

ROLUL BIOMARKERILOR SALIVARI AI HOMEOSTAZIEI CALCIULUI ÎN PROGNOSTICUL CARIEI DENTARE LA COPIII NĂSCUȚI PREMATUR

Olga Bălțeanu, asistent universitar,
Catedra de chirurgie oro-maxilo-facială pediatrică
și pedodonție „Ion Lupan”,
USMF „Nicolae Testemițanu”
Ana-Maria Coban, studenta anului V, Facultatea
de Stomatologie, USMF „Nicolae Testemițanu”
Aurelia Spinei, conferențiar universitar,
Catedra de chirurgie oro-maxilo-facială pediatrică
și pedodonție „Ion Lupan”,
USMF „Nicolae Testemițanu”

Rezumat

Introducere. Nașterea prematură reprezintă o problemă majoră de sănătate publică, asociată cu o crescută morbiditate și mortalitate neonatală. **Scopul studiului:** estimarea rolului biomarkerilor salivari ai homeostaziei calciului (Ca) în prognosticul cariei dentare (CD) la copiii născuți prematur. **Material și metode.** A fost efectuat un studiu clinic de tip caz-martor pe un eșantion de 621 de copii cu vârste de 1-3 ani. În lotul de cercetare (L_1) au fost incluși 207 de copii născuți prematur. Lotul martor (L_0) a fost constituit din 414 de copii convențional sănătoși. Au fost estimați indicii de experiență carioasă. S-au apreciat biomarkerii salivari ai homeostaziei Ca: nivelul vitaminei D, hormonului paratiroidian (PTH), Ca și fosfaților (Pi). **Rezultate.** CD timpurie severă a fost de 6,26 ori mai frecventă la copiii din L_1 , comparativ cu L_0 . La copiii din L_1 s-a depistat scăderea semnificativă a nivelului Vitaminei D și relației Ca/Pi în fluidul oral (FO), simultan cu creșterea nivelului PTH, în raport cu subiecții din L_0 . **Concluzii.** Deficitul vitaminei D, creșterea producerii PTH și scăderea relației Ca/Pi în FO pot fi utilizați în calitate de indicatori a tulburării homeostaziei Ca și a evoluției rampante a CD la copiii născuți prematur.

Cuvinte cheie: copii născuți prematur, carie dentară, homeostazia calciului.

Introducere

Nașterea prematură (NP) până în prezent continua să rămână una din provocările actuale, nu doar prin frecvența crescută, dar și prin impactul medico-social, familial, cultural și demografic [1]. NP și malformațiile congenitale sunt cele mai importante cauze de morbiditate și mortalitate neonatală, cu consecințe tardive grave. NP este responsabilă de aproximativ 50% din mortalitatea perinatală, între 70-80% din mortalitatea neonatală precoce, peste 65-75% din mortalitatea infantilă, ca și 40% din morbiditatea neonatală și 75%

THE ROLE OF SALIVARY BIOMARKERS IN CALCIUM HOMEOSTASIS AND THE PREDICTION OF DENTAL CARIES IN PREMATURELY BORN CHILDREN

Olga Balțeanu, university assistant,
„Ion Lupan” Department of Oral and Maxillofacial
Surgery and Pedodontics,
SUMPh „Nicolae Testemițanu”
Ana-Maria Coban, 5th-year Student,
Faculty of Dentistry
Aurelia Spinei, associate professor,
„Ion Lupan” Department of Oral and Maxillofacial
Surgery and Pedodontics,
SUMPh „Nicolae Testemițanu”

Summary

Introduction. Premature birth represents a major public health issue associated with increased neonatal morbidity and mortality. **The aim of the study:** to examine the role of salivary biomarkers of calcium homeostasis (Ca) in the prognosis of dental caries (DC) in prematurely born children. **Materials and Methods:** A case-control clinical study was conducted on a sample of 621 children aged 1-3 years. The research group (L_1) included 207 prematurely born children, while the control group (L_0) consisted of 414 conventionally healthy children. Caries experience indices were assessed and salivary biomarkers of Ca homeostasis were evaluated, including levels of vitamin D, parathyroid hormone (PTH), Ca, and phosphates (Pi). **Results:** Severe early DC was 6.26 times more frequent in L_1 children compared to L_0 . In L_1 children, a significant decrease in vitamin D levels and the Ca/Pi ratio in oral fluid (OF) was observed, along with an increase in PTH levels, compared to L_0 subjects. **Conclusions:** Vitamin D deficiency, increased PTH production, and a decreased Ca/Pi ratio in OF can be used as indicators of Ca homeostasis disruption and the rampant progression of DC in prematurely born children.

Keywords: prematurely born children, dental caries, calcium homeostasis.

Introduction

Premature birth (PB) continues to be one of the current challenges, not only due to its increased frequency but also because of its medical, social, familial, cultural, and demographic impact [1]. PB and congenital malformations are the most significant causes of neonatal morbidity and mortality, leading to serious long-term consequences. PB is responsible for approximately 50% of perinatal mortality, 70-80% of early neonatal mortality, over 65-75% of infant mortality, and 40% of neonatal morbidity, as well as 75% of deaths in newborns not related to congenital defects. Low birth

din decesele nou-născuților ce nu sunt determinate de defecte congenitale. Greutatea mică la naștere poate avea drept consecințe mortalitate infantilă, un risc crescut de morbiditate precoce și tardivă, precum ar fi paralizie cerebrală, tulburări convulsive, retard mental sever și afecțiuni ale tractului respirator [2].

Organizația Mondială a Sănătății (OMS) definește „nașterea prematură ca fiind orice naștere înainte de 37 de săptămâni de gestație finalizate, sau mai puțin de 259 de zile de la prima zi a ultimei menstruații a femeii, cu o greutate mai mică de 2500 g” [3]. Conform datelor epidemiologice, în ultimii 30 de ani nu se observă o tendință de scădere a nașterilor premature, rata acestora menținându-se la 10-15%, în funcție de nivelul socio-economic al țării [4]. Astăzi în lume se nasc 131 milioane de copii, dintre care 13 milioane de copii sunt prematuri. În Moldova, anual se nasc prematur mai mult de 1700 de copii, sau 5 % din toate nașterile [4, 5]. Potrivit datelor OMS la nivel mondial, în fiecare an se înregistrează 15 milioane de nașteri premature, 85% dintre acestea având loc între săptămâna 32 și 37 de sarcină, rata fiind în creștere în aproape toate țările. În ultimul deceniu, în țările europene nașterile premature au crescut cu aproximativ 50% printre femeile cu risc scăzut, cu vârste cuprinse între 20 și 40 de ani [3].

