Italija) korištenjem protokola za izolaciju (Bacterial DNA Extraction kit Protocol). Volumen elucije postavljen je na 50 µL. Nakon što je izolacija završena, uzorci su držani zamrznuti dok nije izvršeno PCR umnožavanje i detekcija bakterijske DNK.

Amplifikacija i detekcija DNK

Nakon odmrzavanja, najprije je u svaku epruvetu s uzorkom dodano 10 µL vode bez nukleaze (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, SAD). Uzorci su zatim vorteksirani 5 sekundi i centrifugirani 5 sekundi. Umnožavanje i detekcija bakterijske DNK provedena je korištenjem komercijalno dostupnog pribora (PeriodontScreen Real-™, Sacace Biotechnologies Srl, Como, Italija) i prema uputama proizvođača. Svaka je epruveta iz pribora sadržavala reakcijsku smjesu (21 µL) s jednim od odgovarajućih primera i skupova sonde za specifični patogen (*A. actynomicetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia* i *F. nucleatum*) i TaqMan® Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, SAD).

7 µL Taq polimeraze vorteksirano je 5 sekundi i zatim dodano u svaku epruvetu s reakcijskom smjesom. Zatim je 7 µL izolirane DNK iz svakog uzorka dodano u odgovarajuće epruvete. Mješavina reakcijske smjese, Taq polimeraze i izolirane DNK iz svakog uzorka zatim je centrifugirana 5 sekundi i umetnuta u uređaj za PCR (QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, SAD). Ukupni reakcijski volumen svake epruvete iznosio je 35 µL.

Amplifikacijski profil sastojao se od jednog ciklusa na 80 °C/120 s i jednog na 95 °C/90 s (faza zadržavanja), 40 ciklusa na 95 °C/15 s, 40 ciklusa na 60 °C/30 s (detekcija fluorescencije) i 40 ciklusa na 72 °C/40 s (PCR faza).

Fluorescencija je detektirana u FAM (specifični patogen) i HEX (unutarnja kontrola) fluorescencijskim kanalima. Iako se prema postavkama softvera određeni patogen smatrao pozitivnim ako je $C_t < 35$, ova je vrijednost pomaknuta za 5 (< 30) jer nije otkrivena fluorescencija u prvih pet *run-ova*.

3.2.3.2. Stanje gingive

Stanje gingive procijenilo se prije postave fiksne ortodontske naprave (T0), 6 (T1), 12 (T2) i 18 tjedana (T3) kasnije pomoću gingivalnog indeksa prema Silnessu i Löeu (92). Površina

gingive svakog zuba bila je podijeljena na 4 područja: distolabijalna/bukalna papila, labijalna marginalna gingiva, meziolabijalna/bukalna papila i lingvalna marginalna gingiva. U svakom području stanje gingive se izrazilo ljestvicom 0 – 3: 0 – nema znakova upale, zdrava gingiva; 1 – blaga upala, neznatna promjena boje, blagi edem, bez krvarenja prilikom sondiranja; 2 – umjerena upala, crvenilo, edem, hipertrofija, krvarenje prilikom sondiranja; 3 – jaka upala, jako crvenilo i hipertrofija, ulceracije, spontano krvarenje. Za svaki se zub izračunala srednja vrijednost gingivalnog indeksa, a potom i srednja vrijednost za svih 10 ispitivanih zuba.

3.2.3.3. Dijagnostika inicijalnih karijesnih lezija na intraoralnim fotografijama

Nikon digitalnim fotoaparatom (Nikon d7500, Nikon, Japan) fotografirane su bukalne plohe ispitivanih zuba koristeći postavke: ISO 125, f stopa (otvor blende) 32 i brzina zatvarača 1/100 sekundi s uključenim automatskim fokusom. Frontalna te lijeva i desna lateralna fotografija snimljene su prije postave fiksne ortodontske naprave (T0) i 18 tjedana kasnije (T3). Prije fotografiranja, bukalne površine zuba bile su očišćane četkicom bez paste kako bi se uklonio plak koji može sakriti inicijalnu karijesnu leziju.

Fotografije snimljene u prvoj i zadnjoj posjeti u istraživanju stavljene su na monitor jedna pored druge i međusobno uspoređene. Ukoliko je u T0 postojala bijela mrlja, a u T3 nije došlo do njezine promjene (nije se povećala i nije se promijenila površina), ona je smatrana fluoridnom ili razvojnom bijelom mrljom. Bijela mrlja koja je postojala u T0, ali se u T3 pogoršala (povećala se ili joj se promijenila površina), smatrana je inicijalnom karijesnom lezijom (18). Isto tako, sve nove inicijalne karijesne lezije, one koje su se u potpunosti remineralizirale, odnosno povukle i one čija se veličina smanjila također su bile zabilježene. Dijagnostika lezija evaluirala se na mezijalnom, distalnom, gingivalnom i okluzalnom dijelu svakog ispitivanog zuba.

3.3. Izračun veličine uzorka

Veličina uzorka temeljila se na utvrđivanju razlika u indeksu plaka, glavnom ishodu studije. Podaci iz recentne studije (40) pokazali su srednju razliku od 0,61 u indeksu plaka sa skupnom standardnom devijacijom od 0,59, što odgovara Cohenovom koeficijentu $f \approx 0,45$ (veličina velikog učinka).

Izračun se temeljio na srednjoj veličini učinka ($f = 0,25$). Korištenjem G*Power 3.1.9.7 s $\alpha = 0,05$, snagom = 0,80, 4 ispitne skupine i 4 ponovljena mjerenja (T0, T1, T2, T3), potrebna veličina uzorka bila je 36. Kako bi se osigurala jednaka raspodjela ispitanika po skupinama i valjanost rezultata, odlučeno je da će se analizirati najmanje 40 sudionika ($n = 10$), čime bi se

postigla snaga od 82,54%. Uzimajući u obzir potencijalno odustajanje (20%), najmanje 48 ispitanika ($n = 12$) je trebalo biti randomizirano.

3.4. Randomizacija

Ispitanici su slučajnim odabirom bili podijeljeni u 4 ispitne skupine, po 12 ispitanika u svakoj skupini. Za podjelu ispitanika po skupinama koristila se restriktivna permutacijska blok randomizacija napravljena u softveru za randomizaciju (Research Randomizer). Randomizacija je bila unaprijed napravljena, prije uključivanja ispitanika u studiju. Prilikom regrutacije, svakom je ispitaniku (koji je imao svoj redni broj koji odgovara rednom broju uključivanja u studiju) bio dodijeljen broj od 1 do 4 ovisno o skupini kojoj je pripao te se postupalo u skladu s njome.

3.5. Zaslijepljivanje

Istraživač koji je prikupljao podatke i procjenjivao ishode istraživanja, odnosno onaj koji je mjerio indeks plaka, uzimao uzorke supragingivnog i subgingivnog plaka za analizu, mjerio gingivalni indeks i evaluirao pojavu inicijalnih karijesnih lezija na intraoralnim fotografijama bio je zaslijepljen. Osoba koja je radila bakteriološke analize supragingivnog i subgingivnog plaka, kao i osoba koja je analizirala podatke bili su zaslijepljeni. Istraživač kliničar koji je izvodio intervencije nije bio zaslijepljen. Ispitanici su također bili svjesni kojoj ispitnoj skupini pripadaju. Dakle, radi se o jednostruko zaslijepljenoj studiji.

3.6. Statistička analiza

Statistička analiza napravljena je u IBM SPSS statističkom softveru, verzija 29.0.1.0 (IBM, New York, USA). Normalnost distribucije podataka istražila se Kolmogorov-Smirnovljevim testom kao i testovima asimetrije i zakrivljenosti.

Osnovne demografske i kliničke karakteristike analizirane su Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Dunnovim testom.

Za kategoričke podatke, unutargrupne usporedbe procijenjene su Fisherovim egzaktnim testom i Hi-kvadrat testom. Kontinuirane varijable, kao što su indeks plaka, broj bakterijskih kolonija i gingivalni indeks, uspoređivane su između različitih vremenskih točaka pomoću Wilcoxonovog testa rangova za zavisne uzorke.

Indeksi su analizirani pomoću Generalnog linearnog modela s ponovljenim mjerenjima (unutar skupina - faktor vrijeme, između skupina - faktor skupina). Pretpostavke o sferičnosti i homogenosti bile su ispunjene (Mauchly $p = 0,58$; Boxov $M p = 0,49$). Grupne razlike izražene

su kao srednje razlike u odnosu na kontrolnu skupinu, s 95% intervalima pouzdanosti izvedenim iz LSD-prilagođenih procijenjenih graničnih srednjih vrijednosti. Vizualni pregled normalnih Q-Q dijagrama nije pokazao značajno odstupanje od normalnosti; formalni Shapiro-Wilk testovi bili su neznačajni (svi $p > 0,10$), osim graničnog rezultata na G0, koji je ocijenjen podnošljivim zbog veličine uzorka.

Kako bi se osigurala odgovarajuća statistička usporedba, broj subgingivalnih bakterija je logaritamski transformiran ($\log_{10}$) prije analize, budući da je veliki broj uzoraka u početku imao vrijednost 0. Ova transformacija omogućila je snažniju usporedbu između početne vrijednosti (T0) i praćenja (T3).

Analiza osjetljivosti pomoću generaliziranog linearnog mješovitog modela procijenila je grupiranje inicijalnih karijesnih lezija na razini zuba unutar ispitanika. Ishod je bio razvoj nove lezije (binarno: da/ne), s ispitnom skupinom kao fiksnim učinkom i rednim brojem ispitanika kao nasumičnim presretanjem kako bi se u obzir uzela korelacija unutar ispitanika.

P-vrijednost $< 0,05$ smatrala se statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Demografski podaci ispitanika

Osnovna demografska i klinička obilježja ispitanika nalaze se u tablici 1 i tablici 2.

Nije pronađena statistički značajna razlika između spolova ($p = 0,439$) te su zbog toga svi ispitanici zajedno promatrani.

Tablica 1. TSALD i dob ispitanika po ispitivanim skupinama.

	Ispitna skupina															p*
	PDT			CHX			TCP-5% NaF			Kontrolna skupina			Ukupno			
	Medijan IKR			Medijan IKR			Medijan IKR			Medijan IKR			Medijan IKR			
TSALD	-2,8	-0,5	0,8	-3,00	-1,95	-1,2	-3,3	-2,25	0,3	-0,38	-2,35	1,89	-3,2	-1,85	0,25	0,459
dob	15,00	15,50	16,00	13,00	15,00	16,00	14,00	15,00	16,00	14,00	15,50	17,00	14,00	15,00	16,50	0,728

TSALD - diskrepancija veličine zuba i zubnog luka (eng. *tooth size-arch length discrepancy*)

*Kruskal-Wallisov test

Tablica 2. Spol ispitanika po ispitivanim skupinama.

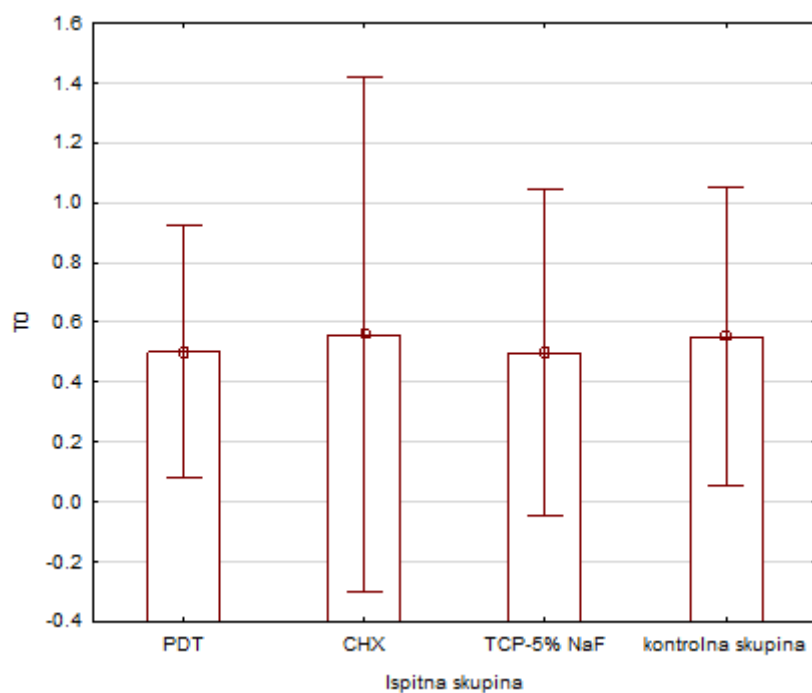
Ispitna skupina											p**
	PDT		CHX		TCP-5% NaF		Kontrolna skupina		Ukupno		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Spol: M	4	40,0	7	70,0	4	40,0	6	60,0	21	52,5	0,439
Spol: Ž	6	60,00	3	30,0	6	60,0	4	40,0	19	47,5	
Ukupno	10	100,0	10	100,0	10	100,0	10	100,0	68	100,0	

**Fisherov egzaktni test

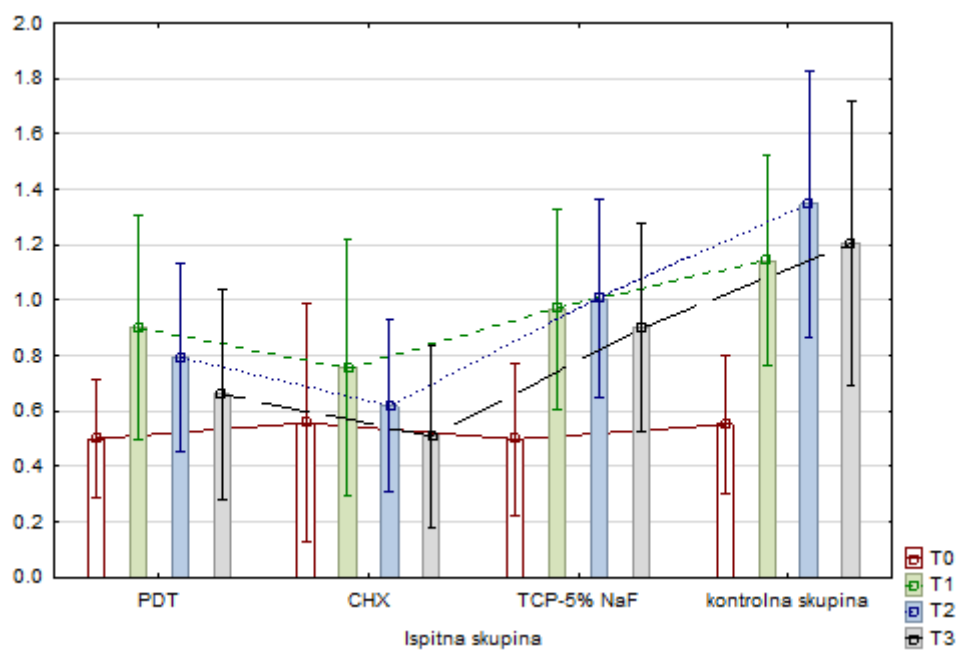
4.2. Utjecaj ispitivanih metoda na akumulaciju dentobakterijskog plaka

Interval između inicijalnih mjerenja i mjerenja 6 tjedana kasnije (T0-T1)

Inicijalne vrijednosti indeksa plaka nisu se značajno razlikovale između ispitnih skupina ($p = 0,953$, slika 5). Najveće povećanje u svim skupinama uočeno je između početka istraživanja (T0) i 6 tjedana kasnije (T1; $p < 0,001$). Ovo povećanje bilo je statistički značajno u PDT, TCP-5% NaF i kontrolnoj skupini (PDT: $p = 0,004$, TCP-5% NaF i kontrolna skupina: $p < 0,001$; slika 6). U T1, indeks plaka u kontrolnoj skupini bio je značajno viši od onoga izmjenjenog u CHX skupini ($p = 0,039$; tablica 3, slika 7).



Slika 5. Srednje vrijednosti indeksa plaka u ispitivanim skupinama u T0.



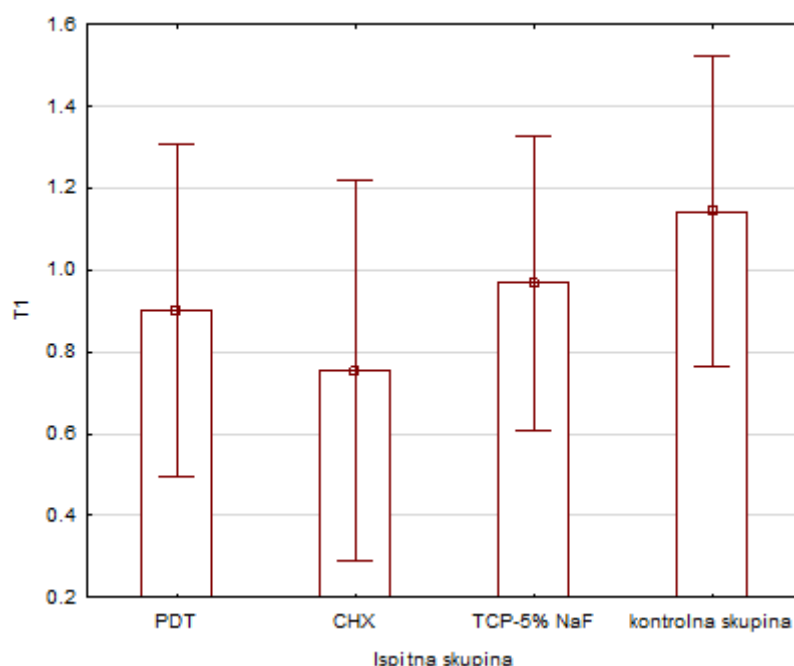
Slika 6. Srednje vrijednosti indeksa plaka u ispitivanim skupinama u vremenskim intervalima.

Tablica 3. Usporedba parova ispitivanih skupina u različitim vremenskim točkama prikazana kao srednje razlike i intervali pouzdanosti za indeks plaka.

Točka mjerjenja	Ispitna skupina	Ispitna skupina	Srednja razlika između skupina	Interval pouzdanosti (95%) za razliku ^b	p ^b
T0	PDT	CHX	-0,057	-0,331 – 0,217	0,676
		TCP-5% NaF	0,002	-0,272 – 0,276	0,988
		Kontrolna skupina	-0,051	-0,325 – 0,223	0,709
	CHX	PDT	0,057	-0,217 – 0,331	0,676
		TCP-5% NaF	0,059	-0,215 – 0,333	0,665
		Kontrolna skupina	0,006	-0,268 – 0,280	0,965
	TCP-5% NaF	PDT	-0,002	-0,276 – 0,272	0,988
		CHX	-0,059	-0,333 – 0,215	0,665
		Kontrolna skupina	-0,053	-0,327 – 0,221	0,698
	Kontrolna skupina	PDT	0,051	-0,223 – 0,325	0,709
		CHX	-0,006	-0,280 – 0,268	0,965
		TCP-5% NaF	0,053	-0,221 – 0,327	0,698
T1	PDT	CHX	0,144	-0,222 – 0,510	0,431
		TCP-5% NaF	-0,068	-0,434 – 0,298	0,709
		Kontrolna skupina	-0,242	-0,609 – 0,124	0,188
	CHX	PDT	-0,144	-0,510 – 0,222	0,431
		TCP-5% NaF	-0,212	-0,578 – 0,154	0,248
		Kontrolna skupina	-,386*	-0,753 – -0,020	0,039
	TCP-5% NaF	PDT	0,068	-0,298 – 0,434	0,709
		CHX	0,212	-0,154 – 0,578	0,248
		Kontrolna skupina	-0,174	-0,541 – 0,192	0,341
	Kontrolna skupina	PDT	0,242	-0,124 – 0,609	0,188
		CHX	0,386*	0,020 – 0,753	0,039
		TCP-5% NaF	0,174	-0,192 – 0,541	0,341
T2	PDT	CHX	0,173	-0,169 – 0,515	0,312
		TCP-5% NaF	-0,215	-0,557 – 0,127	0,211
		Kontrolna skupina	-0,557*	-0,899 – -0,215	0,002
	CHX	PDT	-0,173	-0,515 – 0,169	0,312
		TCP-5% NaF	-0,388*	-0,730 – -0,046	0,027
		Kontrolna skupina	-0,730*	-1,072 – -0,388	<0,001
	TCP-5% NaF	PDT	0,215	-0,127 – 0,557	0,211
		CHX	0,388*	0,046 – 0,730	0,027
		Kontrolna skupina	-0,342	-0,684 – 0,000	0,050
	Kontrolna skupina	PDT	0,557*	0,215 – 0,899	0,002
		CHX	0,730*	0,388 – 1,072	<0,001
		TCP-5% NaF	0,342	0,000 – 0,684	0,050
T3	PDT	CHX	0,149	-0,219 – 0,518	0,415
		TCP-5% NaF	-0,242	-0,610 – 0,126	0,191
		Kontrolna skupina	-0,545*	-0,913 – -0,177	0,005
	CHX	PDT	-0,149	-0,518 – 0,219	0,415
		TCP-5% NaF	-0,391*	-0,760 – -0,023	0,038
		Kontrolna skupina	-0,695*	-1,063 – -0,327	<0,001
	TCP-5% NaF	PDT	0,242	-0,126 – 0,610	0,191
		CHX	0,391*	0,023 – 0,760	0,038
		Kontrolna skupina	-0,303	-0,671 – 0,065	0,104
	Kontrolna skupina	PDT	0,545*	0,177 – 0,913	0,005
		CHX	0,695*	0,327 – 1,063	<0,001
		TCP-5% NaF	0,303	-0,065 – 0,671	0,104

* Srednja razlika je značajna na razini od 0,05

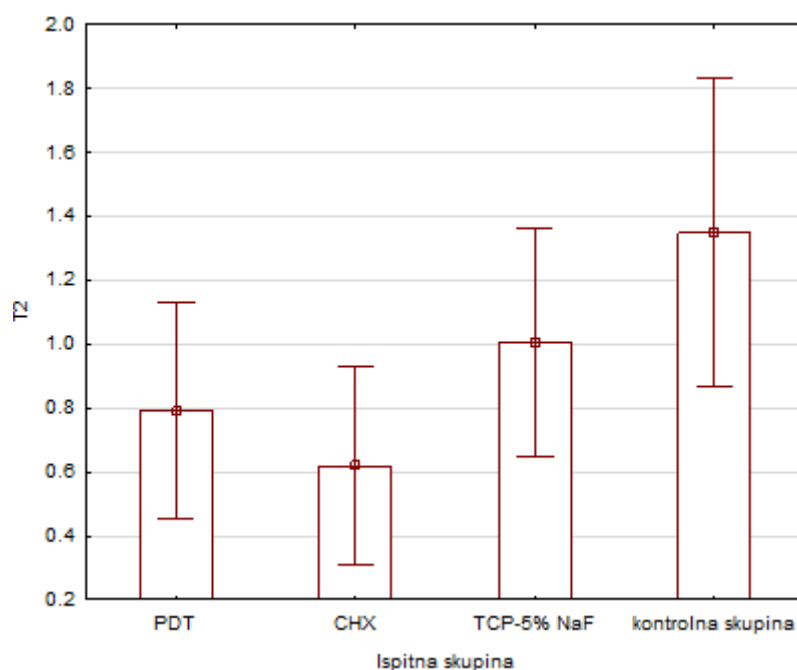
^b Prilagodba za višestruke usporedbe: najmanja značajna razlika (ekvivalentno bez prilagodbi)



Slika 7. Srednje vrijednosti indeksa plaka u ispitivanim skupinama u T1.

