Koncentracija topivoga receptora CD14 u slini pacijenata s demineralizacijom tvrdih zubnih tkiva

Protrka, Nives

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:645459

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Nives Protrka

KONCENTRACIJA TOPIVOGA RECEPTORA CD14 U SLINI PACIJENATA S DEMINERALIZACIJOM TVRDIH ZUBNIH TKIVA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Nada Galić

dr. sc. Ljerka Prester

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Nives Protrka

CONCENTRATION OF SOLUBLE RECEPTOR CD14 IN THE SALIVA OF PATIENTS WITH DEMINERALIZATION OF HARD DENTAL TISSUES

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

prof. dr. sc. Nada Galić

dr. sc. Ljerka Prester

Zagreb, 2021.

Rad je ostvaren u: Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska i u Imunološkom laboratoriju, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska.

Lektor hrvatskog jezika: dr. sc. Ivana Kurtović Budja

Lektor engleskog jezika: Makso Herman, mag. philol. angl. soc.

Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada i obranu doktorskog rada:

1. prof. dr. sc. Katica Prskalo, predsjednica, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2. prof. dr. sc. Goranka Prpić Mehičić, član, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
3. izv. prof. dr. sc. Bernard Janković, član, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
4. prof. dr. sc. Vlaho Brailo, član, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
5. dr. sc. Irena Brčić Karačonji, član, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb
6. izv. prof. dr. sc. Jurica Matijević, zamjena, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Datum obrane rada:_____

Rad sadrži:

135 stranica

28 tablica

31 slika

2 priloga

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 poslijediplomskog znanstvenog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija, odnosno propusta u navođenju njihova podrijetla.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoricama prof. dr. sc. Nadi Galić i dr. sc. Ljerki Prester na pomoći pri izradi rada, savjetima, uloženom trudu i vremenu, razumijevanju i velikodušnosti.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marini Katunarić na pomoći pri odabiru teme istraživanja te savjetovanju.

Rad posvećujem svojoj obitelji koja me podržavala cijelo ovo vrijeme, suprugu Nikoli te djeci Niki, Luki, Lani i Leu.

Sažetak

KONCENTRACIJA TOPIVOGA RECEPTORA CD14 U SLINI PACIJENATA S DEMINERALIZACIJOM TVRDIH ZUBNIH TKIVA

Slina sadrži prirođene mehanizme obrane kao dio nespecifičnoga imuniteta. Topivi receptor CD14 (sCD14) u slini posreduje u prepoznavanju gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija, a koje mogu sudjelovati u razvoju demineralizacije tvrdih zubnih tkiva uzrokovanih karijesom. **Svrha** istraživanja bila je utvrditi koncentraciju sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini odraslih osoba s karijesom i bez karijesa, kako bi se odredila njegova potencijalna uloga biljega za karijes. **Uzorak** se sastojao od ukupno 88 zdravih ispitanika, dobi od 20 do 40 godina. Podijelili smo ih u tri skupine: 28 ispitanika bez karijesa činili su kontrolnu skupinu, 30 ispitanika s 1 – 5 karijesa činili su prvu eksperimentalnu skupinu (E1) te 30 ispitanika s 6 i više karijesa činili su drugu eksperimentalnu skupinu (E2). **Metode** koje su se rabile za prikupljanje sline su metoda sa stimulacijom salivacije i bez stimulacije salivacije. U uzorcima sline odredili smo protok sline, pH-vrijednost i puferski kapacitet sline. Za određivanje koncentracije sCD14 koristili smo „sendvič“ imunokemijski test ELISA, a dentalni status registriran je pomoću Indeksa karijesa zuba (DMFT) i Indeksa karijesa ploha (DMFS) te su se karijesne promjene dodatno mjerile uređajem KaVo DIAGNODent Pen (DDPen) kako bi se bolje odredila jačina demineralizacije patoloških promjena. **Rezultati** su pokazali statistički značajno veću ($p = 0,007$) koncentraciju receptora sCD14 u nestimuliranoj slini ispitanika s karijesom obiju eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Prediktivna vrijednost koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini za pojavu karijesa bila je statistički značajna ($p = 0,002$). **Zaključci** koji se mogu izvesti iz istraživanja jesu da povećana koncentracija receptora sCD14 u nestimuliranoj slini može biti potencijalni biljeg za prisutnost karijesa. Osim koncentracije receptora sCD14 u nestimuliranoj slini, kao statistički značajan prediktor pojave karijesa, pokazao se i puferski kapacitet stimulirane sline.

Ključne riječi: demineralizacija, sCD14, karijes, slina, pH, puferski kapacitet, imunitet.

Summary

CONCENTRATION OF SOLUBLE RECEPTOR CD14 IN THE SALIVA OF PATIENTS WITH DEMINERALIZATION OF HARD DENTAL TISSUES

Introduction: Caries is a microbiologically caused disease that still affects humanity to a great extent. There has been a great deal of emphasis on the development of methods for assessing caries risk, identification of biomarkers and vaccine development strategies to control the incidence of caries, a disease with a known cause. Immunologic response plays an essential role in the development of caries. Saliva contains an inherent defense mechanisms as part of nonspecific immunity. The soluble receptor CD14 in the saliva, mediates in the recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria that can participate in the development of demineralization of hard dental tissue caused by caries. Previous studies did not investigate the relationship of sCD14 concentration in the saliva and caries activity, collected from adults. Only saliva collected from children and adolescents was tested, and the results showed differing conclusions.

Objectives: The aim of this study was to determine the concentration of salivary sCD14 and salivary flow rate, pH and buffer capacity, in order to determine its potential role as a biomarker for caries activity. The aim was also to determine the dental status of all participants and to evaluate the prevalence of demineralization of hard dental tissues.

Participants and methods: The sample consisted of a total of 88 healthy subjects, 20-40 years of age. Participants completed a questionnaire (illness, drugs, consummation of acidic drinks, sugar intake, smoking habits…) and informed consent. Excluding factors were: using anti-inflammatory drugs 2 weeks prior to saliva collection, illness, pregnancy, and chronic and acute infectious diseases. Then a clinical examination was performed to determine the dental status of each participant, using a mirror, dental probe and KaVo DIAGNOdent Pen because of its diagnostic values and to determine the strength of the demineralization of caries lesions.

Excluding factors were: bleeding on probing, calculus, inflammations of oral mucosa, ongoing dental treatment (endodontics, sutures of oral mucosa…), and missing majority of teeth. Dental status was recorded using the DMFT and DMFS index.

Participants were divided into three groups: 28 subjects without caries were the control group, 30 subjects with 1-5 caries were the first experimental group (E1) and 30 subjects with 6 and more caries were the second experimental group (E2). Methods used for collecting saliva samples were with stimulation (by chewing paraffin wax) and without stimulation of salivary secretion. In the saliva samples the flow of saliva, pH and buffer capacity of saliva is then determined. The concentrations of the sCD14 in all saliva samples were determined using matrix-matched commercial enzyme-linked immunosorbent assay ELISA.

Results: The results showed a statistically significant ($\chi 2 = 9.86$; ss = 2; $p = 0.007$) higher concentration of sCD14 in resting saliva samples of participants with caries, both experimental groups (median E=198.0 ng/mL and E2=210.9 ng/mL) compared to the control group (178.4 ng/mL). With the unit increase in sCD14 concentration in resting saliva samples, the emergence of caries increased by 1%. The sensitivity of the sCD14 concentration in resting saliva for caries recognition was 68%, while the specificity was 57%. Both measures were in optimum ratio at 182.9 ng/mL concentration of sCD14 in resting saliva. The predictive value of sCD14 concentration in resting saliva (area below ROC curve = 0.70) for caries was statistically significant ($p = 0.002$). The median DMFS index was: for the control group 32, and for groups E1 and E2 30 and 28, respectively (the difference between the groups were not statistically significant). In this study, the control group had a statistically significant higher number of missing tooth surfaces ($p = 0.036$) and surfaces with filling ($p = 0.001$) compared to experimental groups. Participants of the E2 group with caries localized in the lateral region of the dental arch exhibited a statistically significant higher concentration of sCD14 in resting saliva ($p = 0.003$) with respect to the control group, rather than the E1 group. According to the same localization of caries in the dental arch, the difference for the E1 group was marginally statistically significant ($p = 0.058$). There was no statistically significant correlation between the concentration of sCD14 in saliva and the measurement of caries lesions by KaVo DIAGNOdent Pen device at different localizations in the dental arch.

The median pH of resting and stimulated saliva did not show a statistically significant difference between the groups (control=7.3, E1 and E2=7.2), and no statistically significant association between the pH of saliva and concentration of sCD14 in saliva was observed. The higher buffering capacity of the stimulated saliva was

statistically significantly related to the lower concentration of sCD14 in the stimulated saliva. Subjects with medium (pH 4.5-5.5) or low (pH <4.5) buffer capacity of stimulated saliva had a four-fold greater chance of developing caries compared to subjects with high buffering capacity (pH = 5.5).

Conclusions: The increased concentration of sCD14 in the resting saliva can be used as a potential marker for the presence of caries. In addition to the concentration of sCD14 in resting saliva, a statistically significant predictor of caries activity also showed to be the buffering capacity of the stimulated saliva and the subjects with caries also had decreased flow rate of resting saliva as an important defensive factor by the host. Saliva collection methods and salivary sCD14 concentration determination are not standardized, which can be a problem for the interpretation of the results, in this type of study. Further studies in the future are required in order to achieve standardization for the collection of saliva samples and standardization of determination of salivary sCD14 concentration for a better performance of its role as a potential marker for carious activity.