Peste un milion de copii mor anual din cauza complicațiilor care apar la nașterea prematură. Mulți dintre cei care supraviețuiesc sunt la un risc semnificativ mai mare de a dezvolta complicații neurologice, cum ar fi disfuncții senzoriale, cognitive și paralizie cerebrală [4, 5]. Povara economică și psihosocială a societății este considerabilă, fiind determinată de costul enorm estimat pentru îngrijirea acestor copii. Iată de ce nașterea prematură și consecințele acesteia reprezintă o problemă majoră de sănătate atât în Republica Moldova, cât și în întreaga lume. Îngrijirile și tratamentul copiilor prematuri constituie o problemă complicată, ținând cont de faptul că, acești copii se nasc cu o patologie polisistemică și în majoritatea cazurilor pe fundalul unei patologii materne preexistente sarcinii [5].

Din cauza tulburărilor de creștere și dezvoltare, deficiențelor de nutriție sau malnutriției și patologiei polisistemice, copiii născuți prematur și cu o greutate mică la naștere sunt mult mai susceptibili la dezvoltarea dereglărilor funcționale din partea tuturor sistemelor de organe, inclusiv și din partea sistemului stomatognat [6-8]. Numeroase studii au sugerat că copiii născuți prematur sunt mai predispuși la apariția cariei dentare (CD) de la vârsta fragedă din cauza tulburărilor de creștere și dezvoltare a dentiției primare, a dificultăților în menținerea igienei orale și a mineralizării smalțului [6, 8-12].

Mai mulți autori au supoziționat că susceptibilitatea crescută la CD la copiii de diferite vârste, ar putea fi provocată de modificarea homeostaziei calciului din cauze sistemice sau locale în timpul perioadelor pre- și postnatale de dezvoltare [13-19]. Cercetările recente susțin aceste constatări și menționează suplimentar

weight can result in infant mortality and an increased risk of early and late morbidity, including cerebral palsy, convulsive disorders, severe mental retardation, and respiratory tract conditions [2].

The World Health Organization (WHO) defines „premature birth as any birth that occurs before 37 completed weeks of gestation, or less than 259 days from the first day of the woman's last menstrual period, with a weight of less than 2500 g” [3]. According to epidemiological data, there has been no observed trend in the reduction of premature births over the last 30 years, with the rate remaining at 10-15%, depending on the socio-economic level of the country [4]. Currently, 131 million children are born worldwide each year, of which 13 million are premature. In Moldova, more than 1,700 premature children are born annually, accounting for 5% of all births [4,5]. According to WHO data, 15 million premature births are recorded worldwide each year, with 85% occurring between weeks 32 and 37 of pregnancy, and the rate is increasing in nearly all countries. In the last decade, premature births in European countries have increased by approximately 50% among low-risk women aged 20 to 40 [3].

Over a million children die each year due to complications arising from premature birth. Many of those who survive are at a significantly higher risk of developing neurological complications, such as sensory and cognitive dysfunction and cerebral palsy [4, 5]. The economic and psychosocial burden on society is considerable, driven by the enormous estimated costs of caring for these children. This is why premature birth and its consequences represent a major health issue both in the Republic of Moldova and globally. The care and treatment of premature infants constitute a complicated challenge, considering that these children are born with multisystemic pathology and, in most cases, against a background of pre-existing maternal conditions during pregnancy [5].

Due to growth and development disorders, nutritional deficiencies or malnutrition, and multisystemic pathology, prematurely born children with low birth weight are much more susceptible to developing functional disorders affecting all organ systems, including the stomatognathic system [6, 8]. Numerous studies have suggested that prematurely born children are more prone to the onset of dental caries (DC) from an early age due to disorders in the growth and development of primary dentition, difficulties in maintaining oral hygiene, and enamel mineralization issues [6, 8-12].

Several authors have hypothesized that the increased susceptibility to DC in children of various ages may be caused by changes in calcium homeostasis due to systemic or local factors during the pre- and postnatal developmental periods [13,19]. Recent research supports these findings and additionally highlights the impact of nutritional deficiencies, particularly inadequate vitamin D metabolism and compromised mineral absorption, as risk factors for DC in primary dentition [20, 23].

impactul deficiențelor de nutriție, în special metabolismului deficitar al vitaminei D și lipsa sau absorbția minerală compromisă în calitate de factori de risc pentru CD în dentiția primară [20-23].

Componentele biologice cheie ale homeostaziei calciului sunt 1,25-dihydroxivitamina D (1,25(OH)₂D), hormonul paratiroidian (PTH), calciul (Ca) și fosfați (Pi). Important este că acestea sunt și componentele biologice cheie ale formării smalțului dentar [16,17, 22-24]. Deși mai mulți autori în urma studiilor clinice au semnalat creșterea prevalenței CD la copiii cu dereglarea metabolismului fosfocalcic, a rolul tulburărilor homeostaziei Ca în declanșarea procesului de hipomineralizare a smalțului dentar, la copiii nu au fost suficient studiate, iar stabilirea acestora va permite elaborarea unor noi strategii personalizate de prevenire și de tratament a bolii carioase la copiii născuți prematur. Prin urmare, este actuală depistarea factorilor de risc pentru apariția CD, care va permite elaborarea unor noi strategii personalizate de prevenire și de tratament la copiii născuți prematur.

Scopul studiului: estimarea rolului biomarkerilor salivari ai homeostaziei calciului în prognosticul cariei dentare la copiii născuți prematur.

Material și metode

Lucrarea a fost efectuată în cadrul Catedrei de chirurgie oro-maxilo-facială pediatrică și pedodonție „Ion Lupan” a USMF „Nicolae Testemițanu”. A fost efectuat un studiu clinic de tip caz-martor. Pentru a evidenția impactul tulburărilor de metabolism fosfo-calcic asupra susceptibilității la CD a copiilor născuți prematur au fost studiați biomarkerii salivari ai homeostaziei calciului la un eșantion de 621 de copii cu vârste cuprinse între 1 și 3 ani, repartizați în 2 loturi identice după structură. Astfel, lotul de cercetare L₁ a fost constituit din 207 de copii născuți prematur (după datele anamnezei), iar lotul martor L₀ – din 414 de copii convențional sănătoși.

Criteriile de selectare a subiecților în studiu: vârsta 1- 3 ani, copii născuți prematur (după datele anamnezei) subiecți la maladii severe ale SNC, acordul informat al părinților sau reprezentanților legali.

Criteriile de excludere a copiilor din studiu: lipsa acordului informat al părinților sau reprezentanților legali pentru participarea în studiu.

Metode clinice de cercetare. Colectarea datelor s-a efectuat prin aplicarea instrumentelor conform chestionarelor pentru înregistrarea statutului oral propuse de OMS (WHO Oral Health Questionnaire for Children, 2013) [26]. Au fost estimați indicii de experiența carioasă (indicele de prevalență a CD (IP) și indicii co, cos).