Interval između mjerenja u 6. i 12. tjednu (T1-T2)

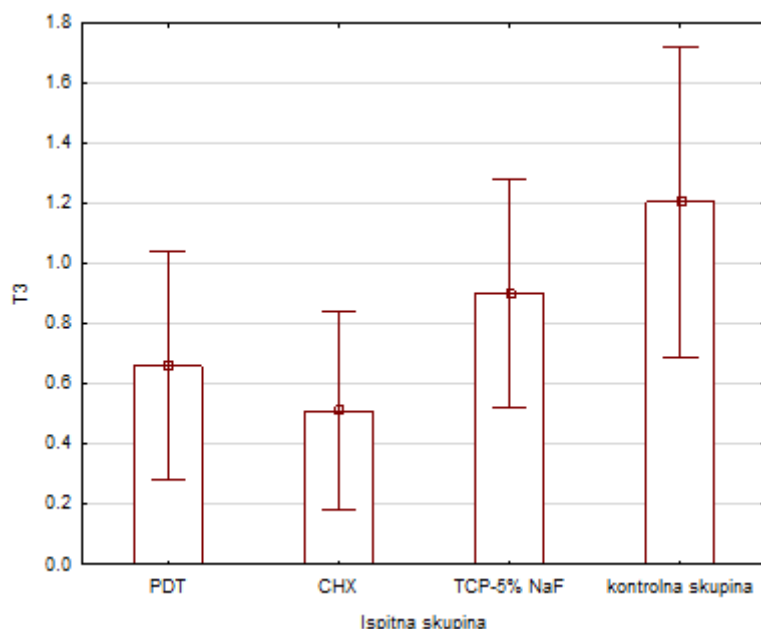
U PDT i CHX skupini, indeks plaka se smanjio od 6. (T1) do 12. tjedna (T2; $p = 0,375$, $p = 0,086$). U skupini ispitanika kojoj je nanesen TCP-5% NaF lak i kontrolnoj skupini, indeks je nastavio rasti ($p = 0,675$, $p = 0,104$). U T2 je srednja vrijednost indeksa u CHX skupini bila najniža, dok je u kontrolnoj skupini bila najviša ($p < 0,001$; slika 8). U PDT skupini zabilježene su značajno niže vrijednosti u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p = 0,002$). Indeks plaka je u CHX skupini također bio značajno niži nego u TCP-5% NaF ispitnoj grupi ($p = 0,027$). Indeks plaka se u TCP-5% NaF i kontrolnoj skupini nije značajno razlikovao u T2 ($p = 0,05$).



Slika 8. Srednje vrijednosti indeksa plaka u ispitivanim skupinama u T2.

Interval između mjerenja u 12. i 18. tjednu (T2-T3)

Promatrajući sve ispitne skupine, indeks plaka se smanjio od 12. (T2) do 18. tjedna (T3; $p = 0,014$). Finalna vrijednost indeksa je u PDT i CHX skupinama bila značajno niža od one u kontrolnoj skupini ($p = 0,005$; $p < 0,001$; slika 9). Indeks plaka je u TCP-5% NaF skupini bio značajno viši od onoga zabilježenog u CHX skupini ($p = 0,038$), dok se vrijednosti između TCP-5% NaF i kontrolne skupine nisu značajno razlikovale ($p = 0,104$).



Slika 9. Srednje vrijednosti indeksa plaka u ispitivanim skupinama u T3.

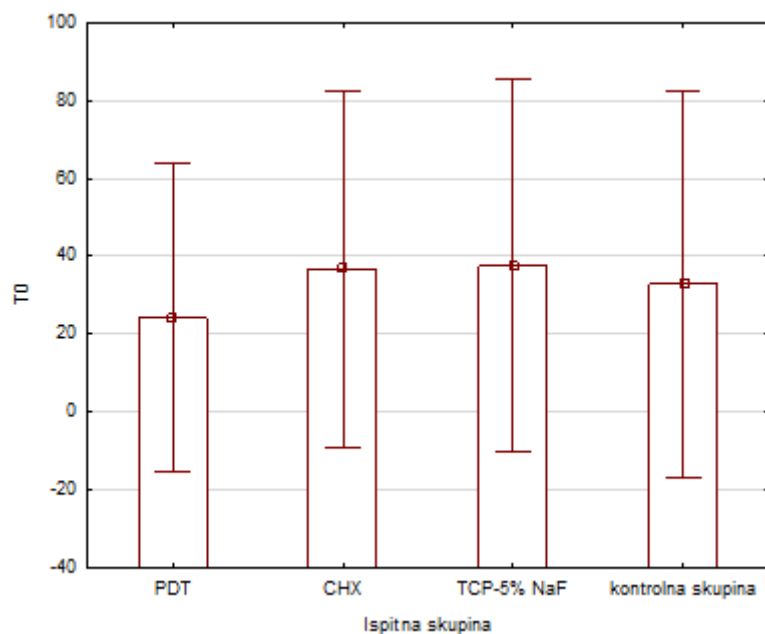
Interval između inicijalnih i završnih mjerenja (T0-T3)

Promatrajući sve ispitne skupine, vrijednosti indeksa plaka značajno su se promijenile tijekom razdoblja ispitivanja ($p < 0,001$). U CHX skupini zabilježena je redukcija, a u PDT skupini blagi porast ($p = 0,594$, $p = 0,172$). U TCP-5% NaF i kontrolnoj skupini zabilježen je značajni porast indeksa plaka između T0 i T3 ($p = 0,008$, $p = 0,005$).

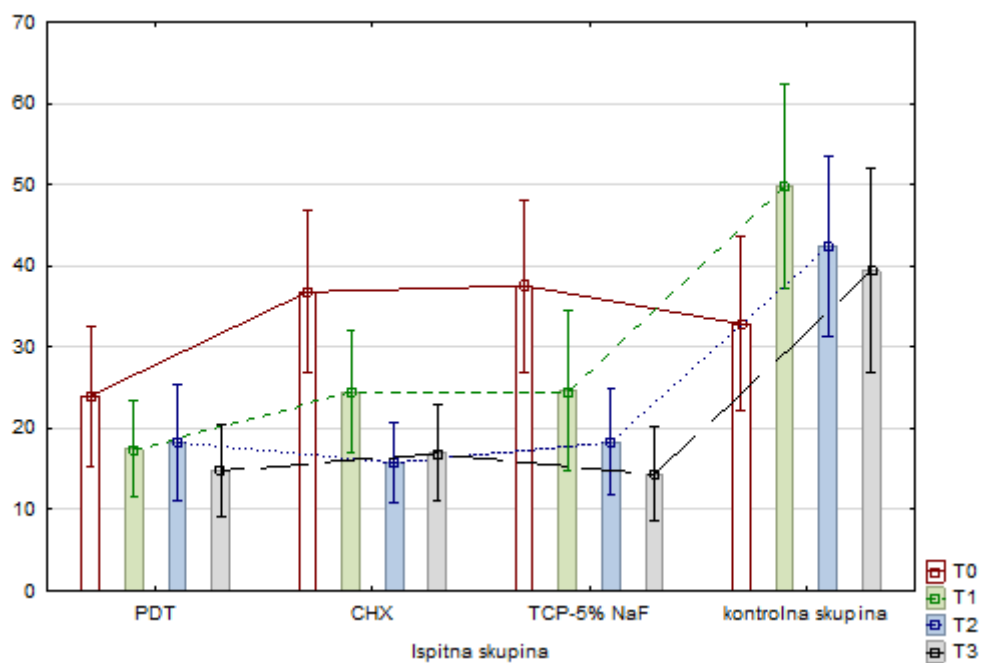
4.3. Utjecaj ispitivanih metoda na bakteriološki sastav supragingivnog plaka

Interval između inicijalnih mjerenja i mjerenja 6 tjedana kasnije (T0-T1)

U T0 se broj bakterijskih kolonija nije statistički značajno razlikovao između skupina ($p = 0,182$; slika 10). U svim skupinama, osim u negativnoj kontroli, CFU/ μ L se smanjio između T0 i T1. Jedino je u CHX skupini to smanjenje bilo značajno ($p = 0,007$; slika 11). U kontrolnoj skupini uočeno je značajno povećanje ukupnog broja bakterijskih kolonija ($p < 0,001$). 6 tjedana nakon početka studije, CFU/ μ L je u kontrolnoj skupini bio značajno viši nego u ostalim skupinama ($p < 0,001$; tablica 4, slika 12).



Slika 10. Srednje vrijednosti broja bakterijskih kolonija u ispitivanim skupinama u T0.



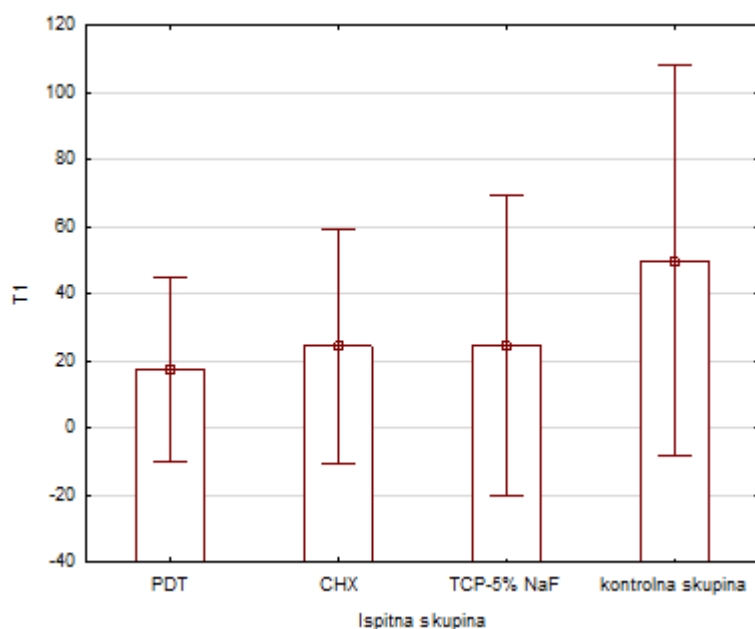
Slika 11. Srednje vrijednosti broja bakterijskih kolonija u ispitivanim skupinama u vremenskim intervalima.

Tablica 4. Usporedba parova ispitivanih skupina u različitim vremenskim točkama prikazana kao srednje razlike i intervali pouzdanosti za broj bakterijskih kolonija.

Točka mjerenja	Ispitna skupina	Ispitna skupina	Srednja razlika između skupina	Interval pouzdanosti (95%) za razliku ^b	p ^b
T0	PDT	CHX	-12,771	-26,788 – 1,246	0,074
		TCP-5% NaF	-13,901	-28,049 – 0,248	0,054
		Kontrolna skupina	-8,859	-22,793 – 5,075	0,212
	CHX	PDT	12,771	-1,246 – 26,788	0,074
		TCP-5% NaF	-1,129	-15,320 – 13,061	0,876
		Kontrolna skupina	3,913	-10,064 – 17,889	0,582
	TCP-5% NaF	PDT	13,901	-,248 – 28,049	0,054
		CHX	1,129	-13,061 – 15,320	0,876
		Kontrolna skupina	5,042	-9,066 – 19,150	0,483
	Kontrolna skupina	PDT	8,859	-5,075 – 22,793	0,212
		CHX	-3,913	-17,889 – 10,064	0,582
		TCP-5% NaF	-5,042	-19,150 – 9,066	0,483
T1	PDT	CHX	-7,090	-20,171 – 5,992	0,287
		TCP-5% NaF	-7,460	-20,664 – 5,745	0,267
		Kontrolna skupina	-32,383*	-45,387 – -19,379	<0,001
	CHX	PDT	7,090	-5,992 – 20,171	0,287
		TCP-5% NaF	-0,370	-13,613 – 12,873	0,956
		Kontrolna skupina	-25,293*	-38,337 – -12,250	<0,001
	TCP-5% NaF	PDT	7,460	-5,745 – 20,664	0,267
		CHX	0,370	-12,873 – 13,613	0,956
		Kontrolna skupina	-24,924*	-38,090 – -11,757	<0,001
	Kontrolna skupina	PDT	32,383*	19,379 – 45,387	<0,001
		CHX	25,293*	12,250 – 38,337	<0,001
		TCP-5% NaF	24,924*	11,757 – 38,090	<0,001
T2	PDT	CHX	2,383	-8,585 – 13,351	0,669
		TCP-5% NaF	-0,361	-11,432 – 10,710	0,949
		Kontrolna skupina	-24,174*	-35,077 – -13,271	<0,001
	CHX	PDT	-2,383	-13,351 – 8,585	0,669
		TCP-5% NaF	-2,744	-13,847 – 8,360	0,627
		Kontrolna skupina	-26,557*	-37,493 – -15,621	<0,001
	TCP-5% NaF	PDT	0,361	-10,710 – 11,432	0,949
		CHX	2,744	-8,360 – 13,847	0,627
		Kontrolna skupina	-23,813*	-34,853 – -12,774	<0,001
	Kontrolna skupina	PDT	24,174*	13,271 – 35,077	<0,001
		CHX	26,557*	15,621 – 37,493	<0,001
		TCP-5% NaF	23,813*	12,774 – 34,853	<0,001
T3	PDT	CHX	-2,118	-13,499 – 9,263	0,715
		TCP-5% NaF	0,210	-11,278 – 11,698	0,971
		Kontrolna skupina	-24,626*	-35,940 – -13,312	<0,001
	CHX	PDT	2,118	-9,263 – 13,499	0,715
		TCP-5% NaF	2,328	-9,194 – 13,850	0,691
		Kontrolna skupina	-22,508*	-33,856 – -11,160	<0,001
	TCP-5% NaF	PDT	-0,210	-11,698 – 11,278	0,971
		CHX	-2,328	-13,850 – 9,194	0,691
		Kontrolna skupina	-24,836*	-36,291 – -13,381	<0,001
	Kontrolna skupina	PDT	24,626*	13,312 – 35,940	<0,001
		CHX	22,508*	11,160 – 33,856	<0,001
		TCP-5% NaF	24,836*	13,381 – 36,291	<0,001

* Srednja razlika je značajna na razini od 0,05

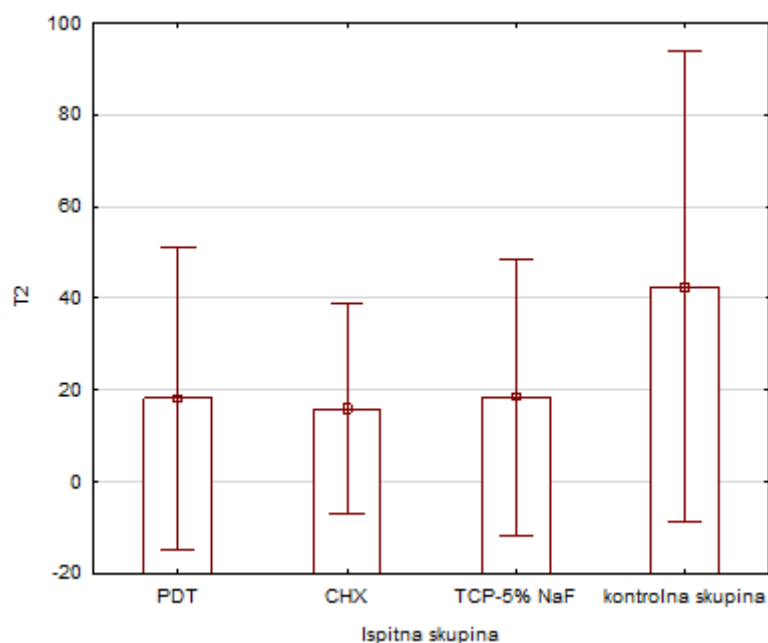
^b Prilagodba za višestruke usporedbe: najmanja značajna razlika (ekvivalentno bez prilagodbi)



Slika 12. Srednje vrijednosti broja bakterijskih kolonija u ispitivanim skupinama u T1.

Interval između mjerenja u 6. i 12. tjednu (T1-T2)

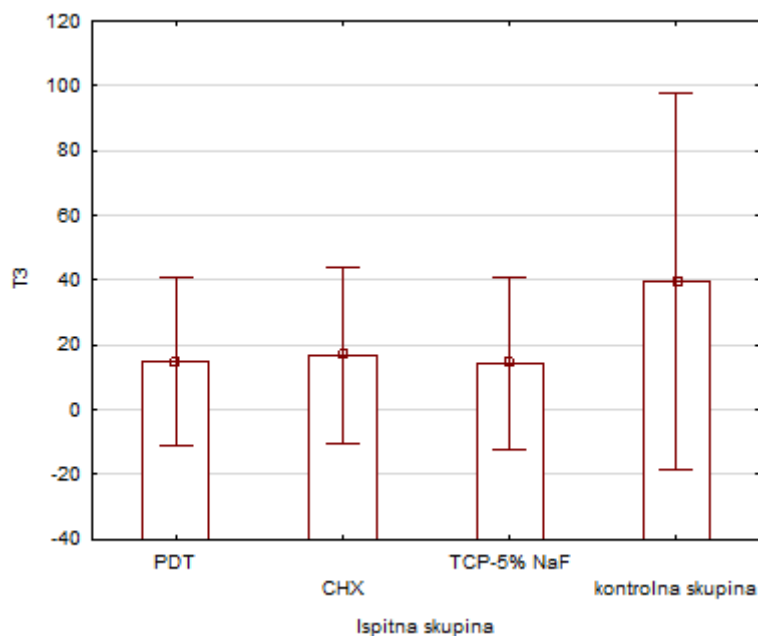
U CHX, TCP-5% NaF i kontrolnoj skupini, broj bakterijskih kolonija smanjio se od T1 do T2, međutim, značajno smanjenje primijećeno je samo u CHX skupini ($p = 0,029$). Neznatni porast broja bakterijskih kolonija zabilježen je u PDT skupini. U T2 u PDT, CHX i TCP-5% NaF skupinama, srednja vrijednost CFU/ μ L bila je značajno niža u usporedbi s onom zabilježenom u kontrolnoj skupini ($p < 0,001$; slika 13). Razlika između tri spomenute grupe nije bila značajna.



Slika 13. Srednje vrijednosti broja bakterijskih kolonija u ispitivanim skupinama u T2.

Interval između mjerenja u 12. i 18. tjednu (T2-T3)

Smanjenje ukupnog broja bakterija primijećeno je u PDT i TCP-5% NaF skupinama, ali bez statističke značajnosti. U CHX skupini je zabilježen blagi porast broja bakterijskih kolonija. U T3, srednja vrijednost CFU/ μ L u PDT, CHX i TCP-5% NaF skupinama bila je značajno niža od one zabilježene u kontrolnoj skupini ($p < 0,001$; slika 14). Finalni broj bakterijskih kolonija nije se značajno razlikovao između PDT, CHX i TCP-5% NaF ispitne grupe.



Slika 14. Srednje vrijednosti broja bakterijskih kolonija u ispitivanim skupinama u T3.

Interval između inicijalnih i završnih mjerenja (T0-T3)

U PDT, CHX i TCP-5% NaF skupinama, broj bakterijskih kolonija u supragingivnom plaku značajno se smanjio tijekom 18 tjedana trajanja studije (PDT: $p = 0,023$, CHX i TCP-5% NaF: $p < 0,001$). Neznačajno povećanje broja bakterijskih kolonija zabilježeno je u kontrolnoj skupini ($p = 0,235$).

TCP-5% NaF lak značajno je smanjio broj kolonija *V. parvule* i *F. nucleatum* tijekom 18 tjedana ispitnog razdoblja ($p = 0,028$, $p = 0,046$; tablica 5). Broj kolonija *V. parvule* također je bio značajno smanjen kod sudionika kojima je nanesen CHX lak ($p = 0,028$). Ostale bakterije u supragingivnom plaku nisu pokazale značajan rast ili pad tijekom razdoblja ispitivanja.

Tablica 5. Promjena broja bakterijskih kolonija (CFU/μL) u supragingivnom plaku od T0 do T3 u ispitivanim skupinama.