Key words: demineralization, sCD14, caries, saliva, flow rate, pH, buffer capacity, immunity.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Slina 2

1.1.1. Smanjena sekrecija sline 3

1.1.2. Uzorkovanje sline 4

1.1.3. Prednosti i nedostatci sline kao uzorka u stomatološkoj praksi 5

1.2. Biljezi karijesa i erozija tvrdih zubnih tkiva 5

1.2.1. Funkcionalni testovi za prognozu rizika od karijesa i erozija 6

1.2.2. Mikroorganizmi 7

1.2.3. Salivarni proteini u zaštiti od pojave karijesa i erozija 9

1.2.4. Biokemijski biljezi upale u usnoj šupljini 11

1.2.5. Zaštitna pelikula kao biljeg za eroziju i karijes 12

1.2.6. Potencijalni biljezi dentalnoga karijesa i erozija 12

1.2.7. Receptor CD14 13

1.3. Demineralizacijske promjene tvrdih zubnih tkiva 18

1.3.1. Karijes 22

1.3.2. Erozija 25

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA 28

3. ISPITANICI I METODE 30

3.1. Ispitanici i prikupljanje podataka 30

3.1.1. Klinički opis prikupljanja podataka 31

3.1.2. Uzorkovanje 34

3.2. Postupci 37

3.2.1. Određivanje karijesa 37

3.2.2. Detekcija i mjerenje jačine demineralizacije tvrdih zubnih tkiva pomoću uređaja KaVo DIAGNOdent Pen 39

3.3. Metode 41

3.3.1. Određivanje pH-vrijednosti sline 41

3.3.2. Određivanje puferskoga kapaciteta sline 43

3.3.3. Određivanje koncentracije sCD14 u slini ELISA metodom 43

3.4. Statistička obrada podataka 51

4. REZULTATI 53

4.1. Demografske karakteristike ispitanika 53

4.2. Parametri sline: pH-vrijednosti sline, protok i puferski kapacitet 56

4.2.1. Nestimulirana slina 57

4.2.2. Stimulirana slina 59

4.2.3. Puferski kapacitet stimulirane sline 60

4.3. Dentalni status ispitanika 62

4.3.1. DMFT indeks 62

4.3.2. DMFS indeks 63

4.3.3. Lokalizacija karijesa u zubalu kod ispitanika eksperimentalnih skupina. 64

4.3.4. Stupanj demineralizacije karijesnih promjena, mjerenih uređajem KaVo DIAGNOdent Pen 65

4.4. Koncentracija sCD14 u slini 66

4.4.1. Nestimulirana slina 66

4.4.2. Stimulirana slina 68

4.4.3. Korelacija između koncentracija sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini 69

4.4.4. Korelacija između koncentracije sCD14 u slini i parametara sline 70

4.4.5. Korelacija između koncentracije sCD14 u slini i dentalnoga statusa 71

4.4.6. Korelacija između koncentracije sCD14 i lokalizacije karijesa u zubalu 72

4.4.7. Korelacija koncentracije sCD14 i vrijednosti mjerenja demineralizacije karijesnih promjena uređajem KaVo DIAGNOdent Pen 74

4.4.8. Koncentracija sCD14 u slini u odnosu na demografske karakteristike ispitanika 75

4.5. Predikcija pojave karijesa 78

4.5.1. Multivarijantni prediktivni model 82

4.5.2. Dijagnostička vrijednost koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini za predikciju karijesa 83

4.5.3. Prediktivna vrijednost indikativne koncentracije sCD14 u slini 86

5. RASPRAVA 88

5.1. Demografske karakteristike 88

5.2. Parametri sline 90

5.3. Demineralizacijske promjene tvrdih zubnih tkiva kod dviju eksperimentalnih skupina ispitanika i njihova usporedba te dentalni status ispitanika kontrolne skupine 94

5.4. Koncentracija sCD14 u slini kao biljeg karijesa 97

5.4.1. Međusobni odnos varijabli istraživanja s koncentracijom sCD14 u slini……..100

5.4.2. Predviđanje karijesa prema karakteristikama ispitanika, vrijednostima parametara sline i koncentraciji sCD14 u slini 102

5.4.3. Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini kao potencijalni biljeg prisutnosti karijesa 103

5.5. Ograničenja istraživanja 105

6. ZAKLJUČCI 107

7. POPIS LITERATURE 109

8. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA 134

PRILOZI

POPIS OZNAKA I KRATICA

AAS	atomska apsorpcijska spektrometrija
AP	antimikrobni peptidi
BEWE	Indeks osnovne procjene erozivnog trošenja (engl. *the Basic Erosive Wear Examination*)
BW	zagriz u traku (engl. *bite-wing*)
CD14	skup diferencijacije 14 (engl. *Cluster of differentiation*)
CI	interval pouzdanosti za omjer izgleda (engl. *confidence interval*)
CRP	C-reaktivni protein
CSF	čimbenik rasta hematopoetičkih stanica (engl. *colony-stimulating factor*)
DDPen	KaVo DIAGNOdent Pen
DMFT	Indeks karijesa zuba (engl. *Decayed, missing and filled teeth*)
DMFS	Indeks karijesa ploha (engl. *Decayed, missing and filled surface*)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
E1	prva eksperimentalna skupina ispitanika
E2	druga eksperimentalna skupina ispitanika
ELISA	enzimski test na čvrstoj fazi (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)
Ep	epruveta
G+	gram-pozitivno
G-	gram-negativno
GERB	gastroezofagealna refluksna bolest
GPI	glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol)*
HCL	klorovodična kiselina (engl. *hydrocloric acid*)
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficency virus*)
ICDAS	sustav za rangiranje i klasifikaciju karijesnih lezija (engl. *International Caries Detection and Assessment System*)

IFN	interferon
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
IRF-3	regulatorni faktor interferona 3 (engl. *interferon regulatory factor 3*)
IQR	interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)
LBP	lipopolisaharid vežući protein (engl. *LPS binding protein*)
LPS	lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharide*)
LT	limfotoksin
Mal	adaptor MyD88 (engl. *MyD88 adaptor like*)
MBP	manoza vežući protein (engl. *mannose-binding protein*)
mCD14	Membranski receptor CD14 (engl. *membrane CD14*)
MD-2	protein mijeloidne diferencijacije 2 (*engl. myeloid differentiation protein 2*)
MMP	metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*)
MyD88	protein primarne mijeloidne diferencijacije 88 (engl. *myeloid differentiation primary response protein 88*)
NFATc	nuklearni čimbenik aktiviranih T-stanica (engl. *Nuclear factor of activated T cells*)
NFκB	nuklearni čimbenik za lance κ limfocita B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
NK	prirodnoubilačke stanice (engl. *natural killer*)
OR	omjer izgleda (engl. *odds ratio*)
PBS	fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*)
PBS-T	pufer za ispiranje (engl. *phosphate buffer saline with Tween 20*)
pH	snaga vodika (lat. *potentia hydrogenii*)

RG	radiografija (engl. *radiography*)
RI	indeks loma (engl. *refractive index*)
ROC	krivulja karakteristika primatelja-operatora (engl. *receiver operating characteristic*)
RVG	digitalna radiografija (engl. *radiovisiography*)
SAP	serumska amiloidna P-komponenta (engl. *serum a*myloid P-component)
SARM	protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive (engl. *sterile alpha and Armadillo motif containing protein*)
sCD14	topivi receptor CD14 (engl. *soluble CD14*)
SMH	mjerenje površinske mikro tvrdoće (engl. *surface microhardness measurements)*
sTLR-2	topivi Toll-u sličan receptor 2 (engl. *soluble Toll like receptor 2*)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TGF	transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*)
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor metalloproteinase)*
TIR	Toll/Il-1 domena
TIRAP	adaptorski protein koji sadrži TIR domenu (engl. *Toll-Il-1 domain-containing adaptor protein*)
TLR	Toll-u sličan receptor (engl. *Toll like receptor*)
TLRs	Toll-u slični receptori (engl. *Toll like recetors*)
TMB	Tetrametilbenzidin (engl. *tetramethylbenzidine*)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)
TRAM	adaptorska molekula srodna TRIF-u (engl. *TRIF-related adaptor molecule)*
TRIF	adaptorski protein koji sadrži TIR domenu i potiče interferon β (engl. *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-β)*
TWI	indeks zubnog trošenja (engl. *Tooth wear index*)

1. UVOD

Studije zadnjega desetljeća pokazale su porast broja onih studija koje određuju individualnost pojave karijesa, u svrhu bolje dijagnoze i prognoze karijesa (1). Međutim unatoč svemu otkrivenom, još je uvijek karijes dosta raširen u svijetu te se smatra jednom od najčešćih bolesti svjetske populacije, a koja može utjecati na kvalitetu života (2). Nekarijesne destrukcije tvrdih zubnih tkiva u obliku erozija u današnje se vrijeme pojavljuju sve češće, a njihova terapija je kompleksna i dijagnoza etiologije je ključna za uspješno liječenje. Istovremeno ih potpomažu kserostomija te bruksizam (3–6). Tako oštećena struktura tvrdih zubnih tkiva još je podložnija razvoju karijesa (7,8).

Opće je poznato da komponente sline igraju važnu ulogu u očuvanju oralnoga zdravlja (9). Slina sadrži mnoge prirođene mehanizme obrane, uključujući antimikrobne proteine, lizosome, laktoperoksidazu, laktoferin i visokomolekularne glikoproteine kao dio nespecifičnoga imuniteta. Rezultati mnogih studija pokazali su kako rast koncentracije različitih proteina sline može biti pokazatelj prisustva karijesa (10–13). Autori prijašnjih studija uzeli su u obzir infektivnu prirodu karijesa te su istraživali imunološke komponente sline kao prve linije obrane od stranih organizama (6,14–24).

Analizom velikoga broja radova (ukupno 188 radova), nije ustanovljen pouzdani salivarni protein kao potencijalni biljeg za dentalni karijes (25). Stoga se istraživanja nastavljaju i dalje, osobito na području imunosnih biljega.

Još su 1981. godine znanstvenici identificirali receptor *skup diferencijacije 14* (CD14, engl. *cluster of differentiation 14*) na površini monocita i makrofaga. Receptor CD14 ima glavnu ulogu u prepoznavanju nekoliko mikrobnih produkata kao što su endotoksini, lipopolisaharidi (LPS, engl. *lipopolysaccharide*) iz gram-negativnih (G-) bakterija te peptoglikani iz gram-pozitivnih (G+) bakterija (26–29). Receptor CD14 je odgovoran za aktivaciju stanica (makrofaga, monocita) i pokretanje imunosnoga odgovora domaćina, a postoji u dvjema formama: membranozna (mCD14) i topiva forma (sCD14) (30). Ustanovljeno je da žlijezde slinovnice konstantno luče topivi oblik receptora CD14 u slinu (31).