Metode paraclinice de cercetare. Metode biochimice de cercetare a fluidului oral. Pentru efectuarea studiilor biochimice fluidul oral (FO) s-a colectat nestimulat, dimineata *à jeun*, în eprubete de plastic sterile care au fost transportate în Laboratorul Științific de biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu”. *Markerii metabolismului osos și fosfocalcic.* Evaluarea biomarkerilor salivari ai homeostaziei calciului (dozarea calciului (Ca) și

The key biological components of calcium homeostasis are 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D), parathyroid hormone (PTH), calcium (Ca), and phosphates (Pi). Importantly, these are also the key biological components involved in the formation of dental enamel [16, 17, 22-24]. Although several authors have reported an increased prevalence of DC in children with disrupted phosphocalcic metabolism, the role of calcium homeostasis disorders in triggering the process of enamel hypomineralization in children has not been sufficiently studied. Understanding these factors will allow for the development of new personalized strategies for the prevention and treatment of caries disease in prematurely born children. Therefore, identifying risk factors for the onset of DC is crucial, as it will facilitate the formulation of new personalized prevention and treatment strategies for prematurely born children.

Aim of the study: to investigate the role of salivary biomarkers of calcium homeostasis in the prognosis of dental caries in prematurely born children.

Material and Methods

The study was conducted at the „Ion Lupan” Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Pedodontics, at the SUMPh „Nicolae Testemițanu”. A case-control clinical study was carried out to highlight the impact of phosphocalcic metabolism disorders on the susceptibility to DC in prematurely born children. Salivary biomarkers of calcium homeostasis were studied in a sample of 621 children aged 1 to 3 years, divided into two structurally identical groups. Thus, the research group (L₁) consisted of 207 prematurely born children (according to anamnesis), while the control group (L₀) included 414 conventionally healthy children.

Selection criteria for study subjects: Age 1-3 years, prematurely born children (according to anamnesis), severe central nervous system (CNS) diseases, and informed consent from parents or legal representatives.

Exclusion criteria for children from the study: Lack of informed consent from parents or legal representatives for participation in the study.

Clinical Research Methods. Data collection was performed using tools in accordance with the oral health status recording questionnaires proposed by the WHO (WHO Oral Health Questionnaire for Children, 2013) [26]. Caries experience indices were assessed, including the dental caries prevalence index (IP) and co and cos indices.

Paraclinical Research Methods. *Biochemical Research Methods for Oral Fluid.* For biochemical studies, unstimulated oral fluid (OF) was collected in sterile plastic tubes in the morning, after fasting, and transported to the Scientific Laboratory of Biochemistry at USMF „Nicolae Testemițanu.” *Bone and Phosphocalcic Metabolism Markers.* The evaluation of salivary biomarkers of calcium homeostasis (calcium (Ca) and phosphate (Pi) levels, 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D), parathyroid hormone (PTH)) was performed using standard EliTech kits (France), in

fosfaților (Pi), 1,25-dihydroxivitaminei D (1,25(OH)₂D, hormonului paratiroidian (PTH)) s-a realizat cu seturile standard EliTech (Franța), în conformitate cu recomandările producătorilor și cele elaborate de Gudumac V. și coaut., 2010 [27].

Studiul a fost efectuat cu respectarea principiilor de etică a cercetării. Analiza datelor a fost realizată cu aplicarea *Epi Info 7*.

Rezultate și discuții

Subiecții luați în observație sunt nativi și rezidenți în Republica Moldova. Repartiția copiilor în loturi a fost identică după sexe și mediul de trai. Din numărul total de copii născuți prematur examinați au prevalat numeric băieții – 57,97%, comparativ cu fetele – 42,03%. Copiii din mediul rural au prevalat numeric (55,56%), comparativ cu cei proveniți din mediul urban (44,44%). Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele statistice care indică o frecvență mai mare NP în Republica Moldova la băieți și în zone rurale.

Gradul de prematuritate a copiilor incluși în studiu a fost apreciat după datele colectate din anamneză, în funcție de vârsta gestațională. Astfel, nașterea prematură aproape de termen cu vârsta gestațională cuprinsă între 34 și 36 de săptămâni a fost înregistrată la 29,95% din copii. Nașterea prematură moderată (vârsta gestațională de 32-33 de săptămâni) s-a constatat la 30,43% din subiecți. Naștere prematură severă (vârsta gestațională de 28-31 de săptămâni) a fost semnalată la 32,85% din copii, iar naștere prematură extremă (vârsta gestațională de 22-27 de săptămâni) – la 6,76% din subiecți, respectiv.

Analiza rezultatelor aprecierii nivelului de morbiditate prin CD a evidențiat decalajul dintre indicatorii de experiență carioasă la copiii născuți prematur și cei convențional sănătoși. În figura 1 sunt reflectate valorile indicelui de prevalență a CD (IP) la copiii născuți prematur (56,04%), care a fost cu 21,26% mai mare comparativ cu copiii convențional sănătoși (34,78%).

accordance with the manufacturers' recommendations and those developed by Gudumac V. et al., 2010 [27].

The study was conducted in accordance with the principles of research ethics. Data analysis was performed using *Epi Info 7*.

Results and Discussions

The subjects observed were natives and residents of the Republic of Moldova. The distribution of children in the groups was identical in terms of sex and living environment. Among the total number of examined prematurely born children, boys predominated numerically (57.97%) compared to girls (42.03%). Children from rural areas also predominated numerically (55.56%) compared to those from urban areas (44.44%). These results are consistent with statistical data indicating a higher frequency of premature births among boys and those in rural areas in the Republic of Moldova.

The degree of prematurity of the children included in the study was assessed based on data collected from anamnesis, according to gestational age. Thus, near-term premature birth with a gestational age between 34 and 36 weeks, was recorded in 29.95% of the children. Moderate prematurity (gestational age of 32-33 weeks) was found in 30.43% of subjects. Severe prematurity (gestational age of 28-31 weeks) was reported in 32.85% of children, while extreme prematurity (gestational age of 22-27 weeks) occurred in 6.76% of subjects, respectively.

The analysis of the results regarding the level of morbidity due to DC which highlighted the disparity between caries experience indicators in prematurely born children and those who are conventionally healthy. Figure 1 shows the values of the dental caries prevalence index (IP) in prematurely born children (56.04%), which was 21.26% higher than that of conventionally healthy children (34.78%).