Ispitna skupina	Bakterija	T0 Medijan (CFU/ μ L)	IKR	T3 Medijan (CFU/ μ L)	IKR	p* (T0 – T3)
PDT	<i>S. sanguinis</i>	15,0	0 – 70,0	5,0	0 – 45,0	0,892
	<i>S. mitis oralis</i>	50,0	0 – 80,0	20,0	4,0 – 60,0	0,123
	<i>C. ochracea</i>	0	0 – 5,0	0	0 – 7,0	0,655
	<i>P. loescheii</i>	0	0 – 0	0	0 – 10,0	0,317
	<i>V. parvula</i>	22,5	7,5 – 37,5	12,5	2,5 – 25,0	0,233
	<i>A. naeslundii</i>	10,0	0 – 45,0	7,0	0 – 20,0	0,612
	<i>A. oris</i>	17,5	0 – 78,0	5,0	0 – 15,0	0,128
	<i>F. nucleatum</i>	0	0 – 15,0	0	0 – 10,0	0,753
	<i>F. canifelinum</i>	0	0 – 0	0	0 – 0	1,000
	<i>S. gordonii</i>	40,0	0 – 45,0	20,0	10,0 – 50,0	0,893
	<i>S. mutans</i>	0	0 – 0	5,0	0 – 10,0	0,317
	<i>P. melaninogenica</i>	0	0 – 22,5	0	0 – 0	0,317
	<i>P. species</i>	0	0 – 0	0	0 – 0	1,000
	<i>S. odontolytica</i>	0	0 – 17,5	0	0 – 0	0,317
	<i>P. nigrescens</i>	0	0 – 0	0	0 – 0	1,000
CHX	<i>S. mutans</i>	42,5	0 – 85,0	0	0 – 0	0,317
	<i>S. mitis oralis</i>	60,0	0 – 90,0	50,0	0 – 100,0	0,575
	<i>S. sanguinis</i>	75,0	0 – 85,0	0	0 – 70,0	0,141
	<i>F. canifelinum</i>	0	0 – 35,0	44,0	0 – 80,0	0,345
	<i>F. nucleatum</i>	10,0	0 – 39,0	0,0	0 – 50,0	0,310
	<i>V. parvula</i>	35,0	0 – 70,0	30,0	0 – 80,0	*0,028
	<i>A. oris</i>	15,0	0 – 46,0	30,0	0 – 130,0	0,107
	<i>A. naeslundii</i>	0	0 – 90,0	0	0 – 10,0	0,138
	<i>S. odontolytica</i>	0	0 – 25,0	30,0	10,0 – 30,0	0,893
	<i>S. gordonii</i>	0	0 – 0	0	0 – 50,0	0,317
	<i>P. species</i>	22,5	0 – 52,5	0	0 – 5,0	0,285
	<i>C. ochracea</i>	0	0 – 0	15,0	0 – 30,0	0,317
	<i>P. loescheii</i>	27,5	0 – 55,0	0	0 – 0	0,317
	<i>P. nigrescens</i>	0	0 – 65,0	0	0 – 0	0,317
	<i>P. melaninogenica</i>	0	0 – 0	10,0	0 – 30,0	0,180
TCP-5% NaF	<i>S. mitis oralis</i>	50,0	15,0 – 95,0	5,0	0 – 30,0	0,126
	<i>S. sanguinis</i>	15,0	0 – 90,0	0	0 – 0	0,138
	<i>S. odontolytica</i>	12,5	0 – 60,0	0	0 – 20,0	0,248
	<i>C. ochracea</i>	0	0 – 0	0	0 – 10,0	0,317
	<i>A. naeslundii</i>	17,5	0 – 76,0	0	0 – 0	0,109
	<i>A. oris</i>	0	0 – 101,5	25,0	0 – 65,0	0,686
	<i>F. nucleatum</i>	20,0	0 – 60,0	0	0 – 0	*0,046
	<i>P. nigrescens</i>	0	0 – 0	0	0 – 0	1,000
	<i>P. loescheii</i>	0	0 – 0	0	0 – 0	1,000
	<i>V. parvula</i>	55,0	40,0 – 120,0	0	0 – 30,0	*0,028
	<i>S. gordonii</i>	0	0 – 85,0	0	0 – 50,0	0,344
	<i>F. canifelinum</i>	35,0	15,0 – 60,0	30,0	0 – 40,0	0,500
	<i>S. mutans</i>	0	0 – 21,0	10,0	0 – 50,0	0,593
	<i>P. species</i>	0	0 – 0	20,0	20,0 – 20,0	0,317
	<i>P. melaninogenica</i>	0	0 – 0	0	0 – 0	1,000
Kontrolna skupina	<i>S. mitis oralis</i>	60,0	0 – 90,0	50,0	0 – 100,0	0,483
	<i>S. gordonii</i>	0	0 – 0	22,5	0 – 30,0	0,068
	<i>S. sanguinis</i>	75,0	0 – 85,0	0	0 – 70,0	0,176
	<i>C. ochracea</i>	0	0 – 75,0	0	0 – 20,0	0,655
	<i>A. naeslundii</i>	0	0 – 90,0	0	0 – 10,0	0,144
	<i>F. canifelinum</i>	0	0 – 35,0	44,0	0 – 80,0	0,248
	<i>P. loescheii</i>	0	0 – 22,5	29,0	7,5 – 61,5	0,465
	<i>V. parvula</i>	35,0	0 – 70,0	30,0	0 – 80,0	0,916
	<i>A. oris</i>	15,0	0 – 46,0	30,0	0 – 130,0	0,249
	<i>F. nucleatum</i>	10,0	0 – 39,0	0	0 – 50,0	0,674
	<i>P. species</i>	0	0 – 17,5	20,0	0 – 55,0	0,285
	<i>P. nigrescens</i>	0	0 – 65,0	15,0	10,0 – 100,0	0,248
	<i>S. odontolytica</i>	0	0 – 25,0	30,0	10,0 – 30,0	0,109

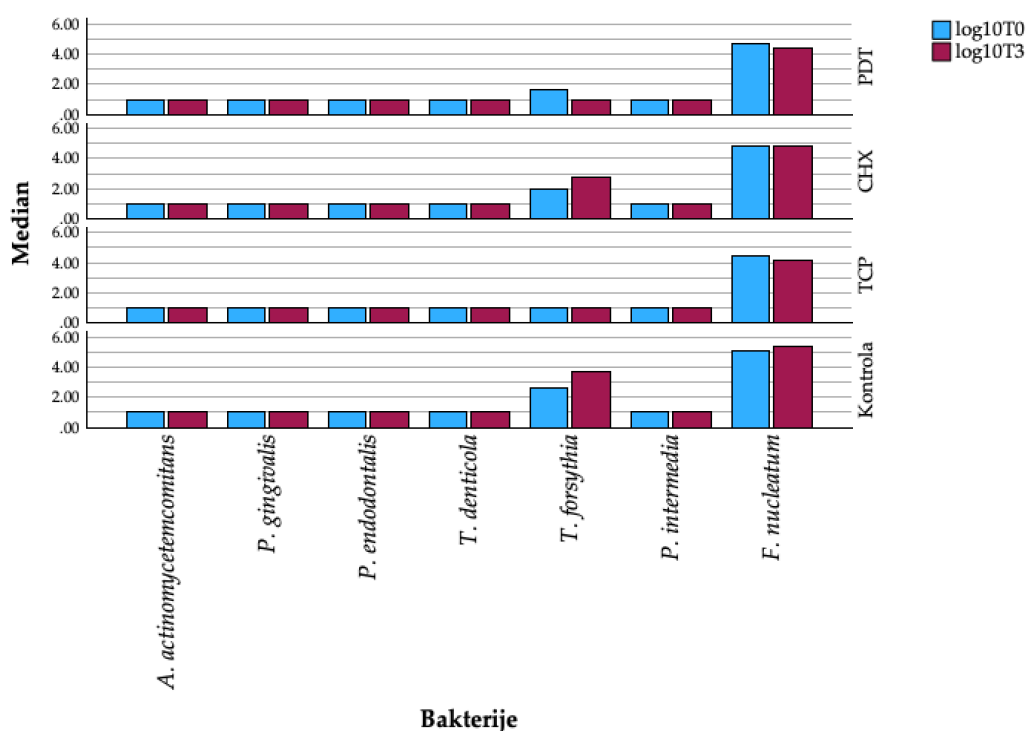
*Wilcoxonov test rangova

4.4. Utjecaj ispitivanih metoda na bakteriološki sastav subgingivnog plaka

U T0 je u 92,5 % ispitanika bila dokazana barem jedna od istraživanih bakterija.

U T3 je prevalencija pozitivnih ispitanika na barem jednu od istraživanih bakterija bila 100 %.

U fotodinamskoj skupini u T3, u četvero su ispitanika bile dijagnosticirane bakterije koje nisu bile dokazane u T0. U dvoje *F. nucleatum*, u jednog *T. forsythia* i u jednog *P. endodontalis*. U ovoj je skupini u 30% (n = 3) ispitanika bila eliminirana *T. forsythia* (p = 0,625). U prvih 18 tjedana fiksne ortodonske terapije zabilježena je neznčajna redukcija bakterije *F. nucleatum* u subgingivnom plaku (p = 0,799; slika 15).



Slika 15. Srednje vrijednosti logaritma broja subgingivnih bakterija u ispitivanim skupinama u T0 i T3.

U četvero ispitanika kojima je apliciran klorheksidinski lak, u T3 su dokazane bakterije koje nisu bile dijagnosticirane u T0. U troje se ispitanika tijekom trajanja studije pojavila *T. forsythia*, a u jednog *T. denticola*. U ovoj je skupini kod jednog ispitanika zabilježena eliminacija bakterije *T. forsythia* (p = 0,625). Uočen je neznčajan porast bakterije *T. forsythia* tijekom trajanja studije (p = 0,327).

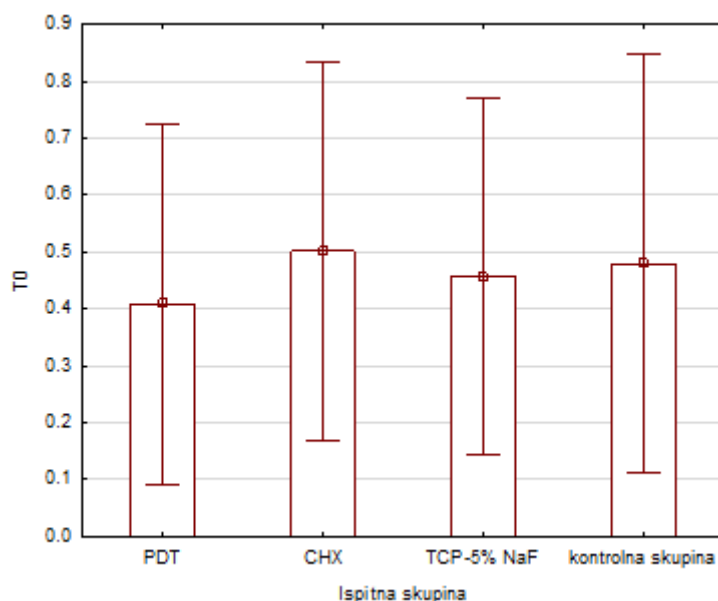
U TCP-5% NaF skupini također su se u 4 ispitanika pojavile nove bakterije. U troje ispitanika *T. forsythia* i u jednog *F. nucleatum*. U ovoj je skupini u dvoje ispitanika eliminirana *T. forsythia*. Tijekom prvih 18 tjedana fiksne ortodontske terapije statistički neznačajno se snizio broj bakterije *F. nucleatum* ($p = 0,646$).

U kontrolnoj su se skupini u dvoje ispitanika pojavile nove bakterije od T0 do T3. U jednog *T. forsythia*, a u drugog *T. denticola*. U ovoj skupini nije zabilježena eliminacija ni jedne bakterije u subgingivnom plaku. Tijekom trajanja studije u ovoj je grupi neznačajno porastao broj bakterija *T. forsythia* i *F. nucleatum* ($p = 0,263$, $p = 0,386$).

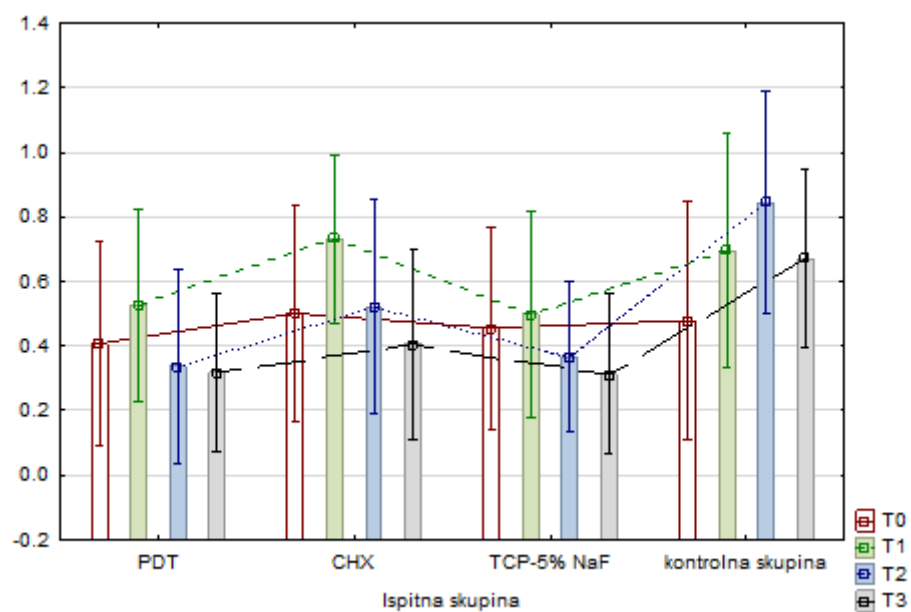
4.5. Utjecaj ispitivanih metoda na stanje gingive

Interval između inicijalnih mjerenja i mjerenja 6 tjedana kasnije (T0-T1)

U T0 vrijednosti gingivalnog indeksa nisu se značajno razlikovale između skupina ($p = 0,934$; slika 16). Promatrajući sve ispitne skupine od T0 do T1, indeks se značajno povećao ($p < 0,001$). Ovo povećanje bilo je značajno u CHX i kontrolnoj skupini ($p = 0,006$, $p = 0,02$; slika 17). U T1 razlika srednjih vrijednosti gingivalnih indeksa između skupina nije bila statistički značajna ($p = 0,254$; tablica 6, slika 18).



Slika 16. Srednje vrijednosti gingivalnog indeksa u ispitivanim skupinama u T0.



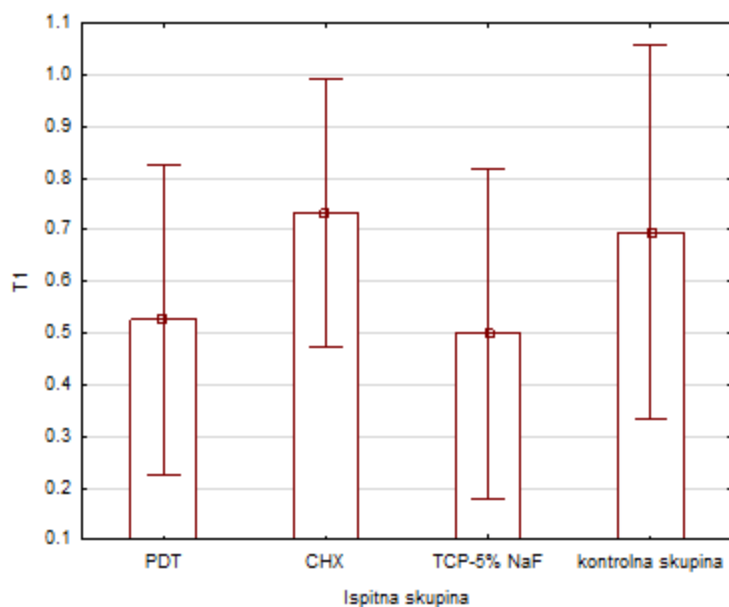
Slika 17. Srednje vrijednosti gingivalnog indeksa u ispitivanim skupinama u vremenskim intervalima.

Tablica 6. Usporedba parova ispitivanih skupina u različitim vremenskim točkama prikazana kao srednje razlike i intervali pouzdanosti za gingivalni indeks.

Točka mjerenja	Ispitna skupina	Ispitna skupina	Srednja razlika između skupina	Interval pouzdanosti (95%) za razliku ^b	p ^b
T0	PDT	CHX	-0,093	-0,395 – 0,209	0,537
		TCP-5% NaF	-0,048	-0,350 – 0,254	0,749
		Kontrolna skupina	-0,071	-0,373 – 0,231	0,637
	CHX	PDT	0,093	-0,209 – 0,395	0,537
		TCP-5% NaF	0,045	-0,257 – 0,347	0,765
		Kontrolna skupina	0,022	-0,280 – 0,324	0,884
	TCP-5% NaF	PDT	0,048	-0,254 – 0,350	0,749
		CHX	-0,045	-0,347 – 0,257	0,765
		Kontrolna skupina	-0,023	-0,325 – 0,279	0,878
	Kontrolna skupina	PDT	0,071	-0,231 – 0,373	0,637
		CHX	-0,022	-0,324 – 0,280	0,884
		TCP-5% NaF	0,023	-0,279 – 0,325	0,878
T1	PDT	CHX	-0,206	-0,489 – 0,077	0,149
		TCP-5% NaF	0,027	-0,256 – 0,310	0,848
		Kontrolna skupina	-0,169	-0,452 – 0,114	0,234
	CHX	PDT	0,206	-0,077 – 0,489	0,149
		TCP-5% NaF	0,233	-0,050 – 0,516	0,104
		Kontrolna skupina	0,037	-0,246 – 0,320	0,793
	TCP-5% NaF	PDT	-0,027	-0,310 – 0,256	0,848
		CHX	-0,233	-0,516 – 0,050	0,104
		Kontrolna skupina	-0,196	-0,479 – 0,087	0,169
	Kontrolna skupina	PDT	0,169	-0,114 – 0,452	0,234
		CHX	-0,037	-0,320 – 0,246	0,793
		TCP-5% NaF	0,196	-0,087 – 0,479	0,169
T2	PDT	CHX	-0,183	-0,460 – 0,094	0,189
		TCP-5% NaF	-0,029	-0,306 – 0,248	0,833
		Kontrolna skupina	-0,506*	-0,783 – -0,229	<0,001
	CHX	PDT	0,183	-0,094 – 0,460	0,189
		TCP-5% NaF	0,154	-0,123 – 0,431	0,267
		Kontrolna skupina	-0,323*	-0,600 – -0,046	0,024
	TCP-5% NaF	PDT	0,029	-0,248 – 0,306	0,833
		CHX	-0,154	-0,431 – 0,123	0,267
		Kontrolna skupina	-0,477*	-0,754 – -0,200	0,001
	Kontrolna skupina	PDT	0,506*	0,229 – 0,783	<0,001
		CHX	0,323*	0,046 – 0,600	0,024
		TCP-5% NaF	0,477*	0,200 – 0,754	0,001
T3	PDT	CHX	-0,088	-0,331 – 0,155	0,467
		TCP-5% NaF	0,006	-0,237 – 0,249	0,960
		Kontrolna skupina	-0,352*	-0,595 – -0,109	0,006
	CHX	PDT	0,088	-0,155 – 0,331	0,467
		TCP-5% NaF	0,094	-0,149 – 0,337	0,437
		Kontrolna skupina	-0,264*	-0,507 – -0,021	0,034
	TCP-5% NaF	PDT	-0,006	-0,249 – 0,237	0,960
		CHX	-0,094	-0,337 – 0,149	0,437
		Kontrolna skupina	-0,358*	-0,601 – 0,115	0,005
	Kontrolna skupina	PDT	0,352*	0,109 – 0,595	0,006
		CHX	0,264*	0,021 – 0,507	0,034
		TCP-5% NaF	0,358*	0,115 – 0,601	0,005

* Srednja razlika je značajna na razini od 0,05

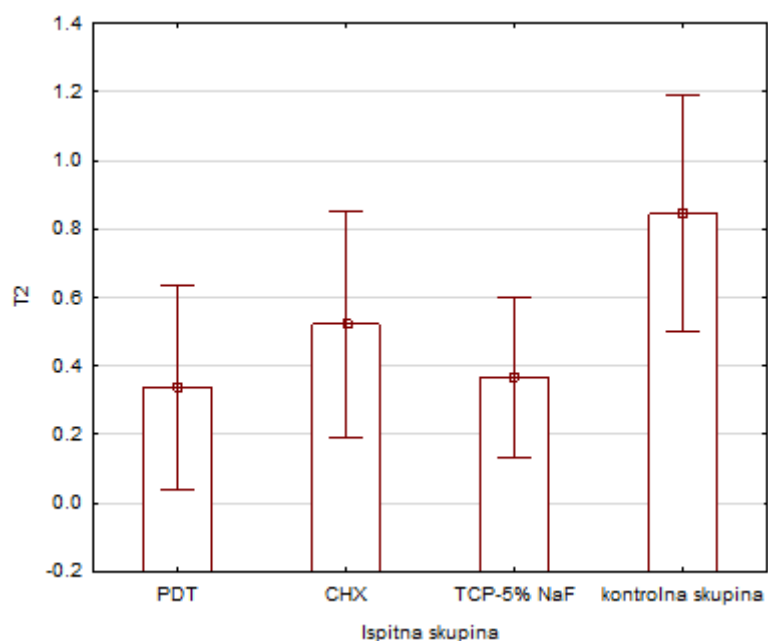
^b Prilagodba za višestruke usporedbe: najmanja značajna razlika (ekvivalentno bez prilagodbi)



Slika 18. Srednje vrijednosti gingivalnog indeksa u ispitivanim skupinama u T1.

Interval između mjerenja u 6. i 12. tjednu (T1-T2)

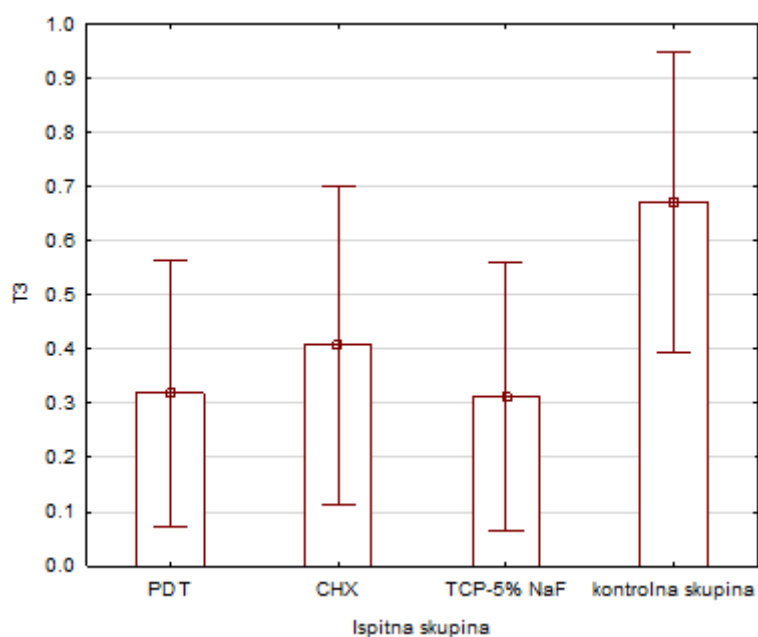
Između 6. (T1) i 12. tjedna (T2) gingivalni indeks se značajno povećao u kontrolnoj skupini ($p = 0,026$), dok se smanjio u svim ostalim testiranim grupama. Ovo smanjenje bilo je značajno u PDT skupini ($p = 0,016$). U T2 srednja vrijednost gingivalnog indeksa u kontrolnoj skupini bila je značajno viša nego u ostalim ispitnim skupinama (PDT: $p < 0,001$, CHX: $p = 0,024$, TCP-5% NaF: $p = 0,001$; slika 19), dok razlika između njih nije bila statistički značajna.