1.1. Slina

Slina je glavni čimbenik organizma kojim se postiže homeostaza usne šupljine (32). Sadrži organske i anorganske komponente koje su važne za zdravlje usne šupljine i za očuvanje integriteta tvrdih zubnih tkiva (33). Sadrži oko 99.5 % vode, 0.3 % proteina te 0.2 % anorganskih tvari (ione kalija, natrija, kalcija, anorganskih fosfata, bikarbonata, magnezija, klora, joda i fluora) (34). Sadrži i različite proteine, salivarne enzime, globuline, albumine, hormone, ugljikohidrate, lipide itd. (33,35–37). Slina, također, štiti zube od procesa demineralizacije, a poticanjem procesa remineralizacije, održavanjem optimalne koncentracije iona kalcija, fosfata, fluorida i vodika (38). Slina ima pufersku mogućnost održavanja acido-bazne ravnoteže, odnosno, neutralizacije endogenih i egzogenih kiselina u usnoj šupljini. Najvažniji puferski sustavi su bikarbonatni i fosfatni ioni te proteini. Blago kisela vrijednost pH sline (5,8 – 7,1) štiti sluznicu te onemogućava demineralizacijski učinak kiselina (38). Istraživanja su pokazala da su, za razliku od karijesa, erozivne promjene tvrdih zubnih tkiva, izravno povezane sa sniženom pH-vrijednosti sline. Slina štiti od karijesa na četiri načina: neutralizacijom i eliminacijom šećera i ostalih tvari, puferskim kapacitetom te regulacijom odnosa demineralizacije / remineralizacije i antimikrobnom akcijom (39). Zbog toga možemo reći da slina ima protektivnu ulogu u nastanku karijesa zbog njezine uloge u neutralizaciji i puferiranju kiseline kao i njezine uloge u remineralizaciji tvrdih zubnih tkiva.

Sastavni dio ukupne sline čini:

– slina iz žlijezda slinovnica (parotidna, submandibularna i sublingvalna žlijezda): proizvod je specijalnih sekretornih stanica i u svom sastavu sadrži pretežno vodu, elektrolite, enzime i glikoproteine. Također, može sadržavati i različite druge tvari koje su prisutne i u plazmi, endogenoga (hormoni) ili egzogenoga (lijekovi) podrijetla. U acinusima žlijezda slinovnica elektrolitski sastav sline identičan je onom u krvnoj plazmi. U izvodnim kanalićima žlijezda sastav sline se mijenja (40).

– ostale tekućine i materijali koji dospiju u usnu šupljinu (sulkusna tekućina, sekreti iz dišnih putova, virusi, gljivice, bakterije i njihovi metaboliti, epitelne stanice, ostaci hrane, sastojci krvi iz ozljeda sluznice...) (41).

Nasuprot slini, sulkusna tekućina je sastavom puno sličnija krvnoj plazmi jer nastaje ultrafiltracijom iz kapilarnoga pleksuza u području gingivnoga sulkusa kao transudat ili kao eksudat u slučaju jače upale te time i posljedičnim povećanjem permeabilnosti kapilara. Najveći dio komponenata plazme u slini dospije putem sulkusne tekućine, jer su kapilare u sulkusu za njih mnogo propusnije nego stanice acinusa (32). Kako bi slina mogla obavljati svoje funkcije sekrecija sline treba biti dostatna.

Količina, sastav i gustoća sline ovise o brojnim činiteljima, kao što su doba dana, opće fizičko i psihičko zdravstveno stanje, korištenje lijekova, dob i spol, vrsta hrane, intenzitet i trajanje stimulacije itd. Sekrecija sline tijekom dana je veća od sekrecije tijekom noći. Prema tomu i zaštita slinom je veća tijekom dana. Sekrecija sline se povećava do 20. godine života, te se smanjuje do 60. U stanju mirovanja muškarci luče više sline od žena. Fizičko i psihičko zdravlje je nužno za normalnu proizvodnju i sekreciju sline.

1.1.1. Smanjena sekrecija sline

Različite bolesti mogu dovesti do smanjene sekrecije sline kao npr. Sjögrenova bolest, radijacijski sindrom nakon zračenja tumora u području glave i vrata te teža oboljenja s dehidracijom organizma. Također, i neki lijekovi mogu popratno dovesti do redukcije sekrecije sline uz svoj glavni terapeutski učinak (antikolinergici, antidepresivi, antihistaminici, antihipertenzivi, dekongestivi, diuretici, sedativi i ostali simpatomimetici) (38,42). Znaci i simptomi kserostomije uključuju primjetnu suhoću usta, fisure i ragade uglova usana, zadah, poteškoće u govoru i gutanju te konstantnu želju za pijenjem. Čest je osjećaj pečenja jezika i promjene u okusu. Oralna sluznica gubi prirodnu vlažnost te postaje dehidratizirana i vrlo često upaljena i crvena te lako krvari. Kserostomija mijenja normalnu floru usne šupljine pa se tako povisuju koncentracije streptokoka mutansa i laktobacila koji su odgovorni za nastanak karijesa i dolazi do razvoja kanididijaze, posebice jezika i nepca. Mogu se javiti i gingivitis i parodontitis. Slina, koja je prisutna u manjoj količini, gušća je i otežana je njezina sekrecija iz odvodnih kanala žlijezda slinovnica. Na kserostomiju utječe suhi zrak, disanje na usta te pušenje.

1.1.2. Uzorkovanje sline

Uzorkovanje sline uključuje pasivnu, nestimuliranu metodu skupljanja sline i stimuliranu metodu. Količina protoka izlučivanja sline može se zatim izračunati u mL/min (43). Nestimulirana slina je uzorkovanje sline direktno u epruvetu tijekom određenoga vremena. Uzorkovanje nestimulirane sline obično traje od 1 do 15 minuta ovisno o potrebnoj količini uzorka (38). Vrijeme uzorkovanja stimulirane sline obično traje pet minuta. Skupljanje stimulirane sline trebalo bi biti provedeno nakon skupljanja nestimulirane sline (38). Stimulacija salivacije može se provoditi različitim sredstvima (vosak, žvakača guma, pamuk…), međutim, najbolji je ipak inertni materijal poput parafinskoga voska jer ne utječe na sastav sline poput primjerice pamuka koji apsorbira određene molekule iz sline te može dovesti do lažno sniženih rezultata mjerenja (34,38). Iako su u prodaji i različiti sustavi za uzorkovanje sline, još su uvijek najpopularnije metode kolekcije sline postupkom pljuvanja, prikupljanjem sline u podjezičnom prostoru sukcijom te nakapavanjem. Trenutno ne postoji tehnika kolekcije sline koja je univerzalno prihvaćena jer metoda uzorkovanja sline nisu standardizirana (34).

Različite kliničke studije utvrdile su da je nestimulirani protok sline dijagnostički važniji od stimuliranoga protoka (44). Međutim, iako se protok pokazao kao važan pokazatelj za aktivnost karijesa, normalne vrijednosti protoka nestimulirane i stimulirane sline ipak variraju od osobe do osobe (45). Do danas uzorkovanje sline u stomatološkoj praksi nije standardizirano te se podjednako koriste obje metode uzorkovanja sline. Larsen MJ i suradnici 1999. godine proveli su studiju analizirajući varijacije u mjerenjima parametara sline tijekom razdoblja od 7 tjedana te su zaključili da unatoč uzorkovanju sline uvijek u isto vrijeme dana uz poštivanje cirkardijalnoga ritma lučenja sline (1), mjereni parametri sline ne daju uvijek iste rezultate te stoga nisu pouzdani za karakterizaciju pojedinca o podložnosti karijesu (2). Zbog toga postoje ograničenja glede usporedbe rezultata pojedinih analita u uzorku sline, što upućuje na potrebu harmonizacije predanalitičkih metoda pri korištenju sline kao dijagnostičkoga medija (34).

1.1.3. Prednosti i nedostatci sline kao uzorka u stomatološkoj praksi

Generalno, korištenje sline u stomatološkoj dijagnostici umjesto krvi ima brojne prednosti. Uzorkovanje sline je neinvazivni i jednostavniji dijagnostički postupak. Kako se slina ne zgrušava, olakšano je rukovanje prilikom njezine obrade, što značajno smanjuje troškove analize. Također, za zdravstvene djelatnike je korištenje sline u odnosu na serum sigurnije zbog smanjenoga rizika od zaraze infekcijama kojih su patogeni u krvi (virus humane imunodeficijencije (HIV), virus hepatitisa itd.). Ipak, slina kao dijagnostički uzorak u stomatološkoj praksi može imati i niz nedostataka. Mogućnost točne kvantifikacije biljega u uzorku usne šupljine ovisi o biokemijskim karakteristikama samoga analita, uzorkovanju sline, a i o odabiru analitičke metode određivanja. Često su koncentracije pojedinih analita u slini niže nego li u serumu pa je to dugo vremena bilo ograničavajuće za kliničku primjernu salivarne dijagnostike u stomatološkoj praksi. Međutim, razvojem novih imunoloških metoda mogu se detektirati vrlo niske koncentracije analita u slini.

1.2. Biljezi karijesa i erozija tvrdih zubnih tkiva

Općenito, biljeg je indikator normalnih bioloških procesa, patoloških procesa ili farmakoloških odgovora na terapeutske intervencije, koji možemo objektivno mjeriti i evaluirati (46).

Biljezi u tijelu su entiteti koji nam daju informaciju o trenutnom fizičkom stanju organizma (47). Promjene u njihovoj koncentraciji, strukturi, funkciji ili akciji, mogu biti povezane s nastankom, progresijom ili regresijom nekoga poremećaja ili su rezultat odgovora organizma (48). Stoga, biljezi predstavljaju pouzdane alate za detekciju, procjenu rizika, dijagnozu, prognozu i praćenje bolesti (49).

Biljezi dentalnoga karijesa uključuju analize parametara sline, detekciju mikroorganizama u usnoj šupljini te određivanje elektrolita (laktat, ioni kalcija, urea, amilaza) i proteine (proteom) u uzorcima sline (50). Biljezi dentalne erozije uključuju analize parametara sline, određivanje koncentracije fosfata, kalcija i fluorida te salivarnih proteina (51–54).