The values of caries experience indicators were higher in prematurely born children, representing: $df=2.27\pm 0.13$, compared to $df=0.48\pm 0.04$ estimated

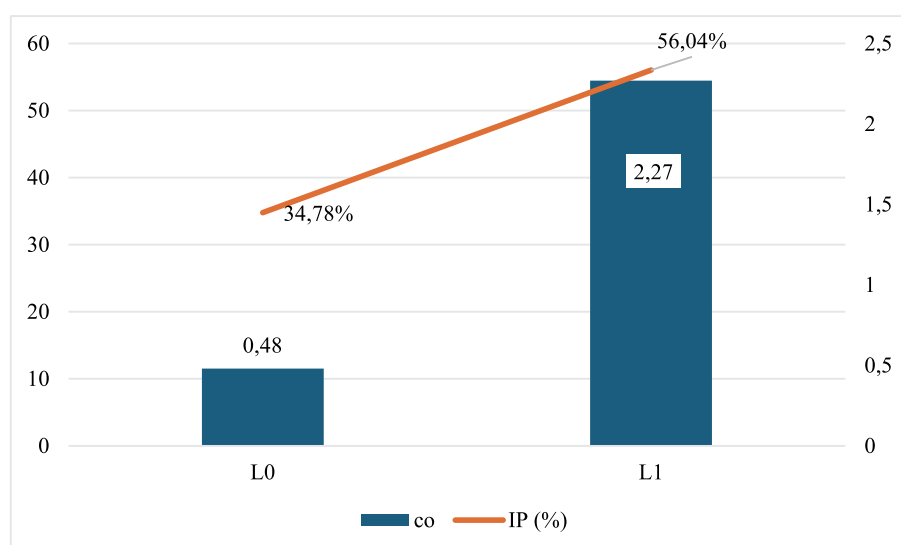


Fig. 1. Valorile indicatorilor de experiență carioasă la copiii născuți prematur.

Fig. 1. Values of caries experience indicators in prematurely born children.

Valorile indicatorilor de experiență carioasă au fost mai mari la copiii născuți prematur, reprezentând: $co=2,27\pm 0,13$, comparativ cu $co=0,48\pm 0,04$, estimat la copiii convențional sănătoși. Linia de trend a indicatorilor de experiență carioasă indică o eventuală creștere semnificativă a acestora la copiii din lotul de cercetare (L_1) și atenționează asupra necesității aplicării metodelor de prevenire a afecțiunilor dentare.

La majoritatea copiilor convențional sănătoși (L_0), s-a înregistrat o succesiune ritmică a perioadei de cariorezistență și carioactivitate. De obicei, o perioadă de vulnerabilitate este urmată de una de rezistență, și invers o perioadă de rezistență este urmată de una de vulnerabilitate. Evoluția bolilor somatice și medicația administrată la copiii din lotul de cercetare au avut un impact semnificativ asupra perioadelor de carioactivitate sporită.

În comparație cu copiii convențional sănătoși, la copiii născuți prematur s-a depistat carioactivitate intensă de 6,26 ori mai frecvent (Fig. 2). Prin urmare, s-a observat o activitate carioasă intensă la 36,23% din copiii L_1 și 5,79% din copiii L_0 . Semnele care identifică acest tipar carial sunt următoarele: începutul anarhic al cariei, care afectează egal atât zonele vulnerabile, cât și cele immune, tendința de a afecta toate grupurile dentare, inclusiv dinții frontali inferiori și caninii, simultan pot fi afectate toate suprafețele aceluiași dinte. Pentru toate grupurile dentare, timpul posteruptiv necesar pentru debutul cariei este, de obicei, foarte scurt. Dinții pot fi afectați chiar în timpul perioadei eruptive, iar evoluția cariei este acută, cu o viteză mare de extindere în suprafață și profunzime.

in conventionally healthy children. The trend line of the caries experience indicators suggests a significant potential increase in these indicators among the children in the research group (L_1) and emphasizes the need for the implementation of dental disease prevention methods.

In the majority of conventionally healthy children (L_0), a rhythmic succession of caries resistance and caries activity periods was recorded. Usually, a period of vulnerability is followed by a period of resistance, and conversely, a period of resistance is followed by a period of vulnerability. The evolution of somatic diseases and the medication administered to the children in the research group significantly impacted the periods of increased caries activity.

In comparison to conventionally healthy children, premature children exhibited intense caries activity 6.26 times more frequently (Fig. 2). Consequently, intense caries activity was observed in 36.23% of children in L_1 and 5.79% of children in L_0 . The signs identifying this carious pattern include: the anarchic onset of caries, which equally affect both vulnerable and immune areas, a tendency to impact all dental groups, including lower anterior teeth and canines, and the possibility of all surfaces of the same tooth being affected simultaneously. For all dental groups, the post-eruptive time required for the onset of caries is usually very short. Teeth can be affected even during the eruptive period, and the progression of caries is acute, with a rapid rate of extension in both surface area and depth.

It is well known that calcium (Ca) homeostasis is maintained by parathyroid hormone (PTH) along

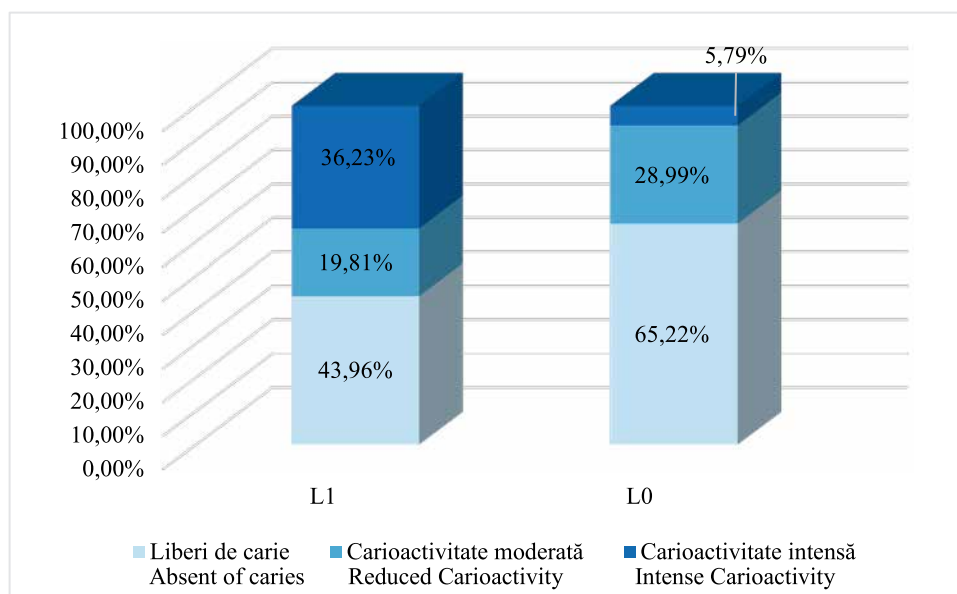


Fig. 2. Ponderea gradului de activitate carioasă la copiii născuți prematur (%).

Fig. 2. Proportion of caries activity level in prematurely born children (%).