Slika 19. Srednje vrijednosti gingivalnog indeksa u ispitivanim skupinama u T2.

Interval između mjerenja u 12. i 18. tjednu (T2-T3)

Promatrajući sve ispitne skupine zajedno, gingivalni indeks se smanjio od 12. (T2) do 18. tjedna (T3; $p = 0,003$). U T3 je gingivalni indeks u PDT, CHX i TCP-5% NaF skupinama bio značajno niži u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p = 0,006$, $p = 0,034$, $p = 0,005$; slika 20).



Slika 20. Srednje vrijednosti gingivalnog indeksa u ispitivanim skupinama u T3.

Interval između inicijalnih i završnih mjerenja (T0-T3)

Od T0 do T3 uočeno je značajno povećanje gingivalnog indeksa u kontrolnoj skupini ($p = 0,016$). U svim drugim skupinama, primijećena je redukcija indeksa, no ona nije bila značajna.

4.6. Utjecaj ispitivanih metoda na razvoj inicijalnih karijesnih lezija

Prije početka fiksne ortodontske terapije inicijalne karijesne lezije dijagnosticirane su u 42,5% ispitanika. Ukupno je bilo dijagnosticirano 60 lezija na 1600 mjernih mjesta. Prosječan broj lezija po ispitaniku bio je 1,5. Nije bilo značajnih razlika između ispitnih skupina ($p = 0,775$).

U trenutku zadnjeg mjerenja prevalencija lezija također je bila 42,5%, dok je njihov ukupan broj bio 70. Prosječan broj lezija po pacijentu bio je 1,75. Razlika između ispitnih skupina nije bila značajna ($p = 0,109$).

U T0, od 400 mjernih mjesta po skupini, lezije nisu dijagnosticirane na 387 u PDT i TCP-5% NaF skupinama i 383 u CHX i kontrolnoj skupini. Promatrajući sve ispitne skupine zajedno, od T0 do T3, uočena je značajna razlika u distribuciji postojanja lezija unutar skupina ($p = 0,016$; tablica 7). U kontrolnoj se skupini ukupno pojavilo 9 novih lezija, a nijedna se nije povukla ($p = 0,008$). U CHX skupini nisu zabilježene nove lezije, a 2 postojeće lezije su se povukle ($p = 0,479$). U TCP 5% NaF grupi dijagnosticirane su 3 nove lezije ($p = 0,248$). U PDT skupini je ukupan broj lezija ostao isti u promatranom razdoblju.

Tablica 7. Distribucija postojanja lezija u ispitivanim skupinama u T0 i T3.

Ispitna skupina	T0	T3 Nema lezije	T3 Ima lezije	Ukupno	p*
PDT	Nema lezije	387 (100,00%)	0 (0,00%)	387	...
	Ima lezije	0 (0,00%)	13 (100,00%)	13	
	Ukupno	387	13	400	
CHX	Nema lezije	383 (100,00%)	0 (0,00%)	383	0,479
	Ima lezije	2 (11,76%)	15 (88,24%)	17	
	Ukupno	385	15	400	
TCP- 5% NaF	Nema lezije	384 (99,22%)	3 (0,78%)	387	0,248
	Ima lezije	0 (0,00%)	13 (100,00%)	13	
	Ukupno	384	16	400	
Kontrolna skupina	Nema lezije	374 (97,65%)	9 (2,35%)	383	0,008
	Ima lezije	0 (0,00%)	17 (100,00%)	17	
	Ukupno	374	26	400	

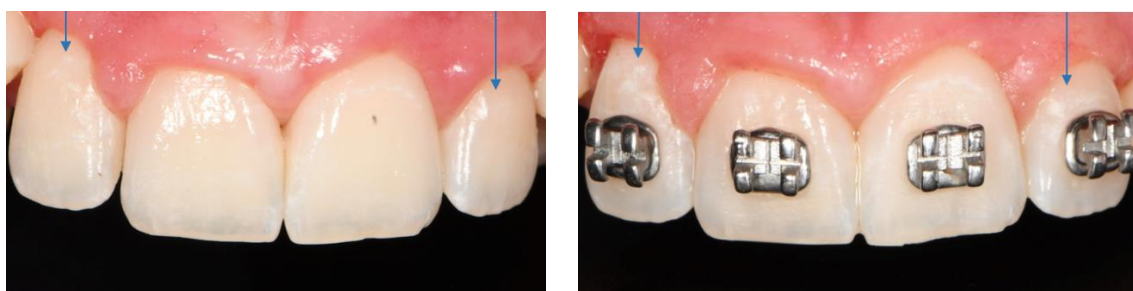
*usporedba unutar skupine, Fisherov egzaktni test, Hi-kvadrat test

Sveukupno, u T3 je zabilježena statistički značajna razlika između skupina ($p = 0,007$; tablica 8). Incidencija novih lezija bila je 15%. 5 od 6 ispitanika kojima su dijagnosticirane nove lezije bili su u kontrolnoj skupini. Veći broj novih lezija pojavio se u kontrolnoj skupini ($n = 9$) u usporedbi s TCP-5% NaF ($n = 3$) skupinom. 50% ispitanika iz kontrolne skupine razvilo je nove inicijalne karijesne lezije, dok su se one u TCP-5% NaF skupini pojavile u 10% ispitanika. Nove lezije nisu zabilježene u PDT i CHX skupini. 66,67% novih lezija dijagnosticirano je na prvom i drugom prekutnjaku.

Tablica 8. Distribucija inicijalnih karijesnih lezija po ispitivanim skupinama u T3.

Ispitna skupina	Nema lezije	Nove lezije	Uznappedovale lezije	Smanjene lezije	Remineralizirane lezije	Nepromijenjene lezije	Ukupno
PDT	387	0	2	0	0	11	400
Kolona %	25,33%	0,00%	10,53%	0,00%	0,00%	28,95%	
Red %	96,75%	0,00%	0,50%	0,00%	0,00%	2,75%	
CHX	383	0	7	1	2	7	400
Kolona %	25,07%	0,00%	36,84%	100,00%	100,00%	18,42%	
Red %	95,75%	0,00%	1,75%	0,25%	0,50%	1,75%	
TCP-5% NaF	384	3	5	0	0	8	400
Kolona %	25,13%	25,00%	26,32%	0,00%	0,00%	21,05%	
Red %	96,00%	0,75%	1,25%	0,00%	0,00%	2,00%	
Kontrolna skupina	374	9	5	0	0	12	400
Kolona %	24,48%	75,00%	26,32%	0,00%	0,00%	31,58%	
Red %	93,50%	2,25%	1,25%	0,00%	0,00%	3,00%	
Ukupno	1528	12	19	1	2	38	1600

20% ispitanika je u T3 imalo uznapredovale bijele mrlje. Najveći broj uznapredovalih mrlja dijagnosticiran je u CHX skupini, a najmanji u PDT skupini (slika 21). 73,7% ($n = 14$) uznapredovalih lezija dijagnosticirano je na prednjim zubima, većina njih ($n = 9$) na lateralnim incizivima.



Slika 21. a) Inicijalne karijesne lezije u T0 u PDT skupini; b) Uznappedovale inicijalne karijesne lezije u T3 u PDT skupini.

Lezije koje su se povukle, odnosno u potpunosti remineralizirale ($n = 2$) i smanjile ($n = 1$) dijagnosticirane su samo u CHX skupini.

Utvrđena je statistički značajna razlika u lokaciji lezija na bukalnim površinama zuba ($p < 0,001$; tablica 9). Nove lezije prvenstveno su se pojavile u mezijalnom (50%) i gingivalnom području zuba (41,67%) u odnosu na bravicu. Gotovo sve uznapredovale lezije (94,74%) dijagnosticirane su u gingivalnom dijelu zuba.

Tablica 9. Distribucija lezija na bukalnim površinama zuba u odnosu na bravicu u T3.

	T3 Nema lezije	T3 Nove lezije	T3 Uznapredovale lezije	T3 Smanjene lezije	T3 Remineralizirane lezije	T3 Nepromijenjene lezije	Ukupno
Distalno	398	1	0	0	0	1	400
Kolona %	26,05%	8,33%	0,0%	0,00%	0,00%	2,63%	
Gingivalno	350	5	18	1	2	24	400
Kolona %	22,91%	41,67%	94,74%	100,00%	100,00%	63,16%	
Mezijalno	388	6	1	0	0	5	400
Kolona %	25,39%	50,00%	5,26%	0,00%	0,00%	13,16%	
Okluzalno	392	0	0	0	0	8	400
Kolona %	26,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	21,05%	
Ukupno	1528	12	19	1	2	38	1600

Generalizirani linearni mješoviti model (GLMM) korišten je za procjenu grupiranja nastanka inicijalnih karijesnih lezija unutar ispitanika. Slučajni učinak ispitanika nije bio značajan (Wald $\chi^2 = 0,50$, $p = 0,479$), što ukazuje na minimalno grupiranje unutar subjekta. Grupni učinak ostao je u skladu s primarnom analizom, podupirući robusnost razlika između ispitivanih skupina.

5.1. Akumulacija dentobakterijskog plaka u fiksnoj ortodontskoj terapiji

Primarna svrha ovog istraživanja bila je odrediti utjecaj fotodinamske terapije na akumulaciju plaka u ortodontskih pacijenata te je usporediti s učinkom 1% klorheksidinskog laka i trikalcij fosfatnog laka s 5% natrijevim fluoridom.

U fotodinamskoj skupini, u 12. (T2) i 18. tjednu (T3) od početka istraživanja, indeks plaka bio je značajno niži nego u kontrolnoj skupini. Samo jedna primjena fotodinamske terapije nije značajno utjecala na akumulaciju plaka u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nakon dvije aplikacije, indeks plaka se u fotodinamskoj skupini počeo smanjivati, dok je u kontrolnoj skupini nastavio rasti. Stoga su za reduktivan učinak fotodinamske terapije na akumulaciju plaka potrebne barem dvije primjene tijekom dviju uzastopnih redovnih kontrola. Također, vrijednosti indeksa plaka u ovoj skupini nastavile su padati do 18. tjedna praćenja ispitanika (T3), kako je bilo zabilježeno i u skupini ispitanika kojoj je apliciran klorheksidinski lak. Ichinose-Tsuno i sur. (97) primijetili su da se postotak taloženja plaka na donjim prekutnjacima značajno smanjio nakon šest aplikacija toluidinskog modrila osvijetljenog LED svjetlom tijekom ukupno četiri dana. Gómez i sur. (82) i Abellan i sur. (81) također su zaključili da je fotodinamska terapija učinkovita u redukciji nakupljanja plaka samo nakon ponovljenih primjena. Što se tiče mehanizma redukcije akumulacije plaka, utvrđeno je da fotodinamska terapija usporava rast bakterija i smanjuje njihov kapacitet za potrošnju glukoze (77). Kombinacija baktericidnog učinka i usporavanja bakterijskog rasta mogu smanjiti taloženje plaka na površini zuba (77, 97).

Prema literaturnim podacima i trenutnim saznanjima, samo je jedna studija uspoređivala učinak fotodinamske terapije i klorheksidina na akumulaciju plaka (40). Klorheksidinski lak, placebo lak i fotodinamska terapija (kurkumin 1,5 mg/mL + plavo LED svjetlo) aplicirani su četiri puta tijekom četiri uzastopna tjedna na caklinu zuba oko bravica. Autori nisu primijetili značajne razlike u indeksu plaka između ispitivanih skupina tijekom svih vremenskih razdoblja, s iznimkom fotodinamske grupe, u kojoj je indeks plaka bio 1,52 nakon 3 mjeseca praćenja u usporedbi s 0,91 u klorheksidinskoj skupini i 1,03 u placebo skupini. Dakle, u fotodinamskoj skupini, indeks plaka je 3 mjeseca nakon početka istraživanja bio značajno viši nego u drugim testiranim grupama, čak i u placebo skupini. Stoga, suprotno rezultatima trenutne studije, fotodinamska terapija nije smanjila akumulaciju dentalnog biofilma. Takav rezultat može se objasniti organizacijom strukture biofilma jer fotodinamsko sredstvo i svjetlo ne mogu doprijeti do svih bakterijskih stanica (40). Ipak, mora se uzeti u obzir da su autori koristili drugu vrstu fotosenzitivnog sredstva i svjetla, kao i drugačije parametre svjetlosne zrake. Navedeno

vjerojatno utječe na učinkovitost fotodinamske terapije i objašnjava kontradiktorne rezultate njihove i trenutne studije.

Nadalje, Alshahrani i sur. (84) objavili su da nije primijećena značajna razlika u indeksu plaka u bilo kojem vremenskom razdoblju između skupine koja je podvrgnuta inicijalnoj parodontološkoj terapiji i dodatnoj fotodinamskoj terapiji i one koja je primila samo inicijalnu parodontološku terapiju. Stoga, fotodinamski tretman (metilensko modriilo 0,0005% + laser 670 nm) nije pridonio dodatnom smanjenju nakupljanja plaka. Unutar obje skupine primijećena je značajna redukcija akumulacije plaka tijekom razdoblja ispitivanja. Slični su rezultati objavljeni i u prethodnim studijama (83, 85-87). Međutim, potrebno je napomenuti da je u prethodno spomenutim istraživanjima fotodinamska terapija aplicirana u gingivalne sulkuse, a ne direktno na caklinu zuba oko bravica gdje se nakuplja plak, stoga mjesto aplikacije vjerojatno može utjecati na rezultate. Potrebno je također imati na umu da korištenje različitih fotosenzitivnih sredstava i njihove koncentracije te vrsta i parametara lasera/svjetla, i različita učestalost primjene terapije u raznim istraživanjima stvaraju poteškoće u usporedbi rezultata. Najveće povećanje indeksa plaka u svim skupinama primijećeno je tijekom prvih 6 tjedana fiksne ortodontske terapije i trajanja studije. Poznato je da je akumulacija plaka veća na elementima fiksnih ortodontskih naprava, stoga je ovaj porast očekivan (98). Rast indeksa plaka bio je statistički značajan kod ispitanika u svim ispitnim skupinama osim u onoj kojoj je apliciran Cervitec Plus lak (1% klorheksidin i 1% timol). U toj su skupini, u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom kojoj je bio apliciran TCP-5% NaF lak, vrijednosti indeksa plaka bile značajno niže 12 i 18 tjedana nakon početka istraživanja. Slične rezultate objavili su Alavi i sur. (99). Oni su također ortodontskim pacijentima aplicirali fluoridni lak i klorheksidinski gel ukupno 3 puta. Prvi puta prije postave fiksne ortodontske naprave, te zatim 3 i 6 mjeseci kasnije. Upotreba klorheksidina dovela je do značajne redukcije indeksa plaka u usporedbi s kontrolnom i placebo skupinom. Fluoridni lak je bio znatno više učinkovit u smanjenju nakupljanja plaka u usporedbi s kontrolom, iako razlika u odnosu na placebo skupinu nije bila značajna. Dakle, CHX gel je pokazao superiornu aktivnost u redukciji plaka u odnosu na fluoridni lak, kao što je bilo dokazano i u trenutnoj studiji (99). U T2, odnosno 3 mjeseca od početka istraživanja, indeks plaka se u klorheksidinskoj skupini smanjio i nastavio je padati do kraja trajanja studije. Finalne vrijednosti bile su neznajčajno niže u odnosu na početne, izmjerene u T0. U istraživanju Sehgal i sur. (27), u T2 (2 mjeseca nakon postave fiksne naprave), indeks plaka se u klorheksidinskoj skupini počeo smanjivati i nastavio je s tim trendom do kraja studije. Vrijednosti dobivene zadnjim mjerenjem bile su niže od inicijalnih i statistički su se razlikovale od onih u kontrolnoj skupini, kao i u trenutnom istraživanju (27).

U studiji Alavija i sur. (99) vrijednosti indeksa plaka u klorheksidinskoj skupini su se smanjivale u svim mjernim točkama, dok su završne vrijednosti bile značajno niže od početnih. U jednom je nedavnom istraživanju također objavljeno da klorheksidinski lak učinkovito kontrolira akumulaciju plaka kod pacijenata u fiksnoj ortodonskoj terapiji (100). Mehanizam inhibicije plaka poznat je desetljećima, stoga trenutni rezultati nisu iznenađujući (42, 43, 101). Tri su glavna mehanizma inhibicije plaka: klorheksidin smanjuje adsorpciju proteina na površinu zuba i tako smanjuje formiranje pelikule, veže se na bakterijske stanice u subletalnim količinama i taloži faktore aglutinacije u slini i istiskuje kalcij iz matriksa plaka (42). Dodatno, nakon aplikacije laka, zubna površina je glađa što otežava adheziju bakterija i ostalih komponenti biofilma (101).

U trenutnom istraživanju, TCP-5% NaF lak se pokazao kao najslabije sredstvo koje može kontrolirati akumulaciju plaka. Štoviše, njegov se učinak nije značajno razlikovao od onog zabilježenog u kontrolnoj skupini. Alavi i sur. (99 ref) objavili su slične rezultate. Kao što je već rečeno, u njihovoj studiji razlika između placebo skupine, negativne kontrole i fluoridne skupine (5% NaF) nije bila značajna, dok je CHX gel pokazao značajno bolji učinak u kontroli nakupljanja plaka. Nadalje, finalne vrijednosti indeksa plaka u fluoridnoj su skupini bile veće od inicijalnih, što je također uočeno u trenutnom istraživanju (99). Chiba i sur. (102) ispitanicima su aplicirali Duraphat lak (2,25% NaF) u jednoj posjeti, a 30 dana nakon aplikacije nije zabilježena statistički značajna redukcija indeksa plaka. Zickert i Emilson (103) također su objavili da lokalna primjena laka koji sadrži fluorid nije imala značajan učinak na nakupljanje dentalnog plaka nekoliko tjedana nakon aplikacije te razlika između te i kontrolne skupine nije bila uočena. S druge pak strane, u jednoj je studiji upotreba konvencionalnog fluoridnog laka dovela do značajne redukcije indeksa plaka nakon samo jedne aplikacije (104). Autori preporučuju reaplikaciju laka svaka 3 mjeseca kako bi kontrola akumulacije plaka bila uspješna. Dokazano je i da fluoridni lakovi dovode do smanjene adhezije *S. mutans* na dentalni biofilm, međutim taj učinak značajno ovisi o koncentraciji otpuštenih fluorida (63). Točan mehanizam smanjene adhezije nije istražen, ali se smatra da on nastaje zbog reducirajućeg efekta fluorida na bakterijski rast (63). Bitno je napomenuti da smanjena adhezija bakterija na dentalni biofilm ne mora nužno značiti i smanjenu akumulaciju plaka na caklinu zuba.

Prema dosadašnjim saznanjima i literaturnim podacima, ovo je prva studija koja uspoređuje učinak fotodinamske terapije i fluoridnog laka na akumulaciju plaka.

U ovoj studiji, indeks plaka se u kontrolnoj skupini značajno povećao tijekom prvih 6 tjedana fiksne ortodonske terapije i trajanja istraživanja. Rast je nastavljen i u T2 (3 mjeseca nakon

lijepljenja bravica), a zatim se u T3 (4,5 mjeseci praćenja) indeks plaka počeo smanjivati, međutim finalne vrijednosti su i dalje bile značajno više od početnih. Sehgal i sur. (27) također su objavili da se indeks plaka u kontrolnoj skupini povećavao tijekom prva 3 mjeseca fiksne ortodontske terapije, a zatim se počeo smanjivati. U istraživanju Paschosa i sur. (100) indeks plaka se u kontrolnoj skupini počeo smanjivati na kraju 3. mjeseca od početka terapije te su također finalne vrijednosti indeksa plaka bile više od inicijalnih, kao što je dokazano i u ovoj studiji. Slični rezultati dobiveni su i jednom ranijem istraživanju (8). Trenutni rezultati i rezultati prethodnih studija mogu se objasniti činjenicom da u svih ortodontskih pacijenata dolazi do pojačane akumulacije plaka tijekom prvih nekoliko mjeseci terapije zbog razdoblja prilagodbe na održavanje oralne higijene. Naime, u početku su pacijenti manje vješti u četkanju zuba i korištenju interdentalnih četkica oko komponenata fiksnih naprava, a nakon nekoliko mjeseci prilagodbe postaju manualno spretniji u uklanjanju nakupljenih naslaga (105). Zaključno, u fotodinamskoj i klorheksidinskoj skupini, indeks plaka počeo se smanjivati 12 tjedana nakon početka istraživanja (T2). Nasuprot tome, u TCP-5% NaF i kontrolnoj skupini, vrijednosti indeksa plaka počele su se smanjivati kasnije, odnosno nakon 18 tjedana (T3). Dakle, i fotodinamska terapija i klorheksidinski lak pokazali su veću učinkovitost u smanjenju akumulacije plaka od trikalcij fosfatnog laka s 5% NaF. U tim je skupinama zabilježen raniji pad indeksa tijekom ispitnog razdoblja

.

5.2. Bakteriološki sastav supragingivnog plaka u fiksnoj ortodontskoj terapiji

Primarna svrha ovog istraživanja također je bila odrediti kako fotodinamska terapija u usporedbi s do sada poznatim antimikrobnim metodama utječe na bakteriološki sastav supragingivnog plaka.