1.2.1. Funkcionalni testovi za prognozu rizika od karijesa i erozija

Za pravilnu procjenu rizika od nastajanja karijesa i erozija te aktivnosti karijesa potrebno je uzeti detaljnu anamnezu ispitanika (prisutnost lokalnih i sistemskih bolesti, lijekovi, prehrambene navike, štetne navike, stupanj oralne higijene itd.). Zatim je potrebno odrediti salivaciju, pH-vrijednost sline i njezin puferski kapacitet. Te analize predstavljaju generalnu (nespecifičnu) procjenu rizika od karijesa. Protok sline je važan za određivanje rizika od pojave karijesa jer je dokazano da smanjeni protok sline može pogodovati razvoju karijesa (33,38). Utvrđeno je i da povećani protok sline djeluje preventivno i na pojavu dentalnih erozija jer žlijezde slinovnice stimulirane kiselinom pojačano luče slinu koja kiselinu razrjeđuje (52). Smanjena količina sline može upućivati i na različite bolesti koje zahvaćaju žlijezde slinovnice (autoimune bolesti, hormonalni poremećaji, hereditarni poremećaji), infektivne bolesti (HIV, hepatitis C, epidemijski parotitis…). Također, smanjena količina sline može biti posljedica metaboličkih ili neuroloških poremećaja, lokalnih salivarnih bolesti (sijalolitijaza, sijaloadenitis…), a može biti i rezultat primjene nekih lijekova koji imaju antikolinergični učinak te radioterapije (55,56). Kriteriji za određivanje hiposalivacije ukupne stimulirane sline je < 0.7 mL/min ili nestimulirane sline < 0.12-0.16 mL/min (57). Kserostomija je najčešći simptom koji se može pojaviti zbog nedostatka sline te narušuje kvalitetu života. Ostali oralni simptomi i znakovi koji su vezani za pojavu suhoće u ustima jesu:

– simptomi: osjećaj pečenja oralne sluznice i jezika, otežan govor i gutanje, poremećen okus, mučnina i žgaravica, žeđ.

– znakovi: suhoća i crvenilo sluznice, suhe usne i upala uglova usana, oralna kandidijaza, aktivnost karijesa, atrofija papila jezika (38).

Osim što je već samim smanjenim protokom sline narušeno oralno zdravlje, i pH-vrijednost sline i puferski kapacitet sline ovise o količini sline. Pad pH-vrijednosti sline uvjetovan je kiselim uvjetima u usnoj šupljini i nedostatnim puferskim kapacitetom koji kompenzira pH-vrijednost sline. Određivanje pH-vrijednosti sline korisno je kod otkrivanja kiselih uvjeta u usnoj šupljini koji mogu izazvati pojavu demineralizacije tvrdih zubnih tkiva (38,42). Kritična pH-vrijednost za pojavu demineralizacije cakline je 5.5, posebice ako je

vrijeme trajanja djelovanja kiseline dugo i ako se s vremenom djelovanje kiseline ponavlja. Slina i zaštitna pelikula neutraliziraju djelovanje kiseline, ali ako je pH-vrijednost ispod kritične i ako traje neko vrijeme, slijedi destrukcija zubnoga tkiva.

Određivanjem puferskoga kapaciteta sline može se procijeniti zaštitno djelovanje sline i rizik od nastanka karijesa i erozija. Sniženi puferski kapacitet sline povezan je s razvojem dentalnoga karijesa (38), dok su osobe s normalnim ili visokim puferskim kapacitetom sline često rezistentne na pojavu dentalnoga karijesa (50). Također se smanjeni puferski kapacitet sline može povezati i s progresijom dentalnih erozija radi nedovoljne neutralizacije kiseline u slini (54,58). Rezultati ispitivanja pokazali su da određivanje pH-vrijednosti sline ne determinira osobe s karijesom od osoba bez karijesa (59). Nasuprot tomu, vrijednosti mjerenja puferskoga kapaciteta pokazala su statistički značajnu negativnu korelaciju s prevalencijom karijesa (60).

Procjena rizika za nastanak karijesa još uključuje bakteriološku analizu te analizu upotrebe fluorida (61).

1.2.2. Mikroorganizmi

Usna šupljina je idealno mjesto za kolonizaciju mikroorganizama, zbog kontinuiranoga ispiranja slinom koja održava toplinu (35 – 36 °C) i potrebnu vlažnost usne šupljine, uz pH-vrijednost između 6,75 i 7,25. Broj i sastav mikroorganizama usne šupljine reguliraju različiti mehanizmi, gingivna tekućina i slina sa svojim antimikrobnim učincima, sinergizam i antagonizam mikroorganizama itd. Visoko selektivni mehanizam udruživanja različitih vrsta dovodi do razvoja bakterijskih zajednica. Usnu šupljinu inicijalno koloniziraju streptokoki, stafilokoki i neke aktinomicete, a s njima i veilonela (62). Organizmi koji preferiraju kolonizaciju na tvrdim površinama zuba su najčešće *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis* i *Actinomyces spp*., dok *Prevotella spp*. i *Porphyromonas spp*. preferiraju anaerobne uvjete pa koloniziraju gingivalne pukotine. Međutim, anaerobi se ne javljaju u značajnom broju prije adolescencije (63,64). U ustima su najbrojniji G+ (gram-pozitivni) koki, zatim G+ štapići te G- (gram-negativni) koki i štapići (65). Gram-pozitivni koki obuhvaćaju dvije značajne grupe mikroorganizama koji koloniziraju tvrda i meka oralna tkiva. Polovicu od ukupnog broja

bakterija koje koloniziraju oralnu sluznicu i jezik te su prisutne u slini čine streptokoki: *Sanguis, Mitior, Mutans, Salivarius i Milleri.* (66,67). Stafilokoke nalazimo najviše na koži i sluznici usnica dok ih je u usnoj šupljini manje.

Gram-negativni koki koloniziraju većinu mukoznih površina pa tako i *Veillonella*.

Kariogene bakterije možemo podijeliti u dvije skupine:

– glavne uzročnike: *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Lactobacillus casei, fermentum, plantarum i acidophilus*,

– i bakterije koje se uz glavne uzročnike nalaze u ranim lezijama i karijesnom dentinu: *Streptococcus mitis, Actinomyces odontoliticus i neslundii*.

Streptococcus mutans se drži bakterijom koja izaziva inicijalnu karijesnu leziju. Proizvodi veći broj ektracelularnih ugljikohidratnih polimera koji se fiksiraju na površinu zuba (33). U uzročnike za nastanak karijesa ubrajamo i Gram-pozitivni štapiće i filamente jer su vrlo acidogeni te se tako povezuju s nastankom naprednih karijesnih lezija (68). U slini i plaku su također prisutni gram-negativni štapići i filamenti iako male patogenosti (*Haemofilus*) te *Campylobacter* (*Vibrio*) koji se nalaze u gingivnom slukusu i plaku. Uočen je porast njihovog broja kod povećanja broja gingivnoga indeksa (69). Uz bakterije, koje nalazimo u zdravoj usnoj šupljini, nalazimo i ostale mikroorganizme s kojima su one u ravnoteži: gljivice, mikoplazme, protozoe i povremeno virusnu floru (33). Acidogene bakterije snizuju pH-vrijednost plaka (*S. mutans i S. sanguis* i laktobacili). Sastav dentalnoga plaka je kompleksan te je dokazano da usnu šupljinu i subgingivalni plak može kolonizirati oko 500 različitih bakterijski vrsta (70,71). Sastav bakterija u plaku varira s obzirom na lokalizaciju u ustima: u fisurama se razvijaju G+ anaerobni štapići i koki, a spirohete i G- anaerobni štapići u parodontnim džepovima. Uvijek su prisutni G+ štapići, streptokoki i filamentozne bakterije te neki G- anaerobi. Struktura i kompozicija ekstracelularnoga matriksa plaka također može varirati, kao i mikrobne sastavnice, pa je tako struktura i kompozicija plaka podložna okolišnim uvjetima i vremenu (72). Dosadašnje studije pokazale su vrlo visoku korelaciju između prevalencije karijesa i visoke koncentracije mikroorganizama (73). Međutim, konvencionalni bakterijski testovi nisu dovoljno osjetljivi na različite bakterijske vrste te zahtijevaju višednevnu kultivaciju, a noviji testovi koji koriste imunološku tehnologiju daju brže te kvalitetnije rezultate (50). S obzirom na to da se preko 50 % bakterija u usnoj šupljini još uvijek ne može kultivirati, razumijevanje mikrobiološke aktivnosti u odnosu na pojavu karijesa nije potpuno (50).

1.2.3. Salivarni proteini u zaštiti od pojave karijesa i erozija

Salivarni proteom čine oko 1400 proteina i dio su nespecifičnoga imuniteta (50,59,74).

Te salivarne biomolekule mogu se podijeliti u dvije glavne kategorije:

– molekule povezane s antibakterijskim djelovanjem i

– molekule povezane s adhezijskim kapacitetom mikroorganizama (Tablica 1).

Tablica 1. Salivarni proteini prema djelovanju

Kategorija	Salivarne komponente
Antimikrobno djelovanje	IgA
	α-defensin
	β-defensin
	Histatini
	Laktoferin i lizozim
	Kalprotektin
	sCD14
Adhezija	Mucin
	Aglutinini
	Prolin-bogati proteini
	α-2-makroglobulin
	Fibronektin
	Cistatin
	Matriks metaloproteinaze

Pretpostavlja se za mnoge proteine sline da mogu imati važne uloge u sprječavanju razvoja karijesa ovisno o tom djeluju li na rast bakterija, njihovu agregaciju, adheziju na površinu zuba itd. (75). Međutim, razumijevanje uloga proteina sline je dodatno kompliciranо

činjenicom da su neki od tih proteina multifunkcionalni, mogu dijeliti iste funkcije, a čak može i jedan protein imati suprotne funkcije ovisno o oralnom okruženju (76–78).

Neki proteini prirođenoga imuniteta mogu djelovati baktericidno ili bakteriostatski.