Este cunoscut faptul că homeostazia Ca este asigurată de către hormonul paratiroidian alături de o serie de relații reciproce care au loc între intestinul subțire, sistemul osos și rinichi. HPT stimulează reabsorbția osteoclastică a osului și absorbția Ca la nivelul tubului distal al nefronului, reglând în același timp acțiunea vitaminei D, de creștere a absorbției calciului la nivel intestinal. Receptorii extracelulari ai Ca prezintă sensibilitate înaltă și reacționează chiar și la scăderi infime ale mineralului, stimulând sinteza de PTH la nivelul glandelor paratiroidiene [18].

Analiza rezultatelor aprecierii biomarkerilor salivari ai homeostaziei calciului (Ca, Pi, relației Ca/Pi, 1,25-dihydroxivitaminei D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), hormonului paratiroidian) a depistat diferențe semnificative între acești indicatori estimați la copiii din lotul de cercetare (L_1) și lotul martor (L_0) la care markerii menționați au fost în limitele fiziologice. La copiii din lotul L_1 a fost stabilită reducerea semnificativă a relației Ca/Pi în FO ($1:1,02\pm 0,14$, $p<0,001$), în raport cu lotul martor ($1:1,64\pm 0,23$). Conform opiniei expuse de Леонтьев B.K. și coaut., 2016, reducerea raportului Ca/Pi mai mică de 1:1,52 constituie un factor de prognostic nefavorabil al evoluției CD, cauzat de tulburarea procesului de remineralizare a smalțului [28]. Considerăm că acest fapt ar putea fi consecința tulburării homeostaziei Ca, în timpul formării matricei smalțului (faza de secreție), dar și în perioada de mineralizare a smalțului dentar (faza de maturare).

Unul dintre cele mai importante mecanisme de inițiere a CD ar putea fi tulburarea procesului de mineralizare a țesuturilor dure dentare. Din acest motiv am considerat necesar studiul comparativ al nivelului hormonilor și reglatorilor homeostaziei Ca în FO la copiii născuți prematur și cei convențional sănătoși. Rezultatele obținute reflectă o diferență statistic semnificativă a conținutului $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ și HPT în FO în raport cu copii convențional sănătoși.

În FO al copiilor din lotul de cercetare (L_1) s-a depistat reducerea nivelului vitaminei D ($22,07\pm 0,83$ $\mu\text{M/L}$, $p<0,001$) comparativ cu lotul martor ($54,05\pm 1,12$ $\mu\text{M/L}$). Deficitul de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ devine un trigger pentru tulburarea metabolismului mineral și osos, descris de mai mulți cercetători. Conform studiilor Vera V., et al., 2015, cea mai cunoscută funcție a vitaminei D este menținerea homeostaziei Ca și Pi în organism și susținerea procesului de mineralizare osoasă [18]. Efectul principal al 25-hidroxicoлекалциферolului este stimularea transportului Ca din lumenul intestinului subțire în circulația sanguină, sporind astfel concentrația serică a acestui element. Întrucât concentrațiile adecvate de Ca și Pi influențează mineralizarea osteoidului, deficitul sever de vitamina D_3 și formele ei active provoacă insuficiența mineralizării acestuia soldată cu dezvoltarea rahitismului la copii [19, 29].

În urma studiului efectuat s-a relevat valoarea crescută a nivelului HPT în FO la copiii născuți prematur ($21,58\pm 0,47$, $p<0,001$), de 3,49 ori mai mare comparativ

with a series of reciprocal relationships that occur between the small intestine, the skeletal system, and the kidneys. PTH stimulates osteoclastic bone resorption and calcium absorption at the distal nephron, while simultaneously regulating the action of vitamin D, which enhances calcium absorption in the intestine. Extracellular calcium receptors exhibit high sensitivity and respond even to minute decreases in calcium levels, stimulating the synthesis of PTH in the parathyroid glands [18].

The analysis of the results regarding salivary biomarkers of calcium homeostasis (Ca, Pi, Ca/Pi ratio, 1,25-dihydroxyvitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), parathyroid hormone) revealed significant differences between these indicators in the research group (L_1) and the control group (L_0), where these markers were within physiological limits. In the L_1 group, a significant reduction of the Ca/Pi ratio in OF was established ($1:1.02\pm 0.14$, $p<0.001$) compared to the control group ($1:1.64\pm 0.23$). According to the opinion expressed by Leontiev V.K. et al., 2016, a reduction in the Ca/Pi ratio below 1:1.52 constitutes an unfavorable prognostic factor for the progression of DC, caused by the disruption of the remineralization process of enamel [28]. We consider that this may be a consequence of disrupted calcium homeostasis during the formation of the enamel matrix (secretion phase) as well as during the enamel mineralization period (maturation phase).

One of the most important mechanisms for initiating DC could be the disruption of the mineralization process of hard dental tissues. For this reason, we considered it necessary to conduct a comparative study of the levels of hormones and regulators of calcium homeostasis in oral fluid (OF) in prematurely born children and conventionally healthy children. The obtained results reflect a statistically significant difference in the content of $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ and PTH in OF compared to conventionally healthy children.

In the OF of children from the research group (L_1), a reduction in vitamin D levels (22.07 ± 0.83 $\mu\text{M/L}$, $p<0.001$) was detected when compared to the control group (54.05 ± 1.12 $\mu\text{M/L}$). A deficiency of $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ becomes a trigger for disturbances in mineral and bone metabolism, as described by several researchers. According to the studies by Vera V. et al., 2015, the most well-known function of vitamin D is to maintain calcium (Ca) and phosphate (Pi) homeostasis in the body and to support the bone mineralization process [18]. The primary effect of 25-hydroxycholecalciferol is to stimulate the transport of Ca from the lumen of the small intestine into the bloodstream, thus increasing the serum concentration of this element. Since adequate concentrations of Ca and Pi influence osteoid mineralization, severe deficiencies of vitamin D_3 and its active forms lead to insufficient mineralization, resulting in the development of rickets in children [19,29].

Following the conducted study, a significantly elevated level of PTH in OF was revealed in prematurely

cu copiii convențional sănătoși ($6,19 \pm 0,39$), care ar putea fi provocată de deficiența vitaminei D. Dozarea HPT în FO a arătat o creștere statistic semnificativă a acesteia în special la copiii cu naștere prematură severă și extremă în anamneză. Creșterea HPT este un indicator al tulburărilor accentuate ale metabolismului mineral și osos, hiperparatiroidismul secundar fiind o reacție compensatorie a glandelor paratiroide în urma hipocalcemiei îndelungate. Dereglarea pe termen lung a homeostaziei calciului duce la mobilizarea acestuia din depozitele osoase, ceea ce provoacă sindromul de osteopenie [30].