Ukupni broj bakterijskih kolonija se tijekom 18 tjedana trajanja istraživanja statistički značajno smanjio u fotodinamskoj skupini. 6 (T1), 12 (T2) i 18 tjedana (T3) nakon početka istraživanja, broj bakterijskih kolonija u toj je skupini bio značajno niži u usporedbi s kontrolnom skupinom. Štoviše, u kontrolnoj je skupini primijećeno značajno povećanje ukupnog broja kolonija tijekom prvih 6 tjedana trajanja studije. Dakle, fotodinamska terapija značajno reducira broj bakterija u supragingivnom plaku u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Prema literaturnim podacima i trenutnim saznanjima, samo su dvije studije istraživale utjecaj fotodinamske terapije na bakteriološki sastav supragingivnog plaka. U istraživanju Soaresa i sur. (88), kombinacija metilenskog i toluidinskog modrila osvijetljenog crvenim LED svjetlom također je dovela do značajne redukcije ukupnog broja kolonija u supragingivnom plaku, kao

što je zabilježeno i u ovoj studiji. Međutim, važno je napomenuti da su uzorci biofilma za analizu uzimani odmah nakon primjene fotodinamske terapije, stoga rezultati ne mogu biti u potpunosti usporedivi s trenutnima. Ichinose-Tsuno i sur. (97) aplicirali su toluidinsko modriilo na caklinu donjih prekutnjaka te ga zatim osvijetlili LED svjetlom. Fotodinamska terapija ukupno je nanjena 6 puta tijekom 3 uzastopna dana, dakle dva puta dnevno. Autori su uočili značajno smanjenje broja bakterijskih kolonija u toj skupini ispitanika, dok redukcija u kontrolnoj skupini nije bila uočena. Dakle, rezultati spomenute studije odgovaraju rezultatima trenutnog istraživanja (97).

Najčešće dokazane bakterije supragingivnog plaka u ispitanika u ovom istraživanju uglavnom su streptokoki (*S. mitis oralis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *Peptostreptococcus micros*) i aktinomicete (*A. oris*, *A. naeslundii*, *A. johnsonii*, *A. israeli*). Streptokoki su bakterije plavog kompleksa, a aktinomicete žutog, i one nisu povezane s povećanom dubinom džepova (106, 107). Međutim, neke od tih bakterija su povezane s razvojem karijesa (*S. sanguinis*, *Peptostreptococcus micros* i *A. Israeli* (108)). Također, bakterije žutog i plavog kompleksa uglavnom su Gram-pozitivne (108). Dokazano je da su Gram-pozitivne bakterije zbog svoje građe puno osjetljivije na djelovanje fotodinamske terapije od Gram-negativnih. Njihova je membrana okružena poroznim slojem peptidoglikana koji se ne ponaša kao barijera, stoga fotosenzitivno sredstvo lako može prodrijeti kroz njega. S druge strane, Gram-negativne bakterije oko tankog sloja peptidoglikana imaju vanjsku lipidnu ovojnica koja služi kao barijera pa fotosenzitivno sredstvo teže prolazi kroz nju (77). Kako se u supragingivnom plaku uglavnom nalaze Gram-pozitivne bakterije, logično je pretpostavljati da će fotodinamska terapija biti učinkovita u njihovoj redukciji, što je dokazano i u ovom istraživanju. Na neke bakterije fotodinamska terapija djeluje baktericidno, a one koje prežive tretman pokazuju modificiran i usporen rast (77).

U klorheksidinskoj skupini redukcija ukupnog broja bakterija također je bila značajna tijekom 18 tjedana trajanja studije. Najveća redukcija zabilježena je tijekom prvih 6 tjedana, što znači da je samo jedna aplikacija Cervitec Plus laka dovoljna za značajan antibakterijski učinak. Manikandan i suradnici (109) također su objavili da se ukupni CFU bakterija u supragingivnom biofilmu značajno smanjio nakon jedne primjene Cervitec laka. Eronat i sur. (110) su ortodontskim pacijentima jednom aplicirali CHX lak i zabilježili statistički značajnu redukciju *S. mutansa* u slini mjesec dana nakon aplikacije. Također je jedna ranija studija zaključila da je jedna aplikacija laka dovoljna za smanjenje kariogenih bakterija u supragingivnom plaku (39). Dokazano je da klorheksidinski lak inhibira rast više od 99% bakterijskih vrsta izoliranih iz dentalnog biofilma (36). Mnoga su dosadašnja istraživanja pokazala učinkovitost

klorheksidina, zbog čega je proglašen zlatnim standardom antibakterijskog djelovanja (36, 38, 39, 109, 110). Dokazano je da klorheksidin učinkovito djeluje na streptokoke i aktinomicete, a to su ujedno i najbrojniji bakterijski rodovi koji su pronađeni u plaku ispitanika trenutnog istraživanja, tako da rezultati nisu iznenađujući (40). Bitno je napomenuti da je i timol, osim klorheksidina, aktivni sastojak Cervitec Plus laka korištenog u ovoj studiji. Timol je također antiseptik širokog spektra djelovanja, djeluje na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te potpomaže adheziju klorheksidina na površinu zuba (111). Također je dokazano da je produljeno otpuštanje aktivnih antimikrobnih tvari kada se koristi kombinacija klorheksidina i timola, nego kada se koristi samo klorheksidinski lak (111). Dakle, klorheksidin i timol sinergističkim djelovanjem uspješno i značajno reduciraju broj bakterijskih kolonija (100).

Shafae i sur. (31) objavili su da je fotodinamska terapija usporediva s konvencionalnim metodama u smanjenju broja bakterija u dentalnom biofilmu, što odgovara trenutnim rezultatima. Prema dosadašnjim saznanjima, samo je nekoliko studija uspoređivalo antibakterijski učinak fotodinamske terapije i klorheksidina (86, 112). Jedna prethodna *in vitro* studija pokazala je da nema statistički značajne razlike u antimikrobnom učinku između fotodinamske terapije (riboflavin + plavo LED svjetlo) i 0,2% klorheksidina. Oba su agensa dovela do značajne redukcije broja kariogenih bakterija nakupljenih oko ortodontskih bravica. Stoga su oba bila jednako učinkovita u liječenju tih Gram-pozitivnih oralnih patogena (113). Također, Panhóca i sur. (112) pokazali su da su i fotodinamska terapija (kurkumin + natrijev dodecil sulfat + plavo LED svjetlo) i ispiranje usta klorheksidinom odmah nakon jedne primjene doveli do značajnog smanjenja broja *S. mutansa* u slini bez statistički značajne razlike između ta dva sredstva. Rezultati trenutne studije također su pokazali slično antibakterijsko djelovanje. I u fotodinamskoj i u klorheksidinskoj skupini uočena je statistički značajna redukcija broja bakterija tijekom ispitnog razdoblja.

Učinak TCP- 5% NaF laka bio je sličan učinku fotodinamske terapije i klorheksidinskog laka. U toj je skupini također zabilježena statistički značajna redukcija broja bakterijskih kolonija od T0 do T3. Najveće smanjenje zabilježeno je tijekom prvih 6 tjedana trajanja studije. Štoviše, broj bakterijskih kolonija u svim mjernim točkama tijekom 18 tjedana trajanja istraživanja bio je značajno niži nego u kontrolnoj skupini. Trenutni rezultati nisu iznenađujući jer je dobro poznato da fluoridi inhibiraju različite bakterijske enzime poput enolaze, kisele fosfataze, pirofosfataze, peroksidaze i katalaze te inhibiraju rast i smanjuju bakterijsku kolonizaciju biofilma (63, 64, 114). Ranije je dokazano da fluoridni lakovi značajno reduciraju broj kolonija *S. mutansa* u supragingivnom biofilmu (33). Erkmen i sur. (66) objavili su da je primjena trikalcij fosfatnog laka dovela do značajne redukcije broja kariogenih bakterija u plaku. Ta je

redukcija bila veća od one primijećene u skupini kojoj je apliciran konvencionalni 5% NaF i kazein fosfopeptidni lak (66). Osim fluorida, Clinpro lak korišten u ovoj studiji u svom sastavu ima kalcijeve i fosfatne ione. Efikasan antibakterijski učinak se osim fluoridnim ionima može pripisati prisutnošću iona kalcija koji pridonose visokom alkalnom pH (66). Clinpro lak pokazuje veću antibakterijsku aktivnost od konvencionalnih lakova zbog povećane bioraspoloživosti fluorida (115). Prema literaturnim podacima i trenutnim saznanjima, trenutačno ne postoje istraživanja koja uspoređuju antimikrobnu učinkovitost fotodinamske terapije i fluoridnih lakova.

Samo je u kontrolnoj skupini u ovom istraživanju broj bakterijskih kolonija porastao između T0 i T1. Također je važno spomenuti da je CFU u kontrolnoj skupini počeo opadati 3 mjeseca nakon lijepljenja bravica i početka studije (T2). Međutim, konačni broj kolonija je ipak bio viši od inicijalnog. Ovo povećanje tijekom prvih 6 tjedana bilo je očekivano i povezano je s promjenom oralnog mikrobioma (116). Zabilježeno je da se maksimalne razine mikrobnih parametara opažaju 3 mjeseca nakon početka fiksne ortodonske terapije, a zatim se počinju smanjivati (117). Do porasta razine broja bakterija dolazi zbog dijelova fiksne ortodonske naprave koji dovode do pojačane akumulacije plaka i dodatno otežavaju održavanje oralne higijene. Pad razine mikrobnih parametara može se pripisati poboljšanju dentalne higijene i ponovnom uspostavljanju imunološke ravnoteže između domaćina i mikroorganizama (117). Štoviše, Guo i suradnici (118) izvijestili su da se povećanje supragingivalnih kariogenih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija, pretežno streptokoka i aktinomiceta, događa tijekom prvih tjedana i mjeseci ortodonske terapije. Tri mjeseca kasnije njihov se udio smanjuje, što je pokazalo i ovo istraživanje, jer se povećava broj dominantno subgingivalnih anaerobnih bakterija narančastog kompleksa (118).

Osim utjecaja istraživanih sredstava na ukupni broj bakterijskih kolonija u supragingivnom plaku, svrha studije bila je evaluirati i utjecaj na pojedine bakterije u plaku. Aplikacija TCP-5% NaF laka dovela je do značajne redukcije *V. parvule* i *F. nucleatum* tijekom 18 tjedana trajanja studije. *V. parvula* je Gram-negativni anaerobni kok koji u interakciji sa *S. mutans*-om može pridonijeti razvoju karijesa (119). Dodatno, djelujući kao poveznica između nekoliko bakterija, uključujući *F. nucleatum* i *S. gordonii*, *V. parvula* proizvodi hranjive tvari potrebne parodontnim patogenima za preživljavanje i razmnožavanje (120). *F. nucleatum* bakterija je narančastog kompleksa, što znači da potiče kolonizaciju bakterija crvenog kompleksa, glavnih parodontnih patogena. Njihova prisutnost povezana je s povećanim dubinama džepova (120). Raangs i sur. (121) također su u svojoj studiji objavili da sredstvo za ispiranje usta na bazi kositrenog fluorida reducira broj bakterije *F. nucleatum*. Takve su rezultate objavili i Sari i sur.

(122). Štoviše, dokazano je da su bioaktivni materijali koji otpuštaju fluorida značajno učinkoviti protiv *F. nucleatum* i *V. parvule*, što odgovara rezultatima trenutne studije (123). Klorheksidinski lak također je uzrokovao redukciju broja kolonija *V. parvule* tijekom razdoblja ispitivanja. Prethodne studije također su dokazale osjetljivost spomenute bakterije na klorheksidin i pokazale da je rast ove bakterije znatno manji kada je izložena tom agensu (124, 125).

Dakle, ukupno promatrajući sva tri ispitivana sredstva, može se zaključiti da su ona učinkovita u redukciji broja bakterija u supragingivnom plaku. I fotodinamska terapija, CHX lak i TCP-5% NaF lak pokazali su značajnu antibakterijsku aktivnost tijekom prvih 18 tjedana fiksne ortodonske terapije, koja nije bila uočena u kontrolnoj skupini.

5.3. Bakteriološki sastav subgingivnog plaka u fiksnoj ortodonskoj terapiji

Promjena bakteriološkog sastava subgingivnog plaka nakon tri aplikacije fotodinamske terapije svakih 6 tjedana u ortodontskih pacijenata bila je sekundarna mjera ishoda ovog istraživanja. Odnosno, svrha ove studije bila je istražiti učinak fotodinamske terapije na broj subgingivnih bakterija kod pacijenata u fiksnoj ortodonskoj terapiji te ga usporediti s učinkom 1% klorheksidinskog i trikalcij fosfatnog laka s 5% natrijevim fluoridom.

U fotodinamskoj, klorheksidinskoj i trikalcij fosfatnoj skupini, jedina bakterija koja je potpuno iskorijenjena kod nekih ispitanika tijekom razdoblja ispitivanja bila je *T. forsythia*. *T. forsythia* bakterija je crvenog kompleksa koja uzrokuje progresivni parodontitis (106).

U fotodinamskoj skupini ova je bakterija eliminirana kod troje ispitanika, što je najviši nalaz u usporedbi s ostalim testiranim skupinama. Dakle, antibakterijski učinak toluidinskog modrila i lasera valne duljine 660 nm doveo je do eliminacije spomenute bakterije u 30% ispitanika. S druge strane, u kontrolnoj skupini ni jedna bakterija nije bila eliminirana. Neka prijašnja istraživanja također su dokazala osjetljivost spomenute bakterije na fotodinamsku terapiju (126, 127). Brinar i sur. (126) objavili su da se broj pozitivnih mjesta na bakteriju *T. forsythia* značajno smanjio 3 mjeseca nakon aplikacije adjuvantne fotodinamske terapije uz supragingivno i subgingivno struganje i poliranje površine korijena. Ispitanici su tretirani metilenskim modrilom apliciranim u parodontne džepove koje je zatim bilo osvjetljeno laserom valne duljine 680 nm (126). Također su rezultati jednog recentnog istraživanja pokazali da se broj pozitivnih mjesta na spomenutu bakteriju značajno smanjio 80. i 180. dan praćenja sudionika kojima je aplicirana fotodinamska terapija, za razliku od skupine koja je bila podvrgnuta struganju i poliranju površine korijena. Kombinacija toluidinskog modrila i lasera je iskorijenila *T. forsythiu* kod nekih ispitanika, što je pokazalo i ovo istraživanje (127).

S obzirom da broj ove bakterije nije bio povišen u fotodinamskoj skupini ispitanika 18 tjedana nakon početka fiksne ortodonske terapije, i to je jedina bakterija koja je bila eliminirana unutar skupine, može se zaključiti da je takav oblik terapije imao pozitivan antibakterijski učinak na nju.

U trenutnoj je studiji uočen porast bakterije *T. forsythia* u skupini ispitanika kojima je apliciran klorheksidinski lak te u kontrolnoj skupini, međutim taj je porast u obje skupine bio neznačajan. Autori nekoliko prethodnih istraživanja objavili su da se tri mjeseca nakon početka fiksne ortodonske terapije primjećuje značajan porast spomenute bakterije u subgingivnom plaku (118, 128-131).

Tijekom 18 tjedana trajanja studije, broj bakterije *F. nucleatum* u subgingivnom plaku neznačajno se povećao kod ispitanika u kontrolnoj skupini. *F. nucleatum* je fakultativni anaerob i spada u skupinu bakterija narančastog kompleksa. Kolonizacija i proliferacija bakterija narančastog kompleksa događa se prije kolonizacije bakterija crvenog kompleksa, najpatogenijih parodontnih bakterija. Mikroorganizmi iz oba kompleksa surađuju i ovisni su jedni o drugima (106). Dokazano je da se broj bakterije *F. nucleatum* počinje progresivno povećavati već u prvim tjednima fiksne ortodonske terapije i to povećanje traje nekoliko mjeseci nakon postave fiksne ortodonske naprave (7, 129, 132, 133, 134). U skupini ispitanika kojima je apliciran TCP-5% NaF lak uočena je statistički neznačajna redukcija spomenute bakterije u subgingivnom plaku. Neka prethodna istraživanja također su dokazala osjetljivost te bakterije na fluoride. U studiji Fernández i sur. (135), primjena paste za zube s natrijevim i kositrenim fluoridom značajno je smanjila broj *F. nucleatum* u *in vitro* modelu biofilma (135). Tanaka i sur. (123) objavili su da su bioaktivni materijali koji otpuštaju fluoride značajno smanjili broj bakterije *F. nucleatum* reducirajući njen rast u umjetno formiranom multibakterijskom biofilmu. Mikrobiološki podaci pokazuju da fluor djeluje antibakterijski kroz različite mehanizme, uključujući inhibiciju glikolitičkog enzima enolaze i ATPaze, a također bi mogao biti povezan s interferencijom s drugim unutarstaničnim enzimima ili onima koji su bitni za vitalitet biofilma kao što su kisela fosfataza, pirofosfataza, peroksidaza i katalaza (136).

Kao i u TCP-5% NaF skupini, u fotodinamskoj je također zabilježena neznačajna redukcija spomenute bakterije tijekom prvih 18 tjedana fiksne ortodonske terapije. Međutim, u dvoje se ispitanika ta bakterija pojavila tijekom ispitnog razdoblja. U istraživanju Siguscha i sur. (137) primijećena je statistički značajna redukcija *F. nucleatum* u parodontalnim džepovima ispitanika 12 tjedana nakon aplikacije metilenskog modrila i osvjetljavanja laserom valne duljine 660 nm. Također, za razliku od trenutnog istraživanja, uočena je i značajna razlika u

odnosu na kontrolnu skupinu u kojoj je broj te bakterije ostao sličan onome prije intervencije (137). Trenutni rezultati mogu se objasniti činjenicom da je u ovoj studiji fotodinamska terapija aplicirana supragingivalno, odnosno na caklinu zuba oko ortodontskih bravica, dakle subgingivalne bakterije nisu bile izravno izložene intervenciji kao u prethodno spomenutoj studiji. Broj bakterije *F. nucleatum* u skupini ispitanika kojima je apliciran 1% klorheksidinski lak nije se promijenio tijekom ispitnog razdoblja. Suprotno trenutnim rezultatima, recentna istraživanja su dokazala osjetljivost *F. nucleatum* na klorheksidinske preparate (138, 139). Dakle, prema rezultatima ove studije, klorheksidinski lak apliciran na caklinu zuba ne dovodi do redukcije *F. nucleatum* u subgingivnom plaku.

Neke bakterijske vrste nisu bile dokazane u T0, međutim dokazane su 18 tjedana kasnije u nekih ispitanika. U 30% ispitanika u klorheksidinskoj skupini i u 30% ispitanika kojima je apliciran trikalcij fosfatni lak, pojavila se bakterija *T. forsythia*. U prethodnim je istraživanjima dokazan antibakterijski učinak klorheksidina na spomenutu bakteriju (140-142). Kao što je već napomenuto, u ovom istraživanju, broj bakterije *T. forsythia* se povećao u ispitanika kojima je nanesen 1% klorheksidin lak. Dakle, suprotno rezultatima prethodnih istraživanja, klorheksidin nije pokazao antibakterijski učinak na spomenutu bakteriju. U troje ispitanika trikalcij fosfatne skupine pojavila se bakterija *T. forsythia* tijekom ispitnog razdoblja, ali je u dvoje ispitanika ta bakterija bila eliminirana. Zaključno možemo tvrditi da učinak Clinpro laka na ovu bakteriju nije u potpunosti jasan. Što se tiče literaturnih podataka, utjecaj fluorida na *T. forsythiu* nije dovoljno istražen. Prema dosadašnjim saznanjima, jedino su Fine i sur. (143) objavili da primjena paste za zube s natrijevim fluoridom nije značajno imala utjecaj na broj te bakterije u subgingivnom plaku.

Tek se u dvoje ispitanika u subgingivnom plaku pojavila *T. denticola* tijekom prvih 18 tjedana fiksne ortodontske terapije. Jednom je ispitaniku apliciran klorheksidinski lak, dok je drugi bio u kontrolnoj skupini. Dokazano je da se *T. denticola* pojavljuje u subgingivnom plaku pacijenata tijekom prva 3 mjeseca fiksne ortodontske terapije, te da se njen broj značajno povećava kod osoba s metalnim bravicama (131, 134, 144). Autori nekih recentnih istraživanja objavili su da je ova bakterija rijetko otkrivena kod ispitanika s fiksnim ortodontskim napravama (129, 133).

Što se tiče ostalih bakterijskih vrsta, *A. actynomicetemcomitans* nije bila identificirana ni u jednog ispitanika na početku studije niti nakon 18 tjedana praćenja. Ovakve su rezultate objavili i Lombardo i sur. (133). Nadalje, drugi su autori objavili da se *A. actynomicetemcomitans* pojavljuje vrlo rijetko u subgingivnom plaku ortodontskih pacijenata (129, 131). Također, *P. gingivalis* i *P. intermedia* nisu dokazane kod ispitanika trenutne studije. Prema literaturnim

podacima, *P. intermedia* je bakterijska vrsta koja se kao i *A. actynomicetemcomitans* vrlo rijetko može dokazati u subgingivnom plaku ortodontskih pacijenata (129). I *P. gingivalis* i *P. intermedia* su parodontno patogene bakterije crvenog kompleksa koje se obično pojavljuju tek 6 mjeseci nakon početka fiksne terapije, što može objasniti zašto nisu bile dokazane u ispitanika trenutne studije (7).

Iako se broj pojedinih bakterija tijekom ispitnog razdoblja povećao u nekim skupinama, u nekima se smanjio, u nekih su se ispitanika u T3 pojavile bakterije koje nisu bile dijagnosticirane u T0, a kod nekih ispitanika pojedine su bakterije bile eliminirane, nijedna promjena koja se dogodila tijekom ispitnog razdoblja unutar svake skupine, a i između skupina nije bila statistički značajna. Dakle, tri ispitna sredstva nisu uzrokovala značajniji antibakterijski učinak u usporedbi s kontrolnom skupinom. Potrebno je napomenuti da u ovoj studiji klorheksidin lak, trikalcij fosfatni lak i fotodinamska terapija nisu bili direktno aplicirani u subgingivni sulcus ispitanika iz kojeg se uzimao uzorak za analizu, nego su aplicirani supragingivno, odnosno na caklinu zuba oko ortodontskih bravica. Dakle, ispitivana antibakterijska sredstva vjerojatno nisu imala utjecaj na broj subgingivnih bakterija jer one nisu direktno bile izložene terapiji.