Novija studija pokazuje da postoje kontroverzije da su antitijela: imunoglobulini G (IgG) i imunoglobulini M (IgM), dobri biljezi karijesa (50). Osim toga, salivarni proteini lizozimi, laktoferini, salivarna peroksidaza, mijeloperoksidaza, hipotiocijanat i tiocijanat nemaju jaku poveznicu s dentalnim karijesom. Povišena koncentracija lizozima u slini ustanovljena je kod upale gingive (79). Enzim lizozim posreduje agregaciji i adherenciji bakterija te aktivaciji bakterijskih autolizina koji uništavaju stijenku bakterija (75,78). Lizozim u usnu šupljinu luče velike i male žlijezde slinovnice, gingivna cervikalna tekućina te salivarni leukociti (19). Laktoferin je protein koji u usnu šupljinu luče male i velike žlijezde slinovnice. Veže se za bakterije te omogućuje njihovu aglutinaciju (80). U zaštiti od erozija i karijesa također sudjeluje staterin (tirozin-bogati protein), multifunkcionalni protein koji utječe na zasićenost sline kalcijevim fosfatnim solima te selektivno podupire adheziju bakterija na apatitne površine (38,54). Slina sadrži i matriks metaloproteinaze (MMP) koje su nedavno povezane s progresijom erozija (81,82). Njihova uloga je u degradaciji gotovo svih proteina ekstracelularnoga matriksa i kolagena tvrdih zubnih tkiva što vodi k progresiji bolesti (54). Također je utvrđeno da su osobe s povišenom koncentracijom MMP-a u slini podložnije nastanku karijesa (83) te MMP 8 i 9 smatraju potencijalnim biljegom (82). Međutim, protektivni učinak inhibitora MMP-a na razvoj erozije još uvijek nije u potpunosti potvrđen (54). Nadalje, značajne razlike u proteinskom sastavu sline parotidne žlijezde i ukupne sline, nisu utvrđene kod ispitanika s karijesom i bez karijesa (7,8). Još se uvijek salivarni proteini istražuju kako bi se utvrdila njihova povezanost s karijesom, a time i njihova potencijalna uloga biljega za karijes.

1.2.4. Biokemijski biljezi upale u usnoj šupljini

Iako je uloga kariogenih mikroorganizama u etiologiji karijesa poznata, ispitivanja uloge imunosnoga sustava i upalnoga odgovora također je ključno kada se ispituje patologija karijesa. Mikroorganizmi u usnoj šupljini mogu stimulirati imunosni sustav i produkciju citokina, kemokina, staničnih receptora i ostalih imunosnih komponenta koje mogu imati korisnu ulogu jer preveniraju i reguliraju mikrobiološku infekciju kod domaćina (73,74). Zbog toga se drži da je slina pogodan medij za otkrivanje pro-upalnih biljega u usnoj šupljini. Poznato je da razina C-reaktivnoga proteina (CRP) u krvi raste tijekom akutne i kronične upale. Ipak, istraživanja su pokazala da CRP, kao i neke druge komponente upalnoga odgovora (α-2 makroglobulin i C3-komponenta komplementa), nisu selektivni u razlikovanju nekoliko tipova parodontitisa od normalnoga statusa (85).

Citokini u slini su predmet istraživanja posljednjih deset godina. Povećane koncentracije citokina: interleukina 6 (IL-6) i interleukina 1β (IL-1β) ustanovljene su u slini osoba s karijesom i gingivitisom (74,86). Također je ustanovljena i značajna korelacija između koncentracije salivarnoga IL-1β i razine *Streptokoka mutansa* u usnoj šupljini, što bi moglo uputiti na ulogu te bakterije u modulaciji pro-upalnoga odgovora i produkciji citokina (74). Međutim, drugi autori nisu našli razliku u koncentraciji pro-upalnih citokina u osoba s dentalnim karijesom ili periodontnom upalom u usporedbi s razinom u zdravih osoba (85). Ipak, daljnja istraživanja izdvojila su neke druge potencijalne salivarne biljege u detekciji periodontne bolesti i karijesa i to: metaloproteinaza matriksa 8 (MMP-8), interleukin 1β (IL-1β*)* te *P. gingivalis* (74,87,88). Ustanovljeno je i da je kombinacija ta tri biljega pouzdanija u detekciji bakterijske mase, upale i tkivne destrukcijske kaskade/karijesa od pojedinačnih biljega, jer prezentira ukupni periodontni status pacijenta. MMP imaju sposobnost oslobađati različite bioaktivne molekule s površine stanice, kao što su čimbenik tumorske nekroze α (TNF-α, engl. *tumor necrosis factor α*), IL-6 i druge. Na taj način MMP mogu biti uključeni u kontrolu upale i infekcije u usnoj šupljini. Najvažniji inhibitori MMP su α2-makroglobulin te tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP, engl. *tissue inhibitor metalloproteinase*) (74).

1.2.5. Zaštitna pelikula kao biljeg za eroziju i karijes

Površine zubi eksponirane usnoj šupljini, presvučene su tankim bezstaničnim proteinskim filmom, odnosno pelikulom (38,54). Debljina pelikule varira između 1 – 10 μm ovisno o lokalizaciji u usnoj šupljini (38). Sastavljena je od oko 130 glikoproteina i proteina te nekoliko enzima (89,90). Ti proteini sudjeluju u upalnom odgovoru, antimikrobiološkoj i imunosnoj obrani, podmazivanju, puferiranju i remineralizaciji (54). Histatin, kao dio zaštitne pelikule, djeluje anti-demineralizacijski u fosforiliranom obliku. Također mucini, veliki glikoproteini kao sastavni dio pelikule, djeluju protektivno na razvoj dentalnih erozija (54).

Pelikula tako predstavlja važan čimbenik prevencije tvrdih zubnih tkiva od demineralizacije koja svojom polupropusnošću štiti površinu zuba od izravnoga kontakta kiseline (54,91). Prijašnje studije istraživale su različita protektivna svojstva pelikule na razvoj erozija s obzirom na različit sastav cakline i dentina. Utvrdile su da veći porozitet i topivost dentina u odnosu na caklinu rezultira i većom demineralizacijom na djelovanje kiseline, zbog različite kompozicije i adsorpcije pelikule (92–95). Autori prijašnjih studija također predlažu daljnju analizu proteinskih komponenata pelikule, kao biljega za razvoj erozija, a koji utječu na njezin zaštitni kapacitet (52,54).

1.2.6. Potencijalni biljezi dentalnoga karijesa i erozija

Dobar salivarni biljeg trebao bi imati veliku specifičnost i osjetljivost u selekciji osoba s karijesom. Veliki interes u istraživanju prevencije karijesa usmjeren je prema imunosnim biljezima upale u slini (MMP, citokini, sCD14) (61,96). Nedavna istraživanja pokazala su da α-defensin (61), sCD14 (96) te kalprotektin (86) mogu pouzdano detektirati osobe sa karijesom u usporedbi s onima bez karijesa. Ipak, do danas nije ustanovljen salivarni biljeg koji bi pouzdano odredio karijes-suspektne osobe. Nadalje, različiti salivarni biljezi trebali bi se kombinirati s nekim drugim pokazateljima (socijalnim, kliničkim) u svrhu bolje procjene rizika od karijesa (50).

Nadalje, ovisno o biljegu, može se procijeniti:

a) imuni odgovor u slini pacijenta te prema potrebi savjetovati uzimanje ne-kariogenog oralnog biofilma (npr. probiotici)

b) smanjeni adhezijski kapacitet kariogenoga biofilma, te prema potrebi savjetovati primjenu specifičnih anti-adherentnih molekula u vidu poboljšavanja dentalne higijene

c) poboljšati puferski kapacitet sline (stimulacija salivacije žvakanjem).

1.2.7. Receptor CD14

Receptor sCD14 otkriven je i klasificiran 1981. godine te je ustanovljeno da sudjeluje u aktivaciji prirođenoga imuniteta kod akutnih i kroničnih infektivnih bolesti (97,98). Ima važnu ulogu u prepoznavanju raznih liganada, naročito apoptoičnih stanica i gljivica do bakterijskih produkata te čak cijelih bakterija (98).

CD14 postoji u dvije forme. Jedna forma je vezana na površinu stanične stjenke pomoću glikozilfosfatidilinozitol (GPI, engl. *glycosylphosphatidylinositol*) receptora te se naziva membranozni CD14 (mCD14) (164). Originalno je opisan na mononuklearnim stanicama kao 55 kDa protein (99). mCD14 se nalazi najviše na površini monocita/makorfaga, zatim na površini polimorfonuklerara, nemijeloidnim stanicama kao B stanice i fibroblastima gingive. Te stanice nazivamo CD14-pozitivnim stanicama.

Druga je topiva forma, odnosno solubilni receptor CD14 (sCD14). Solubilni CD14 nastaje otpuštanjem mCD14 s membrane ili je direktno otpušten iz intracelularnih vezikula (100). Membranski receptor CD14 je pričvršćen za staničnu stijenku pomoću GPI pričvrstka. Međutim, aktivirana stanica može otpustiti receptor sCD14 u topivom obliku koji također sudjeluju u aktivaciji stanica (99). Receptor sCD14 može biti otpušten u većoj količini ili proteinaza-ovisnim odvajanjem (približno 48 kDa veliki fragment) ili proteinaza-neovisnim odvajanjem (približno 55 kDa) (99). Solubilni CD14 sintetizira se u jetri. Receptor sCD14 posreduje u aktivaciji stanica bez CD14 receptora, odnosno CD14-negativnih stanica, kao što su endotelne i epitelne stanice (101,102). Receptor sCD14 u majčinom mlijeku regulira rast mikroba u ždrijelu dojenčeta (103). Također ga ima u cerebrospinalnoj tekućini i u urinu (99).

Zbog toga je uloga sCD14 važna kako bi izazvao odgovor stanica bez mCD14 na prisutnost LPS-a.

Receptor CD14 i LPS receptorski kompleks

Receptor CD14 prepoznaje gram+ i gram– bakterije, a najviše istražen ligand je endotoksin, tj. LPS. To je površinski antigen karakterističan za gram– bakterije (104).

Osim LPS-a, CD14 prepoznaje i druge molekule vezane za patogene, kao npr. lipoteičnu kiselinu, lipoproteine, peptidoglikane i atipične lipopolisaharide (105,106).