Hormonii care reglează metabolismul Ca și vitamina D_3 influențează direct și indirect transportarea Ca în celule, inclusiv în cele osoase [29]. Gradul de asimilare a calciului în țesutul osos și de încorporare în țesuturile dure dentare este dependent de disponibilitatea Pi, necesari nu doar pentru mineralizarea acestora, dar și pentru funcționarea normală a mitocondriilor, iar aportul suficient de Ca și Pi în smalțul dentar previne apariția procesului carios chiar și la etapa de demineralizare a smalțului [8, 9, 15, 17-19]. Astfel, tulburările timpurii ale procesului de creștere și dereglarea metabolismului fosfocalcic ar putea influența susceptibilitatea la CD. Rezultatele studiilor noastre sunt în concordanță cu cele ale altor cercetători care au depistat la copiii născuți prematur tulburarea homeostaziei Ca [24, 34]. Rezultatele prezentului studiu confirmă datele obținute de noi în lucrările efectuate anterior [31-33], dar și depistate de mai mulți autori [6, 8, 9, 11, 21].

Concluzii

1. Prevalența cariei dentare la copiii născuți prematur a fost cu 21,26% mai mare comparativ cu copiii convențional sănătoși, iar activitatea carioasă intensă – de 6,26 ori mai frecventă.

2. Deficitul de vitamina D_3 , creșterea producerii PTH și scăderea relației Ca/Pi în FO pot fi utilizați ca biomarkeri salivari în prognosticul cariei dentare la copiii născuți prematur.

3. Depistarea la copiii născuți prematur a unor factori importanți de risc carios și indicatori ai evoluției agresive a CD, impune aprofundarea studiilor interdisciplinare și abordarea complexă în planificarea măsurilor cariopreventive, elaborate de echipe polivalente de medici specialiști în conformitate cu indicațiile individuale, care în cadrul îngrijirilor preventive complexe și personalizate, vor include nu doar metode locale, dar și administrarea medicației pentru echilibrarea homeostaziei calciului.

Bibliografie/Bibliography

1. Christensen A.R., Qian F., Weber-Gasparoni K. Early childhood caries among premature children enrolled in WIC: A retrospective case - Controlled study. *J Clin Images Med Case Rep.* 2021; 2(2): 1079.
2. Paladi G., Cernețchi O., Pavlenko A., Petrov V., Dondiuc I. *Protocol clinic național „Nașterea prematură”*. Chișinău, 2013, 21 p.
3. Health 2020: A European policy framework and strategy for the 21st century. Published online 2020:190.

born children ($21,58 \pm 0,47$, $p < 0,001$), which was 3.49 times higher compared to conventionally healthy children ($6,19 \pm 0,39$) this could be caused by vitamin D deficiency. The measurement of PTH in OF showed a statistically significant increase, especially in children with a history of severe and extreme prematurity. The increase in PTH is an indicator of significant disturbances in mineral and bone metabolism, with secondary hyperparathyroidism being a compensatory reaction of the parathyroid glands due to prolonged hypocalcemia. Long-term disruption of calcium homeostasis leads to the mobilization of calcium from bone reserves, resulting in osteopenia syndrome [30].

The hormones that regulate calcium (Ca) metabolism and vitamin D_3 directly and indirectly influence the transport of Ca into cells, including bone cells [29]. The degree of calcium assimilation in bone tissue and incorporation into hard dental tissues depends on the availability of phosphate (Pi), which is necessary not only for their mineralization but also for the normal functioning of mitochondria. Adequate intake of Ca and Pi in dental enamel prevents the onset of caries process even during the demineralization stage of enamel [8, 9, 15, 17-19]. Thus, early disturbances in growth processes and disruptions in phosphocalcic metabolism could influence the susceptibility to DC. Our study results align with those of other researchers who have identified calcium homeostasis disruptions in prematurely born children [24,34]. The findings of the present study confirm data previously obtained in our earlier works [31-33], as well as those identified by several other authors [6, 8, 9, 11, 21].

Conclusions:

1. The prevalence of dental caries in prematurely born children was 21.26% higher compared to conventionally healthy children, while intense caries activity was 6.26 times more frequent.

2. Vitamin D_3 deficiency, increased PTH production, and a decreased Ca/Pi ratio in OF can be used as salivary biomarkers in the prognosis of dental caries in prematurely born children.

3. Identifying significant caries risk factors and indicators of aggressive progression of DC in prematurely born children necessitates the deepening of interdisciplinary studies and a comprehensive approach in planning preventive measures. These measures should be developed by multidisciplinary teams of specialists in accordance with individual recommendations and, within complex and personalized preventive care, should include not only local methods but also medication administration to balance calcium homeostasis.

Bibliography

1. Christensen A.R., Qian F., Weber-Gasparoni K. Early childhood caries among premature children enrolled in WIC: A retrospective case - Controlled study. *J Clin Images Med Case Rep.* 2021; 2(2): 1079.
2. Paladi G., Cernețchi O., Pavlenko A., Petrov V., Dondiuc I. *Protocol clinic național „Nașterea prematură”*. Chișinău, 2013, 21 p.