5.4. Stanje gingive u fiksnoj ortodontskoj terapiji

Procjena stanja gingive ortodontskih pacijenata kojima je aplicirana fotodinamska terapija bila je sekundarna mjera ishoda ovog istraživanja. Odnosno, svrha ove studije bila je istražiti učinak fotodinamske terapije na zdravlje gingive kod pacijenata u fiksnoj ortodontskoj terapiji te ga usporediti s učinkom 1% klorheksidinskog i trikalcij fosfatnog laka s 5% natrijevim fluoridom. U fotodinamskoj skupini pacijenata tijekom prvih 6 tjedana trajanja studije zabilježen je porast gingivalnog indeksa, a nakon toga su vrijednosti indeksa počele padati i taj je trend nastavljen do kraja istraživanja. Za razliku od ostalih ispitnih skupina, u ovoj je zabilježena značajna redukcija gingivalnog indeksa između 6. i 12. tjedna praćenja ispitanika. Također, vrijednosti indeksa gingive u toj su skupini bile značajno manje u usporedbi s kontrolnom skupinom 12 (T2) i 18 tjedana (T3) nakon početka studije i postave fiksne ortodontske naprave. Može se pretpostaviti da je antimikrobni učinak toluidinskog modrila osvijetljenog laserom valne duljine 660 nm zaslužan za niže vrijednosti indeksa gingive u usporedbi s onima koje su zabilježene u kontrolnoj skupini. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s prethodnim studijama koje su također potvrdile da je fotodinamska terapija učinkovita u liječenju i prevenciji upale gingive (40, 82, 85, 86, 145). Gómez i sur. (82) su ortodontskim pacijentima u gingivne sulkuse aplicirali 0,005% metilensko modrilo i osvijetlili ga laserom valne duljine

670 nm ukupno četiri puta u razmaku od dva tjedna i zatim još tri puta u razmaku od tri mjeseca. Druga ispitna skupina bila je podvrgnuta ultrazvučnom uklanjanju tvrdih naslaga s površine korijena. U obje se ispitne skupine FMBS značajno smanjio 3 mjeseca nakon početka istraživanja. Nije pronađena statistički značajna razlika u indeksu krvarenja između te dvije ispitne skupine (82). Dakle, prema zaključku autora, fotodinamska terapija jednako je učinkovita u sprječavanju gingivalne upale tijekom fiksne ortodontske terapije kao i konvencionalna metoda uklanjanja naslaga. Dodatno, autori jedne recentne pregledne studije također su zaključili je da je fotodinamska terapija obećavajuća alternativa konvencionalnim metodama za očuvanje gingivnog zdravlja, što je istraženo kroz niz gingivalnih i parodontnih indeksa (31).

Chondros i sur. (145) aplicirali su toluidinsko modrilo u gingivalne sulkuse ispitanika i zatim ga osvijetlili diodnim laserom valne duljine 690 nm. Dokazali su da postoji statistički značajna razlika u indeksu krvarenja pri sondiranju između ispitne skupine (samo jedna aplikacija fotodinamske terapije + ultrazvučno uklanjanje tvrdih naslaga) i kontrolne skupine (ultrazvučno uklanjanje tvrdih naslaga). Uočena je veća redukcija u ispitnoj skupini, stoga, prema zaključcima autora, fotodinamska terapija uspješno smanjuje upalu gingive tijekom fiksne ortodontske terapije (145). Slične rezultate objavili su i Kamran i sur. (86 ref), Baeshen i sur. (85) i Bundidpun i sur. (146). Dakle, rezultati trenutne studije u skladu su s rezultatima prethodno spomenutih recentnih istraživanja.

Međutim, bitno je napomenuti da ishodi nekih studija navode da fotodinamska terapija ne utječe značajno na stanje gingive. Malik i sur. (90) navode da je kombinacija jedne aplikacije fotodinamske terapije (metilensko modrilo 400 µg/mL + laser 660 nm) i mehaničkog uklanjanja tvrdih naslaga s površine korijena dovela do značajnog smanjenja gingivalnog indeksa 6 mjeseci nakon primjene. Međutim, ova se skupina nije značajno razlikovala od skupine koja je podvrgnuta samo mehaničkom čišćenju. Dakle, fotodinamska terapija primijenjena u gingivalne sulkuse nije značajno pridonijela redukciji gingivalne upale. Slični su rezultati objavljeni u prethodnim istraživanjima (83, 84, 87). Rezultati ovih studija mogu se objasniti činjenicom da je fotodinamska terapija aplicirana samo jednom. Može se pretpostaviti da bi barem nekoliko aplikacija bilo potrebno za značajan antimikrobni učinak, kako je dokazano u trenutnoj studiji. Primjena raznih fotodinamskih sredstava i njihove koncentracije, lasera i njihovih parametara, i frekvencija aplikacije terapije mogu bitno utjecati na rezultate istraživanja koje je kasnije teže međusobno uspoređivati.

U ovoj studiji, gingivalni indeks u klorheksidinskoj skupini značajno je porastao tijekom prvih 6 tjedana praćenja ispitanika. Vrijednosti su se počele smanjivati nakon 3 mjeseca praćenja

(T2) i nastavile su padati do kraja trajanja studije. Konačne vrijednosti bile su niže od početnih, međutim to smanjenje nije bilo statistički značajno. Također, vrijednosti indeksa gingive u toj su skupini bile značajno manje u usporedbi s kontrolnom skupinom 12. (T2) i 18. tjedan (T3) praćenja ispitanika. Dakle, opažen je sličan trend promjene indeksa kao i u fotodinamskoj skupini. Ovakav se rezultat može objasniti antimikrobnim djelovanjem laka čiji učinak naposljetku smanjuje upalu mekog tkiva (27). Slični su rezultati vezani za klorheksidin objavljeni ranije (27). U klorheksidinskoj je skupini uočena redukcija gingivalnog indeksa 2 mjeseca nakon početka studije i postave fiksne ortodonske naprave. Vrijednosti su nastavile padati tijekom vremena, i četiri mjeseca kasnije bile su niže nego u T0, što je u skladu s rezultatima trenutnog istraživanja. Vrijednosti gingivalnog indeksa u klorheksidinskoj skupini ispitanika u njihovoj studiji bile su statistički značajno niže od onih u kontrolnoj skupini, što također podupire rezultate trenutne studije (27). S druge pak strane, u istraživanju Paschosa i sur. (100), primjena Cervitec laka svaka 3 mjeseca nije dovela do redukcije gingivalnog indeksa, štoviše, indeks se povećavao tijekom ispitnog razdoblja. Međutim, autori su objavili da Cervitec lak ipak ima pozitivan učinak na gingivalno zdravlje jer je doveo do značajne redukcije upalnih imunoloških parametara (100).

Prema literaturnim podacima i trenutnim saznanjima samo je jedna studija uspoređivala učinak klorheksidinskog laka i fotodinamske terapije na stanje gingive (40).

Paschoal i sur. (40) također su, kao i u trenutnoj studiji, aplicirali fotodinamsku terapiju (kurkumin + laser 450 nm) na caklinu zuba oko bravica u adolescentnih ortodontskih pacijenata. Prema njihovim rezultatima, fotodinamska terapija je uzrokovala značajno smanjenje vrijednosti indeksa krvarenja gingive nakon mjesec dana praćenja ispitanika te se njen učinak statistički značajno razlikovao od placebo laka. Autori su također dokazali da se učinak fotodinamske terapije na gingivalni indeks nije znatno razlikovao od 2% klorheksidinskog laka, što podupire rezultate trenutne studije. Ovaj se ishod može objasniti snažnim protuupalnim svojstvima kurkumina (40). Paschoal i sur. (40) tako preporučuju korištenje kurkumina i lasera valne duljine 660 nm kao jednu od mogućih opcija za sprječavanje i liječenje gingivitisa kod ortodontskih pacijenata.

U ovoj studiji, trikalcij fosfatni lak s 5% natrijevim fluoridom također je uzrokovao značajno veću redukciju indeksa gingive nego što je zabilježeno u kontrolnoj skupini. Trend promjene indeksa gingive tijekom trajanja studije bio je sličan onome uočenom u fotodinamskoj i klorheksidinskoj skupini ispitanika. Pozitivan učinak fluorida na zdravlje gingive kod ortodontskih i neortodontskih pacijenata zabilježen je u mnogim prethodnim studijama (99, 147, 148). Upotreba proizvoda s fluorom može smanjiti upalu gingive već dva tjedna nakon

prve aplikacije (147). Alavi i sur. (99) objavili su da su i fluoridni lak i klorheksidinski gel uzrokovali značajno smanjenje indeksa gingive u usporedbi s kontrolnom skupinom. Finalne vrijednosti indeksa bile su značajno niže od inicijalnih u obje ispitne skupine (99 Alavi). Dakle, klorheksidinski i fluoridni lak pokazali su sličan učinak na zdravlje gingive, što je u skladu s trenutnim rezultatima.

S druge strane, Kaaij i sur. (148) objavili su da je indeks krvarenja gingive u fluoridnoj skupini ortodontskih pacijenata bio niži nego u placebo skupini, međutim nije pronađena statistički značajna razlika između te dvije skupine. U jednoj ranijoj studiji također nije pronađena značajna razlika u gingivalnim indeksima između fluoridiranih i nefluoridiranih skupina ortodontskih pacijenata. Autori su, suprotno rezultatima trenutne studije, zaključili da fluoridi nemaju nikakav učinak na gingivno zdravlje (149).

Prema literaturnim podacima i trenutnim saznanjima, trenutno ne postoje studije koje uspoređuju učinak fotodinamske terapije i fluoridnog laka na gingivalno zdravlje.

Također je važno napomenuti da je u trenutnoj studiji u PDT, CHX i TCP-5% NaF skupinama uočeno povećanje gingivalnih parametara tijekom prvih šest tjedana fiksne ortodontske terapije. Paschos i sur. (100) također su objavili da je najveći porast gingivalnog indeksa u ispitanika u klorheksidinskoj skupini primijećen tijekom prvog mjeseca fiksne ortodontske terapije. To je također bio slučaj i u studiji Alavija i sur. (99) i Sehgal i sur. (27). Takvi su rezultati bili očekivani, jer je dokazano da, unatoč savršenoj oralnoj higijeni i upotrebi antimikrobnih preparata, svi ortodontski pacijenti razviju blagi gingivitis unutar prvih mjesec dana fiksne ortodontske terapije (8, 150).

Za razliku od ostalih ispitnih skupina, u kontrolnoj je zabilježen rast indeksa gingive koji je trajao do 12. tjedna (T2) praćenja ispitanika, a zatim je počeo opadati, međutim finalne su vrijednosti i dalje bile značajno više od inicijalnih. U prethodnim studijama također je gingivalni indeks u kontrolnim skupinama rastao tijekom prva 3 ili 4 mjeseca fiksne ortodontske terapije, a zatim je počeo padati (27, 99, 100). Takav trend promjene indeksa nastaje zbog prolaznog gingivitisa koji se očekuje unutar prvih nekoliko mjeseci fiksne ortodontske terapije (8). Kod većine pacijenata blagi gingivitis prolazi tek nekoliko tjedana nakon završetka terapije. Do gingivitisa dolazi zbog povećane akumulacije plaka uzrokovane dijelovima fiksne ortodontske naprave te zbog otežanog održavanja oralne higijene. Nakon nekoliko mjeseci gingivalno se stanje počinje poboljšavati jer se uspostavlja imunološka ravnoteža između nokse i domaćina, a ortodontski pacijenti vjerojatno počinju usvajati navike pojačanog održavanja oralne higijene.

Zaključno, sva tri ispitivana sredstva pokazala su sličan učinak na stanje gingive koji se statistički značajno razlikovao od onoga koji je uočen u kontrolnoj skupini. Fotodinamska terapija, CHX lak i TCP-5% NaF lak pokazali su se učinkovitima u redukciji gingivalnog indeksa u ortodontskih pacijenata tijekom prvih 18 tjedana fiksne ortodonske terapije.

5.5. Inicijalne karijesne lezije u fiksnoj ortodonskoj terapiji

Sekundarna mjera ishoda ove randomizirane kliničke studije također je bila evaluacija inicijalnih karijesnih lezija na intraoralnim fotografijama, odnosno svrha ove studije bila je ispitati učinak fotodinamske terapije na razvoj inicijalnih karijesnih lezija u ortodontskih pacijenata te ga usporediti s učinkom 1% klorheksidinskog laka i trikalcij fosfatnog laka s 5% natrijevim fluoridom. Iako postoje brojne metode za njihovu evaluaciju, procjena bijelih mrlja na intraoralnim fotografijama jednako je pouzdana kao i vizualna detekcija plaka (18). Ta je metoda korištena u nekoliko nedavnih studija (18, 23). Osim toga, intraoralne fotografije važan su dio praćenja tijeka ortodonske terapije i njihovo snimanje je rutinski postupak.

Tijekom 18 tjedana praćenja ispitanika u fotodinamskoj skupini nije se razvila ni jedna nova inicijalna karijesna lezija. Naprotiv, u kontrolnoj skupini pojavilo se 9 novih lezija. Možemo pretpostaviti da je antibakterijski učinak toluidinskog modrila u kombinaciji s laserom valne duljine 660 nm zaslužan za rezultat u ovoj ispitnoj skupini.

Prema Ogaardu i sur. (22), *S. mutans* u plaku i vidljivi plak na zubima jaki su prediktori za pojavu inicijalnih karijesnih lezija. Za njihov razvoj uglavnom su odgovorne Gram-pozitivne bakterije (108, 151), koje su MALDI-TOF masenom spektrometrijom dokazane i u ovom istraživanju. To su pretežito streptokoki, peptostreptokoki, aktinomicete i laktobacili. Dakle, kao što je već navedeno, kariogene Gram-pozitivne bakterije osjetljivije su na fotodinamsku terapiju od Gram-negativnih, uglavnom zbog svoje građe. Tijekom osvjetljavanja fotosenzitivnog sredstva dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih radikala (osobito singletni kisik) koji uzrokuju oksidativna oštećenja nekoliko molekula ciljnih stanica, uključujući DNK, RNK, lipida i proteina (77). Dosselli i sur. (77) navode da fotodinamska terapija uglavnom djeluje baktericidno, međutim na neke bakterije može djelovati i bakteriostatički. Dakle, one bakterije koje nisu eliminirane tijekom terapije pokazuju modificiranu fiziologiju. Njihov rast je usporen, sposobnost potrošnje glukoze je smanjena, a enzimi uključeni u replikaciju i metabolizam su ireverzibilno oštećeni (77). Naravno, zbog svega navedenog smanjeno je stvaranje kiselih produkata metabolizma, i posljedično, demineralizacija cakline i nastanak inicijalnih karijesnih lezija.

Nadalje, u ovoj je ispitnoj skupini dijagnosticiran najmanji broj uznapredovalih inicijalnih karijesnih lezija ($n = 2$). Više je uznapredovalih lezija bilo čak dijagnosticirano u pacijenata kojima je nanesen TCP-5% NaF lak, koji bi zbog svog sastava trebao imati potentan remineralizacijski učinak. Ovaj se rezultat također može objasniti antibakterijskim učinkom toluidinskog modrila i lasera valne duljine 660 nm. Prema literaturnim podacima, trenutno postoje samo dva *in vivo* istraživanja koja su ispitivala utjecaj fotodinamske terapije na razvoj bijelih mrlja (82, 89). Hosseinpour-Nader i sur. (89) su istraživali antibakterijski učinak kapsula kurkumina s nanomicelama i LED svjetla. Ispitanici su bili podijeljeni u 4 ispitne grupe. Prva skupina je jednom dnevno uzimala kapsulu kurkumina u razdoblju od četiri mjeseca. Ispitanici u drugoj ispitnoj skupini također, ali uz to im je površina zuba u jednom tretmanu bila osvijetljena LED svjetlom. Treća ispitna skupina bila je podvrgnuta samo osvjetljavanju LED svjetlom u jednom tretmanu, dok je četvrta skupina koristila antiseptičku otopinu za usta 2x dnevno tijekom četiri mjeseca. Ispitanicima u fotodinamskoj skupini zabilježene su statistički značajno niže vrijednosti na DIAGNOdent uređaju nakon 90 i 120 dana praćenja u usporedbi s ostalim ispitnim skupinama. Štoviše, prosječan broj bijelih mrlja po pacijentu u ovoj skupini smanjio se tijekom razdoblja ispitivanja (89). Također, Zaleh i sur. (152) u svojoj su *in vitro* studiji dokazali da kombinacija nanočestica propolisa i kurkumina te LED svjetla dovodi do značajno veće remineralizacije cakline u kraćem razdoblju i jačeg terapijskog učinka u usporedbi s kontrolnom i placebo skupinom. Također, veći broj aplikacija fotodinamske terapije korelira s jačim remineralizacijskim učinkom (152). Dakle, slično trenutnim rezultatima, prethodna *in vitro* i *in vivo* istraživanja zaključuju da je fotodinamska terapija učinkovita u remineralizaciji te sprječavanju nastanka i progresije inicijalnih karijesnih lezija. S druge strane, prema rezultatima Gómeza i sur. (82), nije postojala statistički značajna razlika u ICDAS indeksu između skupine kojoj je aplicirana fotodinamska terapija (0,005% metilensko modriilo + laser 670 nm) i skupine koja je bila podvrgnuta ultrazvučnom uklanjanju naslaga. Štoviše, unutar obje skupine je tijekom 6 mjeseci istraživanja primijećen čak blagi porast indeksa (82). Dakle, rezultati te studije nisu u suglasnosti s rezultatima trenutne studije. Slično kao kod fotodinamske skupine, u klorheksidinskoj skupini nije zabilježena ni jedna nova lezija tijekom 18 tjedana praćenja ispitanika. Taj učinak bi se djelomično mogao objasniti inhibicijskim djelovanjem klorheksidina na *S. mutans* (153, 154). Međutim, važno je spomenuti da prisutnost ove bakterije ne mora nužno značiti pojavu bijelih mrlja (25). Štoviše, ovo je jedina skupina u kojoj je primijećena potpuna remineralizacija ($n = 2$) i smanjenje veličine lezija ($n = 1$). Dakle, jedino je u ovoj skupini broj bijelih mrlja na kraju istraživanja bio manji nego na početku. U jednom preglednom radu i meta-analizi zaključeno je da je CHX

lak učinkovita preventivna mjera kojom se može smanjiti incidencija karijesa tijekom fiksne ortodontske terapije (25). Rezultati ovog istraživanja u skladu s prethodnim recentnim studijama (99, 154, 155). Shimp i sur. (155) su zaključili da dvije primjene 0,2% klorheksidina pridonose učinkovitom i značajnom smanjenju pojave bijelih mrlja kod ortodontskih pacijenata. Štoviše, Govindaraj i sur. (154) su objavili da je 1% CHX lak (Cervitec Plus) bio značajno uspješan u smanjenju vrijednosti fluorescencije dobivenih pomoću DIAGNOdent uređaja. Alavi i suradnici (99) su svaka tri mjeseca aplicirali 0,2% CHX lak ortodontskim pacijentima. Detekcija bijelih mrlja mjerena je pomoću ICDAS klasifikacije. Nakon tri uzastopne aplikacije laka, u toj je skupini zabilježena značajno veća redukcija indeksa u usporedbi s kontrolnom i placebo skupinom. Autori zaključuju da je klorheksidinski lak uspješan u sprječavanju demineralizacije u pacijenata u fiksnoj ortodontskoj terapiji, što i nije iznenađujuće, s obzirom da je poznat kao najučinkovitije antimikrobno sredstvo u dentalnoj medicini (99, 122, 156).

Međutim, važno je napomenuti da je u ovoj skupini tijekom trajanja studije zabilježeno i ukupno 7 uznapređovalih, odnosno povećanih bijelih mrlja, što je čak i više nego u kontrolnoj skupini (n = 5). Rastrepo i sur. (156) navode da primjena 2% CHX gela ne dovodi do remineralizacije bijelih mrlja kod ortodontskih pacijenata.

U ovoj studiji, u skupini koja je primala TCP-5% NaF lak, nisu zabilježene smanjene ili potpuno remineralizirane lezije. Nadalje, zajedno s negativnom kontrolom, ovo je jedina skupina u kojoj su se razvile nove lezije (n = 3). Ovi rezultati pomalo iznenađuju jer su prethodne studije pokazale visok remineralizirajući učinak fluorida i trikalcij fosfatnih lakova (61, 154 156). Iako su fluoridni preparati trenutno zlatni standard za kontroliranje inicijalnih karijesnih lezija, autori jedne pregledne studije zaključili su da lakovi koji sadrže fluorid nisu klinički učinkoviti u usporedbi s kontrolnom skupinom (157). Nadalje, Perrini i sur. (158) objavili su da uporaba laka s 5% natrijevim fluoridom može biti korisna u prevenciji bijelih mrlja tijekom fiksne ortodontske terapije, ali da nema značajan učinak kod osoba s izvrsnom oralnom higijenom. Stoga autori preporučuju njegovu primjenu kod pacijenata sa suboptimalnom oralnom higijenom. Također su zaključili da broj aplikacija laka ne korelira s njegovom efikasnošću (158). Štoviše, u jednom je prethodnom istraživanju objavljeno da redukcija ICDAS indeksa bila značajno veća u skupini kojoj je nanesen klorheksidinski gel u usporedbi s onom kojoj je nanesen 5 % NaF lak (99).