Receptor CD14 prezentira antigene transmembranskim ekstracelularnim receptorima. Tako aktivirani transmembranski receptori pokreću razne signalne puteve unutar stanice koji kontroliraju specifični odgovor imuniteta (107). Receptor CD14 može vezati LPS samo uz prisutnost lipopolisaharid vežućeg proteina (LBP, engl. *LPS binding protein*) (108–112). LBP katalizira njihovo vezanje, a stvaraju ga hepatociti (113–115). LPS- ili peptoglikanski-CD14 kompleks djeluje na receptore na površini stanice, nazvane Toll-u slični receptori 4 (TLR-4, engl. *Toll-like receptors 4*) (113). MD-2 (engl. *myeloid differentiation protein-2*) je koreceptor na receptorskom kompleksu TLR-4 gdje se veže LPS (116). Receptor CD14 se ponaša kao koreceptor, uz TLR-4 i MD-2 za prepoznavanje bakterijskih LPS-a.

Nakon njihova vezanja dolazi do stimulacije receptora. Stimulirani TLR dimerizira, odnosno mijenja konformaciju, te pruža platformu za regrutiranje citoplazmatskih adaptorskih proteina. Citoplazmatska domena TLR receptora nazvana Toll/Il-1 domena (TIR) regrutira pet vrsta adaptorskih proteina: protein primarne mijeloidne diferencijacije 88 (MyD88, engl. *myeloid differentiation primary response protein 88*), adaptor MyD88 (Mal, engl. *MyD88 adaptor like;* također poznat kao adaptorski protein koji sadrži TIR domenu (TIRAP, engl. *TIR domain-containing adaptor protein*)), adaptorski protein koji sadrži TIR domenu i potiče interferon β (TRIF, engl. *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-β*), adaptorska molekula srodna TRIF-u (TRAM, engl. *TRIF-related adaptor molecule*), i protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive (SARM, engl. *sterile alpha and Armadillo-motif-containing protein*) (117). TLR-4 je jedinstveni transmembranski receptor jer može aktivirati

oba seta signalnih puteva: i Mal-MyD88 ovisni i TRAM-TRIF-ovisni (118). Ovisno koji se set aktivira taj će i odrediti smjer imunosnoga odgovora (117).

Promijenjeni TLR-4 aktiviraju niz različitih kinaza. Kinaze dalje fosforiliraju druge bjelančevine kao npr. nuklearni čimbenik za lance κ limfocita B (NFκB, engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i regulatorni faktor interferona 3 (IRF-3, engl. *interferon regulatory factor-3*). Oni se prenose u jezgru gdje utječu na izražaj gena pa nastaju razni obrambeni protuupalni čimbenici (čimbenik tumorske nekroze (TNF), antimikrobni peptidi (AP-1) itd.) (113). Tako dolazi do aktivacije upale i do sinteze upalnih citokina i kemokina prirođenoga imuniteta koje dalje mogu aktivirati stečeni imunitet (104,119). Osim TLR-4, u prepoznavanju sudjeluje još TLR-2 koji veže proteoglikane gram+ bakterija (113). Receptor CD14 i LBP zajedno mogu opsonizirati čak cijelu bakteriju i apoptoičnu stanicu, uklanjajući tako infekciju i smanjujući upalu (120,121).

Funkcije receptora CD14

Nakon stimulacije receptora TLR-4, prvo se aktivira TIRAP-MyD88-ovisni signalni put koji dalje aktivira NF-κB (122). Zatim se internalizira cijeli receptorski kompleks, uključujući CD14, te tek sada slijedi aktivacija TRAM-TRIF signalnoga puta, a njegova aktivacija započinje u endosomu (123). Jiang i suradnici (2005) demonstrirali su potrebu receptora CD14 za aktivaciju TLR/TRAM-TRIF signalnoga puta s vrlo visokim dozama LPS-a. U odsutnosti receptora CD14, LPS nije mogao inducirati TRAM-TRIF-ovisnu IRF-3 aktivaciju te posljedično produkciju interferona tip-1 (IFN-1) (124). Nuklearni čimbenik aktiviranih T-stanica (NFATc, engl. *nuclear factor of activated T cells*) je transkripcijski čimbenik koji ima ulogu u stečenom imunitetu pri diferencijaciji i aktivaciji T i B stanica. On može regulirati produkciju IL-2 od strane T-stanica. Kod stanica prirođenoga imuniteta malo je poznato o njegovoj funkciji. Signalni put CD14-NFAT važan je biološki proces za aktivaciju dendritičnih stanica LPS-om. O posljedicama aktivacije NFAT još je malo poznato (118).

Stoga, receptor CD14 ima tri glavne funkcije:

– osigurava produkciju citokina ovisnu o čimbeniku NF-κB i uz prepoznavanje malih doza LPS-a, prezentirajući LPS receptoru TLR-4
– kontrolira premještanje LPS-receptorskoga kompleksa endosomu, potičući tako TLR-4 endocitozu i aktivaciju signalnoga puta TRAM-TRIF te produkciju IFN-1
– aktivacija dendritičnih stanica i produkcija IL-2 (118).

sCD14 i Toll-u slični receptor

Lein i Ingalls (2002) zaključili su kako kolonizacija mikroorganizama i njihovih produkata, uključujući LPS, bakterijske lipoproteine, peptidoglikane i bakterijsku deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) rezultira interakcijom bakterijskih komponenti s Toll-u sličnim receptorima (TLRs, engl. *Toll-like receptors*) (ukupno njih 10) pokrećući odgovor domaćina. Oni upravo drže da je TLR sustav receptora ključan aktivator urođenoga imuniteta (26). Tu studiju 2011. godine potvrđuju i Moresco EMY, LaVine D i Beutler B (125). TLR-2 (engl. *Toll-like receptor 2*) i TLR-4 prepoznaju peptidoglikane gram+ bakterija i LPS gram- bakterija, samostalno ili s koreceptorom CD14 (126,127). TLR-2 prepoznaje peptidoglikan i LPS *Streptokoka mutansa*, najčešće kariogene bakterije (128). Drži se da epitelne stanice gingive imaju većinom TLRs receptore. Odontoblasti zdravoga zuba pokazuju ekspresiju TLR-2 i TLR-4 (129). Također prijašnje studije upućuju na prisutnost receptora sCD14 i topivog Toll-u sličnog receptora 2 (sTLR-2, engl. *soluble Toll-like receptor 2*) u slini (130,131). Bakterijskom aktivacijom TLR-2 i TLR-4 može se aktivirati sinteza citokina i kemokina koji dovode do razaranja tkiva parodonta (4,125).

Nadalje, pomoću salivarnih biljega kao što su proupalni citokini (IL-6, IL-8, TNF-α), matriks metaloproteinaza 8 (MMP-8), upalni protein makrofaga (MIP-1a) i topivi receptor TLR-2, prati se subklinički i klinički status upale kod karijesa i parodontne bolesti, kao područja od širega interesa istraživanja (3–6).

Koncentracija sCD14 u slini

Neke studije utvrdile su preventivnu funkciju sCD14 u razvoju parodontne bolesti (132). Također, drugi autori su prepoznali porast sCD14 kao dio imunosnoga odgovora domaćina kod kliničke manifestacije parodontnih bolesti (30), što nam pokazuje na potencijalnu važnost monitoringa sCD14 u razvoju dentalnoga karijesa (3,6). Zhao i suradnici su mjerili koncentraciju sCD14 i sTLR-2 u slini djece s karijesom te su utvrdili povećanu koncentraciju sTLR-2 kod djece s karijesom, ali ne i koncentraciju sCD14 u odnosu na djecu bez prisutnosti karijesa (4). Nasuprot tomu, Bergandi i suradnici (2007) su došli do zaključka da sCD14 nije u slini prisutan kod još ranih karijesnih lezija u dječjoj populaciji, koje se ne detektiraju kliničkim pregledom (27). Biria i suradnici (2010) pratili su koncentraciju sCD14 u slini djece s karijesom te su došli do zaključka da djeca s karijesom imaju veće koncentracije sCD14 u slini, ali i da se koncentracija sCD14 u slini smanjila tri mjeseca nakon provedene sanacije karijesa. Predložili su da se receptor sCD14 može rabiti kao biljeg za karijes kod djece u pozitivnoj korelaciji (133).

Koncentracija sCD14 u slini odraslih osoba s karijesom se manje ispitivala nego li salivarna sCD14 koncentracija u djece različite dobi. Zbog toga ova studija donosi rezultate mjerenja koncentracije sCD14 u slini odraslih osoba kao i dodatne parametre sline.

Povećana koncentracija sCD14 u serumu

Topivi oblik receptora, solubilni CD14, nalazi se u serumu te se stvara sekrecijom i enzimatskim otpuštanjem mCD14 s površine stanica (100,134). Kliničke studije pokazale su porast koncentracije serumskoga sCD14 kod raznih upalnih bolesti kao npr. Kawasakijeve bolesti, atopičkoga dermatitisa, bolesti jetre, reumatoidnoga artritisa, sistemskoga lupus eritematozusa, primarnoga sindroma Sjögren, sepse itd. (9,135–138). Salivarni sCD14 može posredovati aktivaciji oralnih epitelnih stanica preko LPS-a i receptora TLR-4 (139) te na taj način može utjecati i na epitelne stanice oralne sluznice, povećavajući tako produkciju citokina (140,141).