- http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/199532/Health2020-Long.pdf.
4. Crivceanscaia L., Stratulat M., Calugăreanu C. Actualități în neonatologie. *Revistă științifico-practică*. Chișinău, 2018, nr. 2 (78), p.146.
 5. Ciubotaru A., Repin O., Buta G., Corcea V., Guzman I., Cobăleanu Z. Analiză comparativă a morbidității nou-născuților născuți la termen și a celor născuți prematur în Republica Moldova (studiu descriptiv retrospectiv). *Arta medica*. Chișinău, 2020, pp. 40-43.
 6. Perez I.G., Cruz P.V., Bendo C.B., Paiva S.M., Pordeus I.A., Martins C.C. Prevalence of dental caries in preschool children born preterm and/or with low birth weight: A systematic review with metaanalysis of prevalence data. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2020, nr. 30 (32), pp. 245-389.
 7. Alshehhi A., Halabi A., Hussein I., Salami A., Hassanand A. Enamel defects and caries prevalence in preterm children aged 5-10 years in Dubai. *Libyan Journal of Medicine*. 2020, nr. 15, pp.7.
 8. Lam P.P.Y., Chua H., Ekambaram M., Lo E.C.M., Yiu C. K.Y. Risk predictors of early childhood caries increment – a systematic review and meta-analysis. *J Evid Based Dent Pract*. 2022, nr. 3 (22), pp. 101732. doi: 10.1016/j.jebdp.2022.101732. PMID: 36162891.
 9. Shi L., Jia J., Li C., Zhao C., Li T., Shi H., Zhang X. Relationship between preterm, low birth weight and early childhood caries: a meta-analysis of the case-control and cross-sectional study. *Biosci Rep*. 2020, 40(8): BSR20200870. doi: 10.1042/BSR20200870. PMID: 32729621; PMCID: PMC7419784.
 10. Anil S., Anand P.S. Early Childhood Caries: Prevalence, Risk Factors, and Prevention. *Frontiers in Pediatrics*. 2021, nr. 5 (18), pp. 157. doi: 10.3389/fped.2017.00157. PMID: 28770188; PMCID: PMC5514393.
 11. Koberova R., Radochova V., Zemankova J., Ryskova L., Broukal Z., Merglova V. Evaluation of the risk factors of dental caries in children with very low birth weight and normal birth weight. *BMC Oral Health* 2021, nr. 21, pp.9.
 12. Kumar R., Thomas A.M. Evaluation of dental caries in preterm born children with enamel defects. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*. 2017, nr. 19, pp.1-5.
 13. Moloney L., Rozga M., Fenton T.R. Nutrition assessment, exposures, and interventions for very-low-birth-weight preterm infants: an evidence analysis center scoping review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2019, nr. 2 (119), pp.323-339.
 14. Bandeira Lopes L, Machado V, Botelho J, Haubek D. Molar-incisor hypomineralization: an umbrella review. *Acta Odontol Scand*. 2021;79(5):359-369. doi: 10.1080/00016357.2020.1863461.
 15. Lacruz, R.S., Habelitz, S., Wright, J.T., Paine, M.L. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev* 2017, 3(97): 939–993.
 16. Sabel N., Dietz W., Lundgren T., Nietzsche S., Odelius H., Rythen M., Rizell S., Robertson A., Noren J.G., Klingberg G. Elemental composition of normal primary tooth enamel analyzed with XRMA and SIMS. *Swed Dent J* 2009, nr. 2(33), pp. 75–83. PMID: 19728579.
 17. Sabel N., Klingberg G., Nietzsche S., Robertson A., Odelius H., Noren J.G. Analysis of some elements in primary enamel during postnatal mineralization. *Swed Dent J* 2009, nr. 2(33), pp. 85–95. PMID: 19728580.
 18. Vera V., Moran J.M., Barros P., Canal-Macias ML., Guerrero-Bonmatty, R., Costa-Fernandez C., Lavado-Garcia J.M., Roncero-Martin R., Pedrera-Zamorano J. Greater Calcium Intake is Associated with Better Bone Health Measured by Quantitative Ultrasound of the Phalanges
 3. Health 2020: A European policy framework and strategy for the 21st century. Published online 2020:190. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/199532/Health2020-Long.pdf.
 4. Crivceanscaia L., Stratulat M., Calugăreanu C. Actualități în neonatologie. *Revistă științifico-practică*. Chișinău, 2018, nr. 2 (78), p.146.
 5. Ciubotaru A., Repin O., Buta G., Corcea V., Guzman I., Cobăleanu Z. Analiză comparativă a morbidității nou-născuților născuți la termen și a celor născuți prematur în Republica Moldova (studiu descriptiv retrospectiv). *Arta medica*. Chișinău, 2020, pp. 40-43.
 6. Perez I.G., Cruz P.V., Bendo C.B., Paiva S.M., Pordeus I.A., Martins C.C. Prevalence of dental caries in preschool children born preterm and/or with low birth weight: A systematic review with metaanalysis of prevalence data. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2020, nr. 30 (32), pp. 245-389.
 7. Alshehhi A., Halabi A., Hussein I., Salami A., Hassanand A. Enamel defects and caries prevalence in preterm children aged 5-10 years in Dubai. *Libyan Journal of Medicine*. 2020, nr. 15, pp.7.
 8. Lam P.P.Y., Chua H., Ekambaram M., Lo E.C.M., Yiu C.K.Y. Risk predictors of early childhood caries increment – a systematic review and meta-analysis. *J Evid Based Dent Pract*. 2022, nr. 3 (22), pp. 101732. doi: 10.1016/j.jebdp.2022.101732. PMID: 36162891.
 9. Shi L., Jia J., Li C., Zhao C., Li T., Shi H., Zhang X. Relationship between preterm, low birth weight and early childhood caries: a meta-analysis of the case-control and cross-sectional study. *Biosci Rep*. 2020, 40(8): BSR20200870. doi: 10.1042/BSR20200870. PMID: 32729621; PMCID: PMC7419784.
 10. Anil S., Anand P.S. Early Childhood Caries: Prevalence, Risk Factors, and Prevention. *Frontiers in Pediatrics*. 2021, nr. 5 (18), pp. 157. doi: 10.3389/fped.2017.00157. PMID: 28770188; PMCID: PMC5514393.
 11. Koberova R., Radochova V., Zemankova J., Ryskova L., Broukal Z., Merglova V. Evaluation of the risk factors of dental caries in children with very low birth weight and normal birth weight. *BMC Oral Health* 2021, nr. 21, pp.9.
 12. Kumar R., Thomas A.M. Evaluation of dental caries in preterm born children with enamel defects. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*. 2017, nr. 19, pp.1-5.
 13. Moloney L., Rozga M., Fenton T.R. Nutrition assessment, exposures, and interventions for very-low-birth-weight preterm infants: an evidence analysis center scoping review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2019, nr. 2 (119), pp.323-339.
 14. Bandeira Lopes L, Machado V, Botelho J, Haubek D. Molar-incisor hypomineralization: an umbrella review. *Acta Odontol Scand*. 2021;79(5):359-369. doi: 10.1080/00016357.2020.1863461.
 15. Lacruz, R.S., Habelitz, S., Wright, J.T., Paine, M.L. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev* 2017, 3(97): 939–993.
 16. Sabel N., Dietz W., Lundgren T., Nietzsche S., Odelius H., Rythen M., Rizell S., Robertson A., Noren J.G., Klingberg G. Elemental composition of normal primary tooth enamel analyzed with XRMA and SIMS. *Swed Dent J* 2009, nr. 2(33), pp. 75–83. PMID: 19728579.
 17. Sabel N., Klingberg G., Nietzsche S., Robertson A., Odelius H., Noren J.G. Analysis of some elements in primary enamel during postnatal mineralization. *Swed Dent J* 2009, nr. 2(33), pp. 85–95. PMID: 19728580.
 18. Vera V., Moran J.M., Barros P., Canal-Macias ML., Guerrero-Bonmatty, R., Costa-Fernandez C., Lavado-Garcia J.M., Roncero-Martin R., Pedrera-Zamorano J. Greater Calcium Intake is Associated with Better Bone Health Measured by Quantitative Ultrasound of the Phalanges