Ipak, u ovoj je skupini zabilježen tri puta manji broj novih lezija u usporedbi s negativnom kontrolom. Štoviše, 5 od 6 ispitanika (83%) kod kojih su se razvile nove lezije bili su u kontrolnoj skupini, a samo jedan u TCP-5% NaF skupini. Dakle, iako se TCP- 5% NaF lak

pokazao slabijim u kontroli bijelih mrlja od fotodinamske terapije, ipak je bio učinkovitiji u njihovoj prevenciji uspoređujući ga s kontrolnom skupinom. Stecksén-Blicks i sur. (159) su objavili da je incidencija demineralizacijskih lezija tijekom fiksne ortodonske terapije u skupini koja je primala fluoridni lak bila otprilike jednu trećinu od one u placebo skupini. Sonesson i sur. (23) također su evaluirali pojavu bijelih mrlja na intraoralnim fotografijama. Njihovi rezultati pokazali su da lak s amonijevim fluoridom apliciran svakih 6 mjeseci dovodi do značajne redukcije progresije bijelih mrlja u ortodontskih pacijenata u usporedbi s kontrolnom skupinom. Salamara i sur. (61) navode značajniju remineralizaciju dobivenu Clinpro lakom od one primijećene u kontrolnoj skupini.

U ovoj studiji većina uznapredovalih lezija dijagnosticirana je na prednjim zubima, i to uglavnom na lateralnim incizivima. Anteriorni segmenti gornjeg zubnog luka najosjetljiviji su na pojavu bijelih mrlja jer plak koji se na njima nakuplja ima dokazano niži pH od ostalih područja u usnoj šupljini. Uzrok tome vjerojatno je smanjeni protok sline u tom području, dok su istovremeno ti zubi najizloženi ugljikohidratima iz hrane (160). Liu i suradnici (119) također su objavili da su prednji zubi najosjetljiviji na progresiju i pojavu bijelih mrlja. Nekoliko studija također zaključuje da su lateralni incizivi najčešće zahvaćeni zubi (21, 153). Većina se novih lezija u ovom istraživanju pojavila u gingivalnom i mezijalnom dijelu zuba. Također, gotovo sve uznapredovale lezije bile su locirane u području gingivalno od bravice. U istraživanju Govindaraja i sur. (154), najveće vrijednosti fluorescencije dobivene DIAGNOdent uređajem zabilježene su upravo u gingivalnom dijelu zuba. Prema rezultatima jedne nedavne studije, nije bilo statistički značajne razlike između gingivalnog, okluzalnog, mezijalnog i distalnog mjesta razvoja lezija, međutim, primijećeno je da je gingivalno područje zuba osjetljivije na demineralizaciju od ostalih (158). Ovo područje zuba je najosjetljivije na bijele mrlje jer je upravo u tom dijelu zuba zabilježena najveća akumulacija plaka (2).

Fotodinamska terapija na bazi toluidinskog modrila i lasera valne duljine 660 nm pokazala se značajno učinkovitijom u kontroli nakupljanja dentalnog plaka od trikalcij fosfatnog laka s 5% natrijevim fluoridom, čiji se učinak nije razlikovao od onog zabilježenog u kontrolnoj skupini. Učinak fotodinamske terapije na akumulaciju plaka bio je sličan onome kojeg je proizveo 1% klorheksidin lak.

Aplikacija toluidinskog modrila i lasera valne duljine 660 nm dovela je do statistički značajne redukcije broja bakterijskih kolonija u supragingivnom plaku ortodontskih pacijenata tijekom ispitnog razdoblja. Sličan je učinak zabilježen u ispitanika kojima je apliciran 1% klorheksidin lak i trikalcij fosfatni lak s 5% natrijevim fluoridom. U kontrolnoj skupini zabilježen je porast broja bakterijskih kolonija u supragingivnom plaku.

Toluidinsko modrilo osvijetljeno laserom valne duljine 660 nm nije proizvelo značajnu redukciju broja parodontno patogenih bakterija u subgingivnom plaku. Učinak fotodinamske terapije nije se značajno razlikovao od onog zabilježenog u kontrolnoj skupini. Slični su rezultati uočeni u pacijenata kojima je apliciran 1% klorheksidin lak i trikalcij fosfatni lak s 5% natrijevim fluoridom.

Neznačajna redukcija gingivalnog indeksa tijekom prvih 18 tjedana fiksne ortodontske terapije zabilježena je u pacijenata kojima je aplicirana fotodinamska terapija na bazi toluidinskog modrila i lasera valne duljine 660 nm. Takav je učinak uočen i u ispitanika koji su bili podvrgnuti aplikaciji 1% klorheksidin laka i trikalcij fosfatnog laka s 5% natrijevim fluoridom. S druge strane, u kontrolnoj je skupini zabilježeno značajno povećanje gingivalnog indeksa tijekom ispitnog razdoblja.

Tri aplikacije fotosenzitivnog sredstva na bazi toluidinskog modrila osvijetljenog laserom valne duljine 660 nm u razmaku od 6 tjedana, spriječile su pojavu novih inicijalnih karijesnih lezija tijekom prvih 18 tjedana fiksne ortodontske terapije. Fotodinamska terapija pokazala se učinkovitijom u sprječavanju inicijalnih karijesnih lezija od trikalcij fosfatnog laka s 5% natrijevim fluoridom. U kontrolnoj je skupini zabilježen najveći broj novih inicijalnih karijesnih lezija tijekom ispitnog razdoblja.

1. Smales RJ. Plaque growth on dental restorative materials. J Dent. 1981;9(2):133-40.
2. Gwinnett AJ, Ceen RF. Plaque distribution on bonded brackets: a scanning microscope study. Am J Orthod. 1979;75(6):667-77.
3. Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. Enamel demineralization during orthodontic treatment. Aetiology and prevention. Aust Dent J. 1997;42(5):322-7.
4. Arab S, Nouhzadeh Malekshah S, Abouei Mehrizi E, Ebrahimi Khanghah A, Naseh R, Imani MM. Effect of Fixed Orthodontic Treatment on Salivary Flow, pH and Microbial Count. J Dent (Tehran). 2016;13(1):18-22.
5. Kozak U, Sękowska A, Chałas R. The Effect of Regime Oral-Hygiene Intervention on the Incidence of New White Spot Lesions in Teenagers Treated with Fixed Orthodontic Appliances. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(24):9460.
6. Lucchese A, Bondemark L, Marcolina M, Manuelli M. Changes in oral microbiota due to orthodontic appliances: a systematic review. J Oral Microbiol. 2018;10(1):1476645.
7. Contaldo M, Lucchese A, Lajolo C, Rupe C, Di Stasio D, Romano A, i ostali. The Oral Microbiota Changes in Orthodontic Patients and Effects on Oral Health: An Overview. J Clin Med. 2021;10(4):780.
8. Zachrisson S, Zachrisson BU. Gingival condition associated with orthodontic treatment. Angle Orthod. 1972;42:26-34.
9. Marincak Vrankova Z, Rousi M, Cvanova M, Gachova D, Ruzicka F, Hola V, i ostali. Effect of fixed orthodontic appliances on gingival status and oral microbiota: a pilot study. BMC Oral Health. 2022;22(1):455.
10. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. Orthod Craniofac Res. 2007;10(4):187-95.
11. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, i ostali. Effects of fixed orthodontic appliances on subgingival microflora. Int J Dent Hyg. 2008;6:129–136.
12. Muñoz LF, Uribe AM, Reyes MC, Castro LA, Rodríguez MJ. Salivary *Streptococcus mutans* colony-forming unit count in patients with and without orthodontic appliances. Acta Odontol Latinoam. 2022;35(3):171-7.
13. Mummolo S, Tieri M, Nota A, Caruso S, Darvizeh A, Albani F, i ostali. Salivary concentrations of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* during an orthodontic treatment. An observational study comparing fixed and removable orthodontic appliances. Clin Exp Dent Res. 2020;6(2):181-7.

14. Sifakakis I, Papaioannou W, Papadimitriou A, Kloukos D, Papageorgiou SN, Eliades T. Salivary levels of cariogenic bacterial species during orthodontic treatment with thermoplastic aligners or fixed appliances: a prospective cohort study. *Prog Orthod.* 2018;19(1):25.
15. Ghijselings E, Coucke W, Verdonck A, Teughels W, Quirynen M, Pauwels M, i ostali. Long-term changes in microbiology and clinical periodontal variables after completion of fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res.* 2014;17(1):49-59.
16. Papageorgiou SN, Xavier GM, Cobourne MT, Eliades T. Effect of orthodontic treatment on the subgingival microbiota: A systematic review and meta-analysis. *Orthod Craniofac Res.* 2018;21(4):175-85.
17. Chapman JA, Roberts WE, Eckert GJ, Kula KS, González-Cabezas C. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138(2):188-94.
18. Julien KC, Buschang PH, Campbell PM. Prevalence of white spot lesion formation during orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2013;83(4):641-7.
19. Ando M, Shaikh S, Eckert G. Determination of caries lesion activity: refec- tion and roughness for characterization of caries progression. *Oper Dent.* 2018;43(3):301–6.
20. Lopes PC, Carvalho T, Gomes ATPC, Veiga N, Blanco L, Correia MJ, i ostali. White spot lesions: diagnosis and treatment - a systematic review. *BMC Oral Health.* 2024;24(1):58.
21. Sonesson M, Brechter A, Lindman R, Abdulraheem S, Twetman S. Fluoride varnish for white spot lesion prevention during orthodontic treatment: results of a randomized controlled trial 1 year after debonding. *Eur J Orthod.* 2021;43(4):473–7.
22. Ogaard B. White spot lesions during orthodontic treatment: mechanisms and fluoride preventive aspects. *Semin Orthod.* 2008;3:183-93.
23. Sonesson M, Brechter A, Abdulraheem S, Lindman R, Twetman S. Fluoride varnish for the prevention of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances: a randomized controlled trial. *Eur J Orthod.* 2020;42(3):326-30.
24. Sonesson M, Twetman S. Prevention of white spot lesions with fluoride varnish during orthodontic treatment with fixed appliances: a systematic review. *Eur J Orthod.* 2023;45(5):485-90.
25. Okada EM, Ribeiro LN, Stuaní MB, Borsatto MC, Fidalgo TK, Paula-Silva FW, Küchler EC. Effects of chlorhexidine varnish on caries during orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):e115.

26. Sandham HJ, Nadeau L, Phillips HI. The effect of chlorhexidine varnish treatment on salivary mutans streptococcal levels in child orthodontic patients. *J Dent Res.* 1992;71(1):32-5.
27. Sehgal A, Shetty S, Ashith MV, Jose NP, Mangal U. Efficacy of Chlorhexidine Varnish in Patients Undergoing Multibracket Fixed Orthodontic Treatment: A Controlled Clinical Study. *Biomed Pharmacol J.* 2018;11(2):945-50.
28. Du M, Cheng N, Tai B, Jiang H, Li J, Bian Z. Randomized controlled trial on fluoride varnish application for treatment of white spot lesion after fixed orthodontic treatment. *Clin Oral Investig.* 2012;16(2):463-8.
29. Gontijo L, Cruz Rde A, Brandão PR. Dental enamel around fixed orthodontic appliances after fluoride varnish application. *Braz Dent J.* 2007;18(1):49-53.
30. Erkmén Almaz M, Ulusoy NB, Akbay Oba A, Dokumacı A. Remineralization effect of NaF, NaF with TCP, NaF with CPP-ACP and NaF with CXP varnishes on newly erupted first permanent molars: A randomized controlled trial. *Int J Dent Hyg.* 2024;22(3):703-10.
31. Shafae H, Asgari R, Bardideh E, Rangrazi A, Sedigh S, Kerayechian N. The effects of low-level laser therapy and photodynamic therapy on oral health of fixed orthodontics patients. A systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2023;44:103759.
32. Bahrami R, Pourhajibagher M, Gharibpour F. Antimicrobial photodynamic therapy for the management of gingivitis and white spot lesions in fixed orthodontic patients: A systematic review. *Int Orthod.* 2024;22(1):100821.
33. Glavina D. Materijali u preventivnoj dentalnoj medicini: Sredstva za prevenciju karijesa. U: Mehulić K. i sur. *Dentalni materijali.* Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 80-97.
34. Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol.* 1994;21(6):397-401.
35. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2004;31(10):878-84.
36. Petersson LG, Edwardsson S, Arends J. Antimicrobial effect of a dental varnish, in vitro. *Swed Dent J.* 1992;16(5):183-9.

37. Jentsch HF, Eckert FR, Eschrich K, Stratul SI, Kneist S. Antibacterial action of Chlorhexidine/thymol containing varnishes in vitro and in vivo. *Int J Dent Hyg.* 2014;12(3):168-73.
38. Cosyn J, Wyn I, De Rouck T, Moradi Sabzevar M. A chlorhexidine varnish implemented treatment strategy for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;32:750–6.
39. Lipták L, Szabó K, Nagy G, Márton S, Madléna M. Microbiological Changes and Caries-Preventive Effect of an Innovative Varnish Containing Chlorhexidine in Orthodontic Patients. *Caries Res.* 2018;52(4):272-8.
40. Paschoal MA, Moura CM, Jeremias F, Souza JF, Bagnato VS, Giusti JS, i ostali. Longitudinal effect of curcumin-photodynamic antimicrobial chemotherapy in adolescents during fixed orthodontic treatment: a single-blind randomized clinical trial study. *Lasers Med Sci.* 2015;30(8):2059-65.
41. de Amorim RG, Leal SC, Bezerra AC, de Amorim FP, de Toledo OA. Association of chlorhexidine and fluoride for plaque control and white spot lesion remineralization in primary dentition. *Int J Paediatr Dent.* 2008;18(6):446-51.
42. Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res.* 1975;54 Spec No B:B57-62.
43. Khan R, Antony VV. A randomized clinical trial evaluating the efficacy of chlorhexidine varnish on streptococcus mutans in plaque and gingival status in patients undergoing orthodontic treatment. *The Orthodontic Cyber Journal.* 2010:2-14.
44. Hussain U, Alam S, Rehman K, Antonoglou GN, Papageorgiou SN. Effects of chlorhexidine use on periodontal health during fixed appliance orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Orthod.* 2023;45(1):103-14.
45. Pretti H, Barbosa GL, Lages EM, Gala-García A, Magalhães CS, Moreira AN. Effect of chlorhexidine varnish on gingival growth in orthodontic patients: a randomized prospective split-mouth study. *Dental Press J Orthod.* 2015;20(5):66-71.
46. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontol 2000.* 1997;15:55-62.
47. Puig Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13(4):E257–60.

48. Wakamatsu K, Kurokawa H, Okuwaki T, Takamizawa T, Tsujimoto A, Shiratsuchi K, i ostali. Ultrasonic measurement of dentin remineralization effects of dentifrices and silver diamine fluoride. *Acta Odontol Scand.* 2021;79(7):528-35.
49. Karlinsey RL, Mackey AC, Walker TJ, Frederick KE, Blanken DD, Flaig SM, i ostali. In vitro remineralization of human and bovine white-spot enamel lesions by NaF dentifrices: A pilot study. *J Dent Oral Hyg.* 2011;3(2):22-9.
50. Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2013(7):CD002279.
51. Hellwig E, Lennon AM. Systemic versus topical fluoride. *Caries Res.* 2004;38(3):258-62.
52. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res.* 2010;89(11):1187-97.
53. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, i ostali. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:4743-63.
54. Marović D. Zubni karijes. U: Tarle Z. i sur. *Restaurativna dentalna medicina.* Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 66-99.
55. Xin W, Leung KC, Lo EC, Mok MY, Leung MH. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of fluoride varnish in preventing dental caries of Sjögren's syndrome patients. *BMC Oral Health.* 2016;16(1):102.
56. Reddy R, Manne R, Sekhar GC, Gupta S, Shivaram N, Nandalur KR. Evaluation of the Efficacy of Various Topical Fluorides on Enamel Demineralization Adjacent to Orthodontic Brackets: An In Vitro Study. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(1):89-93.
57. Rao R, Jain A, Verma M, Langade D, Patil A. Comparative evaluation of remineralizing potential of Fluoride using three different remineralizing protocols: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2017;20(6):463-6.
58. Bergamo AZN, Miguel LP, Delgado RZR, Palma-Dibb RG, Faraoni JJ, Gatón-Hernández P, i ostali. Efficacy of ClinproTMXT Varnish surrounding brackets on the enamel surface of white spot lesion. *Braz Dent J.* 2023;34(4):143-9.
59. Jena D, Manas A, Venkateswararao CH, Salama MT, Ismail PMS, Basha SR. Comparative Evaluation of Efficacy of Bioactive Glass, Tricalcium Phosphate, and Ozone Remineralizing Agents on Artificial Carious Lesion. *J Pharm Bioallied Sci.* 2022;14(Suppl 1):S959-61.

60. Handa A, Chengappa D, Sharma P, Handa JK. Effectiveness of Clinpro Tooth Crème in comparison with MI Varnish with RECALDENT™ for treatment of white spot lesions: a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig.* 2023;27(4):1473-81.
61. Salamara O, Papadimitriou A, Mortensen D, Twetman S, Koletsi D, Gizani S. Effect of fluoride varnish with functionalized tri-calcium phosphate on post-orthodontic white spot lesions: an investigator-blinded controlled trial. *Quintessence Int.* 2020;51(10):854-62.
62. Virupaxi SG, Roshan NM, Poornima P, Nagaveni NB, Neena IE, Bharath KP. Comparative Evaluation of Longevity of Fluoride Release From three Different Fluoride Varnishes - An In vitro Study. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(8):ZC33-6.
63. Chau NP, Pandit S, Jung JE, Jeon JG. Evaluation of Streptococcus mutans adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *J Dent.* 2014;42(6):726-34.
64. ten Cate JM, van Loveren C. Fluoride mechanisms. *Dent Clin North Am.* 1999;43(4):713-42.
65. Noble J. Fluoride varnish for the teeth. *Vital.* 2008;5:39.
66. Erkmén Almaz M, Akbay Oba A. Antibacterial activity of fluoride varnishes containing different agents in children with severe early childhood caries: a randomised controlled trial. *Clin Oral Investig.* 2020;24(6):2129-36.
67. Samuel V, Ramakrishnan M, Halawany HS, Abraham NB, Jacob V, Anil S. Comparative evaluation of the efficacy of tricalcium phosphate, calcium sodium phosphosilicate, and casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate in reducing streptococcus mutans levels in saliva. *Niger J Clin Pract.* 2017;20(11):1404-10.
68. Olek M, Kasperski J, Skaba D, Wiench R, Cieślak G, Kawczyk-Krupka A. Photodynamic therapy for the treatment of oral squamous carcinoma-Clinical implications resulting from in vitro research. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;27:255-7.
69. Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15(4):323-7.
70. Kwiatkowski S, Knap B, Przysupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, i ostali. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:1098-107.

71. Lulic M, Leiggener Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36(8):661-6.
72. Garcia-Diaz M, Huang YY, Hamblin MR. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. *Methods.* 2016;109:158-166.
73. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86(8):694-707.
74. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016;473:347–64.
75. Yin R, Hamblin MR. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *Curr Med Chem.* 2015;22(18):2159-85.
76. Wiench R, Skaba D, Matys J, Grzech-Leśniak K. Efficacy of Toluidine Blue-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy on *Candida* spp. A Systematic Review. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(4):349.
77. Dosselli R, Million R, Puricelli L, Tessari P, Arrigoni G, Franchin C, et al. Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach. *J Proteomics.* 2012;77:329-43.
78. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996;18(3):253-9.
79. Ghorbani J, Rahban D, Aghamiri S, Teymouri A, Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther.* 2018;27(4):293-302.
80. D’Ilario L, Martinelli A. Toluidine blue: Aggregation properties and structural aspects. *Modelling Simul Mater Sci Eng.* 2006;14:581–95.
81. Abellán R, Gómez C, Iglesias-Linares A, Palma JC. Impact of photodynamic therapy versus ultrasonic scaler on gingival health during treatment with orthodontic fixed appliances. *Lasers Surg Med.* 2019;51(3):256-67.
82. Gómez C, Abellán R, Palma JC. Efficacy of photodynamic therapy vs ultrasonic scaler for preventing gingival inflammation and white spot lesions during orthodontic treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;24:377-83.
83. Alqerban A. Efficacy of antimicrobial photodynamic and photobiomodulation therapy against *Treponema denticola*, *fusobacterium nucleatum* and human beta defensin-2

- levels in patients with gingivitis undergoing fixed orthodontic treatment: A clinic-laboratory study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29:101659.
84. Alshahrani A, Togoo RA, Kamran MA, Alshahrani I. Clinical periodontal, bacterial, and immunological outcomes of antimicrobial photodynamic therapy in orthodontic treatment-induced gingival enlargement. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101934.
85. Baeshen HA, Alshahrani A, Kamran MA, Alnazeh AA, Alhaizaey A, Alshahrani I. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy in restoring clinical, microbial, proinflammatory cytokines and pain scores in adolescent patients having generalized gingivitis and undergoing fixed orthodontic treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;32:101998.
86. Kamran MA. Clinical, microbiological and immunological outcomes with photodynamic therapy as an adjunct to full-mouth scaling in patients undergoing fixed orthodontic treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29:101585.
87. Al Nazeh A, Alshahrani A, Almoammar S, Kamran MA, Togoo RA, Alshahrani I. Application of photodynamic therapy against periodontal bacteria in established gingivitis lesions in adolescent patients undergoing fixed orthodontic treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101904.
88. Soares LGP, Crugeira PJJ, Nunes IPF, Santos AS, Cangussú MCT, de Almeida PF, i ostali. Oral microbiological control by photodynamic action in orthodontic patients. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;28:221-5.
89. Hosseinpour-Nader A, Karimi N, Ghafari HA, Ghorbanzadeh R. Effect of nanomicelle curcumin-based photodynamic therapy on the dynamics of white spot lesions and virulence of *Streptococcus mutans* in patients undergoing fixed orthodontic treatment: A randomized double-blind clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;40:103183.
90. Malik NKA, Alkadhi OH. Effectiveness of mechanical debridement with and without antimicrobial photodynamic therapy against oral yeasts in children with gingivitis undergoing fixed orthodontic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101768.
91. Azizi B, Budimir A, Mehmeti B, Jakovljević S, Bago I, Gjorgievska E, Gabrić D. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and light-activated disinfection against bacterial species on titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018;33(4):831-7.