1.3. Demineralizacijske promjene tvrdih zubnih tkiva

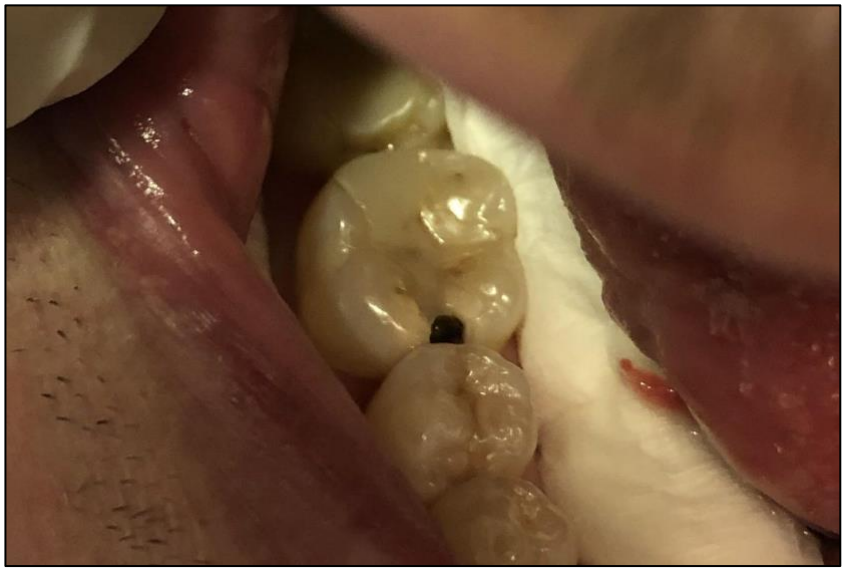
Većina patoloških promjena tvrdih zubnih tkiva započinje procesom demineralizacije (33). Za nastanak demineralizacije odgovorno je djelovanje kiselina. Kod razvoja karijesne lezije, kiseline nastaju metabolizmom bakterija zubnog plaka. Tada pH-vrijednosti plaka padaju ispod kritične vrijednosti od 5,5 kada nastupa demineralizacija. Kod razvoja erozivne lezije, kiseline nastaju egzogeno ili su unesene endogeno. U ovom slučaju, razlika je u tome da djelovanje kiselina na caklinu nije konstantno kao u razvoju karijesa, već kiselina djeluje intermitentno, ali agresivno gdje se pH-vrijednosti snizuju čak i do 2 – 3. U oba slučaja proces demineralizacije počinje djelovanjem kiselina. Što je veći koncentracijski gradijent kiselina na površini zuba, to je brža difuzija nerazgrađene kiseline i već disociranih iona u caklinu. U caklini se vodikovi ioni tada brže troše, oslobađajući iz nje ione kalcija i fosfata što potiče daljnju razgradnju kiseline i razlaganje kristala hidroksiapatita.

Brzina demineralizacije proporcionalna je količini i jačini kiselina. Iako vrijeme izloženosti zuba kiselinama nije stalno kod erozija kao kod karijesa, proces demineralizacije kod erozije je brži, jer su te endogene i egzogene kiseline agresivnije od manje agresivnih organskih kiselina nastalih u dentobakterijskom plaku.

Zbog toga i zbog strukturne građe zuba, izgled lezija karijesa i erozija je različit. Kod zubnoga karijesa promjene su karakterizirane pojavom inicijalne lezije koja se klinički očituje poput neprozirne (bijelo-žute) mrlje bez kavitacije cakline. Daljnjim širenjem karijesa, lezija poprima sve tamniju boju, a razorenost tvrdoga zubnog tkiva sve je veća (42) (Slike 1, 2). Kod erozija tvrdih zubnih tkiva lezije su visoke glatkoće i sjaja (142) (Slike 3-5).



Slika 1. Karijes fisure molara



Slika 2. Uznapredovali aproksimalni karijes s prisutnom kavitacijom



Slika 3. Erozivne promjene palatinalnih ploha inciziva



Slika 4. Erozivne promjene lingvalnih ploha molara



Slika 5. Erozivne promjene vestibularnih ploha

Spiralni i valoviti tijek caklinskih prizama te specifičan raspored kristala čine caklinu najtvrđim i vrlo otpornim tkivom u ljudskom organizmu. Zubna caklina građena je od kristala hidroksiapatita veličine 40 –10 nm, ugrađenih u stromu organskoga matriksa, tvoreći gusto zbijeni mineralni sustav, koji sadrži u težinskim postocima 93 – 96 % anorganske tvari, 0,5 – 4 % organske tvari i 3 – 3,5 % vode (142–144). Anorganska tvar sastoji se od 55,5 % fosfata, 37 % kalcija, 0,5 % natrija te drugih elemenata (stroncija, olova, fluora, magnezija) (142). Kemijskim analizama pronađeno je pet vrsta ili oblika bioloških kalcij-fosfata od kojih je u zubnim tkivima najzastupljeniji kalcijev hidroksiapatit.

Formula hidroksiapatita: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (191)

Ostale četiri vrste nalaze se ili u stadiju razvoja zuba ili za vrijeme procesa demineralizacije i remineralizacije u zreloj caklini u vrlo malim postotcima (42). Uloga organskoga matriksa je, osim što povezuje kristale hidroksiapatita, da omogućuje stalnu difuziju i izmjenu iona između kristala i okoline zuba.

Demineralizacija tvrdih zubnih tkiva započinje procesom difuzije organskih kiselina, koje su produkt fermentacije ugljikohidrata acidogenih bakterija, među kristale. Tada se kalcij i fosfati iz kristalne rešetke razlažu u vodeni milje okoline kristala (144). Fosfatnim ionima prezasićena okolina zuba mijenja osmotski tlak te dolazi do daljnjega razlaganja molekula hidroksiapatita i spajanja fosfatnih iona iz istoga sa slobodnim vodikovim ionima. To dovodi do otapanja površinskoga dijela kristalne strukture hidroksiapatita, što omogućuje izravan prodor kiselina u kristal i ubrzavanje procesa demineralizacije. Brzina procesa demineralizacije izravno je proporcionalna količini i jačini kiselina (145). Za snižavanje pH-vrijednosti odgovorni su vodikovi ioni koji, vežući se za fosfatne ione, mijenjaju osmotsku ravnotežu u okolini zuba. Kod karijesa radi se o dugotrajnom djelovanju relativno slabih organskih kiselina iz plaka. Inhibicija puferskoga djelovanja uvjetovana nemogućnošću penetracije bikarbonatnih pufera kroz plak omogućuje djelotvornost spomenutim kiselinama i snižavanje pH vrijednosti plaka ispod kritične vrijednosti od 5,5 kada nastupa proces demineralizacije (146–148).

Unatoč razlikama u etiologiji, lokalizaciji i izgledu promjena, početna faza demineralizacije cakline kod karijesa i erozije je identična (149). U oba slučaja za nastanak demineralizacije odgovorno je djelovanje kiselina. Djelomična demineralizacija površine i popovršine čini caklinu mekšom daljnjom demineralizacijom kod nastanka karijesne lezije (38). Nasuprot tomu, erozivnu leziju karakterizira potpuno otapanje apatitnih minerala cakline i dentina te se lezija doima tvrdom (150). Ako su ioni fluorida prisutni na površini kristalne rešetke u dovoljnoj koncentraciji prije početka demineralizacije ili tijekom nastanka demineralizacije, ti ioni mogu biti apsorbirani na površinu kristala te će tako inhibirati demineralizaciju i nastanak karijesne lezije (151). Protektivni učinak fluorida na eroziju je kontroverzan te je pokazao rezultate samo kod primjene fluorida visoke koncentracije (50).

1.3.1. Karijes

Karijes je bolest tvrdih zubnih tkiva primarno bakterijskoga uzroka (152,153). Unazad više desetljeća karijes je dosta istraživan s obzirom na procese mineralne kompozicije zuba, sline, mikrobiologiju, strukturu zuba, procese difuzije, demineralizaciju i remineralizaciju (154–163).

Karijesna lezija je u presjeku koničnoga oblika. Unutar lezije postoje jasno odijeljene zone koje se međusobno razlikuju zbog različitoga stupnja gubitka primarnoga volumena manifestiranoga stvaranjem pora (38).

Klasifikacija karijesa

Prvo se rabila klasifikacija karijesne lezije prema Blacku, koja klasificira lezije s obzirom na njihovu lokalizaciju na zubu (164). Međutim, predložene su nove klasifikacije koje uzimaju u obzir i dubinu prodora karijesa i aktivnost lezije (165).

Sustav za rangiranje i klasifikaciju karijesnih lezija (ICDAS, engl. *international caries detection and assessment system)* označava aktivnost karijesa u caklini, dentinu i cementu. Već korištene ICDAS klasifikacije I i II su se pokazale složene za svakodnevnu uporabu pa je razvijena modificirana ICDAS klasifikacija (166). Nedostatak klasifikacije je da ne označava koja ploha zuba je zahvaćena karijesom.

Klasifikacija po G. Mountu obuhvaća i dubinu demineralizacije i označava plohu zuba. ali ne označava patohistološke promjene na površini zuba (167).

Dijagnostički postupci

S obzirom na to da je karijes vrlo destruktivna bolest tvrdih zubnih tkiva, važna je njegova pravovremena detekcija kako bi se na vrijeme spriječio daljnji razvoj karijesa i provela restauracija razorenih tvrdih zubnih tkiva. Napredovanjem i tehnološkim razvojem restaurativne stomatologije danas se sve više daje naglasak na prevenciju i minimalnu intervenciju u terapiji mikroskopskih karijesnih lezija te što je moguće veće očuvanje zubnoga tkiva.

Dijagnosticiranje karijese lezije je postupak za koji je potrebno:

- utvrditi leziju
- procijeniti proširenost lezije i
- procijeniti aktivnost lezije (168).

Za dijagnosticiranje dugo se promjenjivao taktilno-vizualni postupak oštrom sondom. Međutim, tim se postupkom dijagnosticira samo kavitacija zuba uz nemogućnost mjerenja napredovanja bolesti.

Bolje razumijevanje nastanka karijesa kao bolesti, uloga prevencije u zaustavljanju karijesa te bolji dijagnostički postupci omogućavaju kliničaru utvrđivanje rane demineralizacije prije nastanka kavitacije.

Dijagnostički postupci koji se najčešće koriste u dijagnostici karijesne lezije jesu:

- inspekcija sondom i ogledalom
- radiografija (RG)
- digitalna radigrafija (RVG, engl. *radiovisiography*)
- fibrooptička transiluminacija mjerenja električkoga otpora
- upotreba boje za detekciju
- ultrazvučna detekcija i
- laserska fluorescencija.

Prilikom inspekcije zuba sondom i ogledalom, istražuje se tvrdoća cakline, promjene u boji i gubitak prirodne translucencije zuba zbog moguće demineralizacije (168,169). Neki autori zagovaraju izbacivanje sonde iz upotrebe u detekcija karijesa u fisuri zato što sonda mehanički oštećuje demineraliziranu caklinu, što rezultira razvojem karijesa i još većim oštećenjem fisure pripadajućega zuba (170,171). Sušenje površine zuba komprimiranim zrakom omogućuje se bolje prepoznavanje prvoga klinički zamjetljivoga znaka demineralizacije, bijele mrlje u caklini. Takva lezija zahvaća pola debljine cakline. Bijela ili smeđa mrlja koja je prepoznatljiva i na vlažnoj površini zuba predstavlja veći gubitak minerala te se proteže cijelom debljinom cakline uz zahvaćenost dentina (172). To se objašnjava razlikom relativnih refraktornih indeksa (RI, engl. *refractive index*) zraka, vode i cakline.