- in Pediatric Patients Treated with Anticonvulsant Drugs. *Nutrients* 2015, nr. 7(12), pp. 9908–9917. <https://doi.org/10.3390/nu7125517>.
19. Voloh A. Modificările clinico-biologice și genetice în statutul vitaminei D în perioadele pre- și postnatală a copilului. Autoref. tezei dr. hab. în șt. med. Chișinău. 2016, 46 p.
 20. Milgrom P, Riedy C.A., Weinstein P, Tanner A.C.R., Manibusan L., Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dentistry Oral Epidemiology*. 2013, nr. 4 (28), pp.295-306.
 21. Occhi-Alexandre I.G.P., Cruz P.V., Bendo C.B., Paiva S.M., Pordeus I.A., Martins C.C. Prevalence of dental caries in preschool children born preterm and/or with low birth weight: a systematic review with meta-analysis of prevalence data. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2019, nr. 3 (30), pp.265-275.
 22. Hubbard, M.J.: Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(11), 437–466 (2000). <https://doi.org/10.1177/10454411000110040401>
 23. Lacruz R.S., Habelitz S., Wright J.T., Paine M.L. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev*, 2017, nr. 3(97) 939–993. <https://doi.org/10.1152%2Fphysrev.00030.2016>
 24. Merheb R., Arumugam C., Lee W., Collin M., Nguyen C., Groh-Wargo S., Nelson S. Neonatal serum phosphorus levels and enamel defects in very low birth weight infants. *J Parenter Enteral Nutr* 2016, nr. 6(40), 835–841. <https://doi.org/10.1177/0148607115573999>
 25. Schüller I.M., Haberstroh S., Dawczynski K., Lehmann T., Heinrich-Weltzien R. Dental caries and developmental defects of enamel in the primary dentition of preterm infants: case-control observational study. *Caries Research*. 2018, nr. 52, pp.22–31.
 26. Oral health surveys: basic methods - 5th edition World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2013, 125 p.
 27. Gudumac V. și alții. Investigații biochimice. Vol. II. Micrometode. Elaborare metodică. Chișinău, 2010, 97 p.
 28. Леонтьев В., Кисельникова Л. Детская терапевтическая стоматология. Национальное руководство. 2-е изд., перераб. и доп. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2016, 952 p.
 29. Markeri osoși. 1,25-(OH)₂-Vitamina D₃. Referințele specifice tehnologiei de lucru utilizate. Laborator Synevo. 2015. <http://www.synevo.ro/125-oh2-vitamina-d>
 30. Richard A., McPherson, Matthew R. Pincus. Biochemical markers of bone metabolism. Henry's Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods. Ed. Saunders. 2007;175-176.
 31. Spinei A. et al. Characteristics of structural and chemical composition of dental enamel in children with severe neuromotor disabilities. *2013 E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, 2013, pp. 1-4, doi: 10.1109/EHB.2013.6707410.
 32. Spinei A., Balteanu O., Plamadeala A., Hristea E., Spinei I., Tagadiuc O.: Relationship between dental caries and phosphocalcic metabolism in children with severe central nervous system diseases caused by perinatal hypoxia. *Journal of Stomatological Medicine*, 2022, nr. 1 (61), 67–83. <https://doi.org/10.53530/1857-1328.22.61.09>
 33. Spinei A., Balteanu O., Plamadeala A., Hristea E., Spinei I. The Relationship Between Dental Caries Damage, Tooth Enamel Hypoplasia and the Particularities of Calcium Homeostasis in Children. In: Sontea, V., Tiginyanu, I., Railean, S. (eds) 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023. IFMBE Proceedings, vol 92. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-42782-4_48
 - Bone Health Measured by Quantitative Ultrasound of the Phalanges in Pediatric Patients Treated with Anticonvulsant Drugs. *Nutrients* 2015, nr. 7(12), pp. 9908–9917. <https://doi.org/10.3390/nu7125517>.
 19. Voloh A. Modificările clinico-biologice și genetice în statutul vitaminei D în perioadele pre- și postnatală a copilului. Autoref. tezei dr. hab. în șt. med. Chișinău. 2016, 46 p.
 20. Milgrom P, Riedy C.A., Weinstein P, Tanner A.C.R., Manibusan L., Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dentistry Oral Epidemiology*. 2013, nr. 4 (28), pp.295-306.
 21. Occhi-Alexandre I.G.P., Cruz P.V., Bendo C.B., Paiva S.M., Pordeus I.A., Martins C.C. Prevalence of dental caries in preschool children born preterm and/or with low birth weight: a systematic review with meta-analysis of prevalence data. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2019, nr. 3 (30), pp.265-275.
 22. Hubbard, M.J.: Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(11), 437–466 (2000). <https://doi.org/10.1177/10454411000110040401>
 23. Lacruz R.S., Habelitz S., Wright J.T., Paine M.L. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev*, 2017, nr. 3(97) 939–993. <https://doi.org/10.1152%2Fphysrev.00030.2016>
 24. Merheb R., Arumugam C., Lee W., Collin M., Nguyen C., Groh-Wargo S., Nelson S. Neonatal serum phosphorus levels and enamel defects in very low birth weight infants. *J Parenter Enteral Nutr* 2016, nr. 6(40), 835–841. <https://doi.org/10.1177/0148607115573999>
 25. Schüller I.M., Haberstroh S., Dawczynski K., Lehmann T., Heinrich-Weltzien R. Dental caries and developmental defects of enamel in the primary dentition of preterm infants: case-control observational study. *Caries Research*. 2018, nr. 52, pp.22–31.
 26. Oral health surveys: basic methods - 5th edition World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2013, 125 p.
 27. Gudumac V. și alții. Investigații biochimice. Vol. II. Micrometode. Elaborare metodică. Chișinău, 2010, 97 p.
 28. Леонтьев В., Кисельникова Л. Детская терапевтическая стоматология. Национальное руководство. 2-е изд., перераб. и доп. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2016, 952 p.
 29. Markeri osoși. 1,25-(OH)₂-Vitamina D₃. Referințele specifice tehnologiei de lucru utilizate. Laborator Synevo. 2015. <http://www.synevo.ro/125-oh2-vitamina-d>
 30. Richard A., McPherson, Matthew R. Pincus. Biochemical markers of bone metabolism. Henry's Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods. Ed. Saunders. 2007;175-176.
 31. Spinei A. et al. Characteristics of structural and chemical composition of dental enamel in children with severe neuromotor disabilities. *2013 E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, 2013, pp. 1-4, doi: 10.1109/EHB.2013.6707410.
 32. Spinei A., Balteanu O., Plamadeala A., Hristea E., Spinei I., Tagadiuc O.: Relationship between dental caries and phosphocalcic metabolism in children with severe central nervous system diseases caused by perinatal hypoxia. *Journal of Stomatological Medicine*, 2022, nr. 1 (61), 67–83. <https://doi.org/10.53530/1857-1328.22.61.09>
 33. Spinei A., Balteanu O., Plamadeala A., Hristea E., Spinei I. The Relationship Between Dental Caries Damage, Tooth Enamel Hypoplasia and the Particularities of Calcium Homeostasis in Children. In: Sontea, V., Tiginyanu, I., Railean, S. (eds) 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023. IFMBE Proceedings, vol 92. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-42782-4_48