92. Loe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol.* 1967;38(6):610-6.
93. Al-Anezi SA, Harradine NW. Quantifying plaque during orthodontic treatment: *Angle Orthod.* 2012;82(4):748-53.
94. Mei L, Chieng J, Wong C, Benic G, Farella M. Factors affecting dental biofilm in patients wearing fixed orthodontic appliances. *Prog Orthod.* 2017;18(1):4.
95. Bruker [Internet]. Billerica: Bruker Daltonics Inc. MALDI Biotyper® CA System, Clinical Application for Identification of Microorganisms. [pristupljeno 22.10.2024.]. Dostupno na: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1857366_MALDI_Biotyper_CA_brochure_01-2018_ebook.pdf
96. Santigli E, Koller M, Klug B. Oral Biofilm Sampling for Microbiome Analysis in Healthy Children. *J Vis Exp.* 2017;(130):56320.
97. Ichinose-Tsuno A, Aoki A, Takeuchi Y, Kirikae T, Shimbo T, Lee MC, i ostali. Antimicrobial photodynamic therapy suppresses dental plaque formation in healthy adults: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health.* 2014;14:152.
98. Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod.* 2001;23(5):475-84.
99. Alavi S, Yaraghi N. The effect of fluoride varnish and chlorhexidine gel on white spots and gingival and plaque indices in fixed orthodontic patients: A placebo-controlled study. *Dent Res J (Isfahan).* 2018;15(4):276-282.
100. Paschos E, Limbach M, Teichmann M, Huth KC, Folwaczny M, Hickel R, i ostali. Orthodontic attachments and chlorhexidine-containing varnish effects on gingival health. *Angle Orthod.* 2008;78(5):908-16.
101. Weiger R, Friedrich C, Netuschil L, Schlagenhaut U. Effect of chlorhexidine-containing varnish (Cervitec) on microbial vitality and accumulation of supragingival dental plaque in humans. *Caries Res.* 1994;28(4):267-71.
102. Chiba F, Garbin C, Saliba T, Garbin A, Moimaz S. Effect of Chlorhexidine and Fluoride Varnishes on Streptococcus mutans Count and Dental Plaque Index. *J Health Sci.* 2019;21(4):371-5.
103. Zickert I, Emilson CG. Effect of a fluoride-containing varnish on Streptococcus mutans in plaque and saliva. *Scand J Dent Res.* 1982;90(6):423-8.

104. Mohamed H, Ibrahim AH, El-Baz MA, Ezzat MA. Assessment of inhibition of biofilm formation and plaque bacterial count of fluoride varnish containing chlorhexidine and cetylpyridinium chloride versus conventional fluoride varnish. *Egypt Dent J.* 2022;68(2):1809-18.
105. Jiang C, Fan C, Yu X, Xu T, Cai J, Fan X, Zhang J. Comparison of the efficacy of different periodic periodontal scaling protocols for oral hygiene in adolescents with fixed orthodontic appliances: A prospective cohort study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2021;159(4):435-42.
106. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
107. Abdulkareem AA, Al-Taweel FB, Al-Sharqi AJB, Gul SS, Sha A, Chapple ILC. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *J Oral Microbiol.* 2023;15(1):2197779.
108. Baraba A, Kqiku L, Gabrić D, Verzak Ž, Hanscho K, Miletić I. Efficacy of removal of cariogenic bacteria and carious dentin by ablation using different modes of Er:YAG lasers. *Braz J Med Biol Res.* 2018;51(3):e6872.
109. Manikandan D, Balaji VR, Niazi TM, Rohini G, Karthikeyan B, Jesudoss P. Chlorhexidine varnish implemented treatment strategy for chronic periodontitis: A clinical and microbial study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016;8(Suppl 1):S133-7.
110. Eronat C, Alpöz AR. Effect of Cervitec varnish on the salivary *Streptococcus mutans* levels in the patients with fixed orthodontic appliances. *J Marmara Univ Dent Fac.* 1997;2(4):605-8.
111. Huizinga ED, Ruben JL, Arends J. Chlorhexidine and thymol release from a varnish system. *J Biol Buccale.* 1991;19(4):343-8.
112. Panhóca VH, Esteban FFL, Corrêa TQ, Paolillo FR, de Souza CW, Bagnato VS. Oral Decontamination of Orthodontic Patients Using Photodynamic Therapy Mediated by Blue-Light Irradiation and Curcumin Associated with Sodium Dodecyl Sulfate. *Photomed. Laser Surg.* 2016;34:411-7.
113. Kamran MA, Qasim M, Udeabor SE, Hameed MS, Mannakandath ML, Alshahrani I. Impact of riboflavin mediated photodynamic disinfection around fixed orthodontic system infected with oral bacteria. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;34:102232.
114. Dong L, Tong Z, Linghu D, Lin Y, Tao R, Liu J, i ostali. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(5):390-5.

115. Lawrence D, Puja CY. Antibacterial effect of amorphous calcium phosphate casein phosphopeptide varnish against *Streptococcus mutans*: An exploratory in vivo randomized controlled trial. *International Journal of Applied Dental Sciences*. 2020;6(4):389-9.
116. Kado I, Hisatsune J, Tsuruda K, Tanimoto K, Sugai M. The impact of fixed orthodontic appliances on oral microbiome dynamics in Japanese patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):21989.
117. Pan S, Liu Y, Si Y, Zhang Q, Wang L, Liu J, i ostali. Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in adolescent orthodontic patients. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188420.
118. Guo R, Lin Y, Zheng Y, Li W. The microbial changes in subgingival plaques of orthodontic patients: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *BMC Oral Health*. 2017;17(1):90.
119. Liu S, Chen M, Wang Y, Zhou X, Peng X, Ren B, i ostali. Effect of *Veillonella parvula* on the physiological activity of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 2020;109:104578.
120. Zhou P, Garcia BL, Kotsakis GA. Comparison of antibacterial and antibiofilm activity of bioactive glass compounds S53P4 and 45S5. *BMC Microbiol*. 2022;22(1):212.
121. Raangs GC, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. In vitro antimicrobial effects of two antihalitosis mouth rinses on oral pathogens and human tongue microbiota. *Int J Dent Hyg*. 2013;11(3):203-7.
122. Sari Widyarman A, Udawatte NS, Tegar Badruzzaman I, Cloudya Panjaitan C, Apriani A, Jeddy, i ostali. Topical fluoride varnish application shifts dysbiotic dental plaque microbiome towards eubiosis in children with dental caries. *Saudi Dent J*. 2024;36(10):1313-20.
123. Tanaka CJ, Rodrigues JA, Pingueiro JMS, Macedo TT, Feres M, Shibli JA, i ostali. Antibacterial Activity of a Bioactive Tooth-Coating Material Containing Surface Pre-Reacted Glass in a Complex Multispecies Subgingival Biofilm. *Pharmaceutics*. 2023;15(6):1727.
124. Kara D, Luppens SB, Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(1):58-63.
125. Kara D, Luppens SB, van Marle J, Ozok R, ten Cate JM. Microstructural differences between single-species and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and

- Veillonella parvula, before and after exposure to chlorhexidine. FEMS Microbiol Lett. 2007;271(1):90-7.
126. Brinar S, Skvarča A, Gašpir B, Schara R. The effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontal disease and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. Clin Oral Investig. 2023;27(10):6235-44.
 127. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, i ostali. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. Lasers Med Sci. 2012;27(4):687-93.
 128. Naranjo AA, Triviño ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2006;130(3):275.e17-22.
 129. Mártha K, Lőrinczi L, Bică C, Gyergyay R, Petcu B, Lazăr L. Assessment of Periodontopathogens in Subgingival Biofilm of Banded and Bonded Molars in Early Phase of Fixed Orthodontic Treatment. Acta Microbiol Immunol Hung. 2016;63(1):103-13.
 130. Choi DS, Cha BK, Jost-Brinkmann PG, Lee SY, Chang BS, Jang I, i ostali. Microbiologic changes in subgingival plaque after removal of fixed orthodontic appliances. Angle Orthod. 2009;79(6):1149-55.
 131. Kim SH, Choi DS, Jang I, Cha BK, Jost-Brinkmann PG, Song JS. Microbiologic changes in subgingival plaque before and during the early period of orthodontic treatment. Angle Orthod. 2012;82(2):254-60.
 132. Lo BA, Di Marco R, Milazzo I, Nicolosi D, Calì G, Rossetti B, i ostali. Microbiological and clinical periodontal effects of fixed orthodontic appliances in pediatric patients. New Microbiol. 2008;31(2):299-302.
 133. Lombardo L, Palone M, Scapoli L, Siciliani G, Carinci F. Short-term variation in the subgingival microbiota in two groups of patients treated with clear aligners and vestibular fixed appliances: A longitudinal study. Orthod Craniofac Res. 2021;24(2):251-60.
 134. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. Angle Orthod. 2002;72(4):338-43.
 135. Fernández E, Sánchez MDC, Llama-Palacios A, Sanz M, Herrera D. Antibacterial Effects of Toothpastes Evaluated in an ^[1]_{SEP}In Vitro Biofilm Model. Oral Health Prev Dent. 2017;15(3):251-7.

136. Ma S, Imazato S, Chen JH, Mayanagi G, Takahashi N, Ishimoto T, i ostali. Effects of a coating resin containing S-PRG filler to prevent demineralization of root surfaces. *Dent Mater J*. 2012;31:909–15.
137. Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpel A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 2010;81(7):975-81.
138. Seneviratne CJ, Leung KC, Wong CH, Lee SF, Li X, Leung PC, i ostali. Nanoparticle-encapsulated chlorhexidine against oral bacterial biofilms. *PLoS One*. 2014;9(8):e103234.
139. Bescos R, Ashworth A, Cutler C, Brookes ZL, Belfield L, Rodiles A, i ostali. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Sci Rep*. 2020;10(1):5254.
140. Krishnappan S, Ravindran S, Balu P, Ilangovan K, Sathiyaseelan S, Pandraveti RR. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles Infused with *Azadirachta indica* Extract and Chlorhexidine Against Red-complex Pathogens. *J Contemp Dent Pract*. 2024;25(6):547-53.
141. Mithra R, Kalaivani V, Gayathri K, Ravishankar P, Vinayachandran D, Siluvai S, Rajakumar S, Esther V. Comparison of Antimicrobial Efficacy of *Ocimum sanctum* (Tulsi) Extract and Chlorhexidine Against *Tannerella forsythia*: An In Vitro Study. *Cureus*. 2024;16(10):e72167.
142. Gunjal S, Ankola AV, Bhat K. In vitro antibacterial activity of ethanolic extract of *Morus alba* leaf against periodontal pathogens. *Indian J Dent Res*. 2015;26(5):533-6.
143. Fine N, Barbour A, Kaura K, Kerns KA, Chen D, Trivedi HM, i ostali. Effects of a stabilized stannous fluoride dentifrice on clinical, immunomodulatory, and microbial outcomes in a human experimental gingivitis model. *J Periodontol*. 2024;95(5):421-31.
144. Ireland AJ, Soro V, Sprague SV, Harradine NW, Day C, Al-Anezi S, i ostali. The effects of different orthodontic appliances upon microbial communities. *Orthod Craniofac Res*. 2014;17(2):115-23.
145. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2009;24(5):681-8.
146. Bundidpun P, Srisuwantha R, Laosrisin N. Clinical effects of photodynamic therapy as an adjunct to full-mouth ultrasonic scaling and root planing in treatment of chronic periodontitis. *Laser Ther*. 2018;27(1):33-9.

147. Acherkouk A, Patel N, Butler A, Amini P. A randomised clinical study investigating efficacy of a stannous fluoride toothpaste in improving gingival health after 3 weeks' use. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):441.
148. van der Kaaij NC, van der Veen MH, van der Kaaij MA, ten Cate JM. A prospective, randomized placebo-controlled clinical trial on the effects of a fluoride rinse on white spot lesion development and bleeding in orthodontic patients. *Eur J Oral Sci*. 2015;123(3):186-93.
149. Chitra P, Prashantha GS, Rao A. In vivo investigation of gingival health and oxidative stress changes in patients undergoing orthodontic treatment with and without fluoride use. *J Indian Soc Periodontol*. 2022;26(2):123-9.
150. Kumar V, Singh P, Arora VK, Kaur S, Sarin S, Singh H. Assessment of Effect of Fixed Orthodontic Treatment on Gingival Health: An Observational Study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021;13(Suppl 1):S425-8.
151. Torlakovic L, Klepac-Ceraj V, Ogaard B, Cotton SL, Paster BJ, Olsen I. Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *J Oral Microbiol*. 2012;4:16125.
152. Zaleh AA, Salehi-Vaziri A, Pourhajibagher M, Bahador A. The synergistic effect of Nano-propolis and curcumin-based photodynamic therapy on remineralization of white spot lesions: An ex vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022;38:102789.
153. Øgaard B, Larsson E, Henriksson T, Birkhed D, Bishara SE. Effects of combined application of antimicrobial and fluoride varnishes in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;120(1):28-35.
154. Govindaraj A, Paulpandian SS, Shanmugam R. Effect of chlorhexidine and fluoride varnish on the incidence of white spot lesions in orthodontic patients. *Annals of Dental Specialty*. 2023;(11)1:35-9.
155. Shimpo Y, Nomura Y, Sekiya T, Arai C, Okada A, Sogabe K, i ostali. Effects of the Dental Caries Preventive Procedure on the White Spot Lesions during Orthodontic Treatment-An Open Label Randomized Controlled Trial. *J Clin Med*. 2022;11(3):854.
156. Restrepo M, Bussaneli DG, Jeremias F, Cordeiro RC, Raveli DB, Magalhães AC, i ostali. Control of White Spot Lesions with Use of Fluoride Varnish or Chlorhexidine Gel During Orthodontic Treatment A Randomized Clinical Trial. *J Clin Pediatr Dent*. 2016;40(4):274-80.
157. Xie Z, Yu L, Li S, Li J, Liu Y. Comparison of therapies of white spot lesions: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):346.

158. Perrini F, Lombardo L, Arreghini A, Medori S, Siciliani G. Caries prevention during orthodontic treatment: In-vivo assessment of high-fluoride varnish to prevent white spot lesions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2016;149(2):238-43.
159. Stecksén-Blicks C, Renfors G, Oscarson ND, Bergstrand F, Twetman S. Caries-preventive effectiveness of a fluoride varnish: a randomized controlled trial in adolescents with fixed orthodontic appliances. *Caries Res.* 2007;41(6):455-9.
160. Srivastava K, Tikku T, Khanna R, Sachan K. Risk factors and management of white spot lesions in orthodontics. *J Orthod Sci.* 2013;2(2):43-9.

8. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Tadeja Blagec rođena je 5. kolovoza 1995. godine u Zagrebu, gdje je završila Osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića i Nadbiskupsku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti. Godine 2014. upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu kojeg završava 2020. godine. Tijekom studija nagrađena je Rektorovom nagradom za individualni znanstveni i umjetnički rad u akademskoj godini 2019./2020. i dobitnica je Stipendija za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2018./2019. i 2019./2020.

Godine 2021. upisuje postdiplomski doktorski studij i zapošljava se na radno mjesto asistenta na Zavodu za ortodonciju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je priznanja za najbolje ocijenjenog nastavnika na suradničkom radnom mjestu u akademskoj godini 2023./2024. na VI. godini studija. Na 11. Međunarodnom kongresu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2025. godine osvojila je nagradu za najbolju oralnu prezentaciju pod naslovom *The effect of photodynamic therapy on subgingival bacteria and the development of white spot lesions*.

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih kongresa. Autor je i koautor znanstvenih i stručnih članaka objavljenih u domaćim i međunarodnim recenziranim časopisima.

Popis radova

i) Radovi objavljeni u časopisima u WoS Science Citation Index Expanded bazi podataka (WoS SCIE) - kvartil prema Journal Citation Reports (JCR)

1. **Blagec T**, Šimunović L, Budimir A, Gabrić D, Meštrović S. The influence of photodynamic therapy on the supragingival plaque accumulation and bacterial composition in orthodontic patients: a randomized controlled trial. Eur J Orthod. 2025;47(5):cjaf072. (IF: 2.7; WoS- Q1), *rad proizašao iz doktorskog istraživanja*
2. **Blagec T**, Milatić K, Markusi M, Šimunović L, Meštrović S. Self-perception and self-recognition of facial profiles in adolescents referred to orthodontic treatment. Angle Orthod. 2024;94(6):672-7. (IF: 3.2; WoS- Q1)

3. Šimunović L, **Blagec T**, Šutej I, Meštrović S. Do Oral Antiseptics Affect the Force Degradation of Elastomeric Chains? Appl Sci. 2023;13(12):7290. (IF: 2.5; WoS- Q1)
4. Šimunović L, **Blagec T**, Meštrović S. The Influence of Different Cleaning Protocols on the Surface Roughness of Orthodontic Retainers. Appl Sci. 2023;13(3):1319. (IF: 2.5; WoS- Q1)
5. **Blagec T**, Crnarić I, Homolak D, Pondeljak N, Buljan M, Lugović-Mihić L. Association between allergic reactions and lip inflammatory lesions (cheilitis). Acta Clin Croat. 2023;62(3):415-25. (IF: 0.7; WoS- Q3)
6. **Blagec T**, Glavina A, Špiljak B, Bešlić I, Bulat V, Lugović-Mihić L. Cheilitis: A cross-sectional study-multiple factors involved in the aetiology and clinical features. Oral Dis. 2023;29(8):3360-71. (IF: 2.9; WoS- Q1)

ii) Radovi objavljeni u časopisima u drugim bazama (WoS ESCI, Scopus itd.)

1. Pavlić A, **Blagec T**, Meštrović S. Effect of verbal and written information on the perception of pain and analgesic consumption, in adolescent orthodontic patients: A randomised controlled trial. J Orthod. 2025;52(1):37-44.
2. **Blagec T**, Šimunović L, Pili Gjumljčić S, Šutej I, Meštrović S. Influence of pH levels and beverage exposure on force decay and color stability of orthodontic elastomeric chains: An experimental study. Saudi Dent J. 2024;36(2):308-14.
3. Markusi M, **Blagec T**, Šimunović L, Lapter Varga M, Meštrović S. Awareness and usage of mobile applications as an orthodontic diagnostic tool among Croatian orthodontic clinicians. J Orthod. 2024;51(2):130-6.
4. Šimunović L, **Blagec T**, Meštrović S. Resistance of PETG Materials on Thermocycling and Brushing. Dent J (Basel). 2023;11(5):135.

5. Lugović-Mihić L, Špiljak B, **Blagec T**, Delaš Aždajić M, Franceschi N, Gašić A, Parać E. Factors Participating in the Occurrence of Inflammation of the Lips (Cheilitis) and Perioral Skin. *Cosmetics*. 2023;10(1):9.
6. Šimunović L, **Blagec T**, Vrankić A, Meštrović S. Color Stability of Orthodontic Ceramic Brackets and Adhesives in Potentially Staining Beverages-In Vitro Study. *Dent J (Basel)*. 2022;10(7):115.
7. Lugović-Mihić L, **Blagec T**, Japundžić I, Skroza N, Delaš Adžajić M, Mravak-Stipetić M. Diagnostic management of cheilitis: an approach based on a recent proposal for cheilitis classification. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2020;29(2):67-72.

iii) Sažetci s međunarodnih i domaćih kongresa

1. **Blagec T**, Šimunović L, Meštrović S. The effect of photodynamic therapy on dental plaque in orthodontic patients. 100th Congress of the European Orthodontic Society, Krakov, Poljska, 2. - 6. lipnja 2025. *(međunarodni, poster prezentacija proizašla iz rezultata doktorata)*
2. **Blagec T**, Šimunović L, Meštrović S. The effect of photodynamic therapy on subgingival bacteria and the development of white spot lesions. 11th International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb, Split, Republika Hrvatska, 11. - 12. travnja 2025. *(međunarodni, oralna prezentacija proizašla iz rezultata doktorata)*
3. Čotić D, Plantak V, Pavoković M, **Blagec T**, Lapter Varga M, Anić Milošević S. The assessment of accuracy of digital gnathometric analysis performed on pretreatment orthodontic casts. 10th International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb, Zagreb, Republika Hrvatska, 8. - 9. ožujka 2024.
4. Duski R, Kolak Spajić M, **Blagec T**, Šimunović L, Anić Milošević S, Lapter Varga M. Dimensional changes of dental arches during fixed orthodontic treatment in participants exhibiting class ii malocclusion. 10th International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb, Zagreb, Republika Hrvatska, 8. - 9. ožujka 2024.

5. Šimunović L, **Blagec T**, Šutej I, Meštrović S. The effect of thermocycling and oral antiseptics on force degradation of elastomeric chains: an in vitro study. 9th International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb, Dubrovnik, Republika Hrvatska, 24. - 25. ožujka 2023.

6. Šimunović L, **Blagec T**, Meštrović S. Do termocycling and brushing affect stability of pet G orthodontic retainers? 9th International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb, Dubrovnik, Republika Hrvatska, 24. - 25. ožujka 2023.

7. Stunja M, **Blagec T**, Meštrović S. Awareness and usage of mobile applications as an orthodontic diagnostic tool. 55th Annual Congress of the KAO and the 13th Asian Pacific Orthodontic Congress(APOC), Seoul, Republika Koreja, 28. - 30. listopada 2022.

8. **Blagec T**, Stunja M, Meštrović S. Effect of verbal and written information on the perception of pain and analgesic consumption in adolescent orthodontic patients. 53rd SIDO 8th MOIP International Congress, Firenca, Italija, 13. - 16. listopada 2022.

9. Šimunović L, Vrankić A, **Blagec T**, Meštrović S. Evaluation of the color stability of esthetic orthodontic brackets. 8th International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb, Rovinj, Republika Hrvatska, 8. - 9. travnja 2022.

10. **Blagec T**, Lugović Mihić L, Kuna M. The association between psychological stress, allergies and cheilitis. 5. Hrvatski kongres psihodermatologije s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Republika Hrvatska, 2. - 4. rujna 2021.

11. **Blagec T**, Briški M, Peroš K. Intraoral fluoride delivery systems during orthodontic treatment. 9th Croatian Congress of Pharmacology with International Participation, Zagreb, Republika Hrvatska, 25. - 28. rujna 2019.