Sušenjem zrak zamjenjuje vodu u porama tkiva te je promjena prepoznatljivija jer je RI zraka (1,0) udaljeniji od RI cakline (1.62), u usporedbi s RI vode (1,33). Za utvrđivanje aktivnosti lezije neophodno je znati razlučiti izgled lezije. Čini li se lezija sjajno, a ne mat, ona je neaktivna. Prisutnost plaka pokazatelj je aktivne lezije. Zaustavljena lezija može se reaktivirati pa takva lezija postaje mekana (172).

U upotrebi se pojavio prijenosni lasersko-fluorescentni uređaj DIAGNOdent Pen KaVo, Njemačka (DDPen) koji koristi infracrveni diodni laser valne duljine 655 nm (173). Uređaj pokazuje superiornije rezultate u detekciji karijesa, nego konvencionalne rendgenske snimke, kao i vrlo točna mjerenja u vlažnom i suhom području (169,174,175). Metoda može biti korisna pri detekciji onih lezija koje se ne vide golim okom (176–179).

Također, naizgled zdrava caklina može skrivati karijes. Uzrok tome može biti masovna fluoridacija uslijed čega dolazi do promjene u izgledu novonastale karijesne lezije. Karijes napreduje u slojevima dentina zbog povećane tvrdoće cakline, a s relativno malom kavitacijom. Takav karijes nazivamo skriveni jer nije uvijek vidljiv klinički, ali se može utvrditi pomoću DDPen uređaja.

1.3.2. Erozija

Erozija je ireverzibilni gubitak tvrdih zubnih tkiva kemijsko-mehaničkim procesom demineralizacije koji ne uključuje bakterije (180). Prvi je opisuju Darby 1892. i Miller 1907. godine (181,182). Na razvoj erozije utječe više faktora (183). Svi faktori imaju određenu ulogu pa će tako u nekom vremenu ili dovesti do gubitka tvrdih zubnih tkiva ili će djelovati štiteći površinu zuba (184,185). Najvažniji biološki faktori su protektivni učinak sline i njezin doprinos u formiranju pelikule koja predstavlja površinsku zaštitnu barijeru. Također, utječe i sama količina nestimulirane sline, njezin puferski kapacitet i sastav, zubna struktura te anatomija zuba i okolnoga mekog tkiva zbog njihova međusobnog odnosa. Kemijski faktori uključuju pH-vrijednost sline, jačinu adhezije, koncentraciju kalcija, fosfata i fluorida (53,184,186). Faktori koji su vezani za ponašanje uključuju navike u prehrani (kisela pića, svježe voće), način života te konzumacija alkohola, droga i ostali faktori (53,187,188).

Utvrđeno je da se erozije mogu javiti uslijed sve češće pojave gastrointestinalnih bolesti te veće konzumacije kiselih energetskih i gaziranih pića (189–194). Mehanizam nastajanja erozija tvrdih zubnih tkiva u tih bolesti je isti. Istraživanja su pokazala kako i alkoholna bolest uzrokuje nastanak erozija tvrdih zubnih tkiva (42,195). U novije vrijeme također se povezuje bolest ovisnosti o drogi kao uzrok dentalnih erozija i gubitka zubne supstance (196).

Ostale bolesti i stanja koja dovode do povećanja kiselosti sline endogeno su anorexia nervosa, bulimia nervosa, gastroezofagealna refluksna bolest (GERB), hiatus hernia i povraćanje u trudnoći (185,197–199). Na jaču prevalenciju erozivnih promjena može utjecati i razvoj kserostomije (200). Primijećeno je da se erozivne promjene javljaju češće kod muških osoba i to u sve mlađoj populaciji (201).

Erozija se klasificira prema izvoru kiselosti kao:

- Endogena erozija nastaje utjecajem kiseline na tvrda zubna tkiva iz probave. Povezuje se s poremećajima hranjenja (anorexia, bulimia nervoza) te s gastroezofagealnim refluksom i regurgitacijom želučanoga sadržaja (trudnoća, alkoholizam, hiatus hernia) (142,154,181–183,185).
- Egzogena erozija nastaje utjecajem kiseline na tvrda zubna tkiva koja potječe iz prehrambenih proizvoda (visoko erozivna hrana i pića s niskim pH) i medikamenata (202).

Mikroskopskim metodama pokazalo se kako se erozivne lezije u caklinskim prizmama vide kao karakteristična mjesta demineralizacije koja se nalaze i u prizmama i u interprizmatskim prostorima. U aprizmatskoj caklini mjesta demineralizacije su više nepravilna s različitim stupnjem gubitka minerala. U dentinu je prvo zahvaćen peritubularni dentin, a potom se demineraliziraju i područja intertubularno (150). Erozivna lezija klinički ima izgled visoke glatkoće uz odsustvo perikrimata na površini i intaktnu caklinu duž ruba gingive s pojavom jamica na okluzalnim plohama (najčešće prvih donjih kutnjaka). Poslije se erozivne lezije katkad teško razlikuju od lezija atricije, abrazije i abfrakcije, jer i one mogu biti dio fiziološkoga gubitka tvrdih zubnih tkiva. Također se promjene očituju na labijalnim plohama gornjih sjekutića, očnjaka i premolara. Najrjeđe su zahvaćeni umnjaci i donji prednji zubi cervikalno (185,203,204). Lokalizacija erozija može se dovesti u vezu s putom unosa kiselina

gdje su erozije endogenoga podrijetla lokalizirane najčešće na oralnim plohama zubi, dok su egzogene erozije lokalizirane češće na labijalnim plohama zubi (42,205). Erozija može pridonijeti gubitku tvrdih zubnih tkiva i na način da „omekšava“ površinu zuba kroz proces demineralizacije što zatim pojačava proces fiziološkoga trošenja zuba. Međutim, treba ih međusobno razlikovati kako bi terapija bila adekvatna (206,207).

Dijagnostika erozija je metodološki vrlo specifična. Dijagnostika se temelji na činjenici da tijekom djelovanja kiseline na površinu zuba ioni vodika otapaju minerale u caklini i caklina gubi ione kalcija, površina zuba se omekšava i postaje grublja, što dovodi do pada refleksije površine (208). Prije su se metode u dijagnostici odnosile na mjerenja površinske mikro tvrdoće (SMH, engl. *surface microhardness measurements*) koja se nije pokazala dovoljno osjetljivom, i zatim na atomsku apsorpcijsku spektrometriju (AAS, engl. *atomic absorption spectroscopy*) koja analizira količinu kalcijevih iona otpuštenih sa zuba, ali ne analizira morfološke promjene na površini zuba i broji i ione kalcija iz sline čime rezultati nisu točni (180). U današnje vrijeme najpouzdanija metoda u dijagnostici je optička analiza refleksije s površine zuba gdje se promjene reflektiranoga signala s površine zuba mjere optičkim reflektometrom (208). Metoda se pokazala točnom, brzom, jednostavnom i neinvazivnom (180,209).

U registraciji erozivnih promjena prvi se rabi indeks zubnog trošenja (TWI, engl. *tooth wear index*) (210) koji analizira sve zubne plohe i daje uvid u intenzitet gubitka zubne supstance te se za svaku plohu može bilježiti status zasebno. U zadnjih dvadeset godina taj se indeks koristio u mnogim studijama te su se razvile i neke modifikacije toga indeksa (211). Kako bi se jednostavnije mogao bilježiti gubitak zubne supstance i time približiti kliničarima bolju mogućnost istraživanja erozija u svrhu podizanja svjesnosti problematike na sve veću prevalenciju te patološke promjene na zubima, razvijen je indeks osnovne procjene erozivnog trošenja (BEWE, engl. *the basic erosive wear examination*) (212).

Osim sve veće prevalencije erozija, njihova simptomatologija također predstavlja problem za pacijenta. Ako je proces demineralizacije brz, pojačana je osjetljivost zuba i to je prvo na što se pacijent žali. Drži se da česta aplikacija topikalnih fluorida visoke koncentracije može imati učinak u smislu prevencije daljnje demineralizacije i na taj način dovesti do povećane otpornosti erozivne lezije na abraziju (53). Ako proces demineralizacije i dalje traje, erozivna lezija se može zaštiti i slojem materijala za ispune. Krajnji ishod je endodontsko liječenje zuba te izrada protetskoga nadomjeska radi restauracije zubne krune.

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je usmjereno na ispitivanje povezanosti prevalencije demineralizacijskih promjena tvrdih zubnih tkiva s koncentracijom topivoga receptora CD14 u slini odraslih ljudi. Koristeći rezultate dobivene analizom koncentracije sCD14 u slini kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina te njihovom statističkom obradom, evaluirali bi učinkovitost određivanja koncentracije sCD14 u slini kao pokazatelja nastanka demineralizacijskih promjena tvrdih zubnih tkiva nastalih zbog karijesnih oštećenja. Također, ispitivanje koncentracije sCD14 u slini odraslih osoba koje posjeduju različiti broj karijesa dao bi bolji uvid u poznavanje imunosnoga odgovora glede upalnih procesa u usnoj šupljini.

Specifični ciljevi:

1. Odrediti povezanost između koncentracije salivarnoga sCD14 s demineralizacijskim promjenama tvrdih zubnih tkiva,
2. Usporediti koncentraciju salivarnog sCD14 u ispitanika sa zubnim karijesom i zdravih kontrola,
3. Ispitati mogućnost upotrebe salivarnog sCD14 kao markera aktivnosti karijesa,
4. Odrediti status sline (volumen, pH-vrijednost i puferski kapacitet sline) u kontrolnoj skupini te u ispitanika s različitim brojem zubnog karijesa.
5. Odrediti utječe li lokalizacija demineralizacijskih promjena u zubalu na promjenu koncentracije salivarnoga sCD14,
6. Izmjeriti jačinu demineralizacije karijesnih promjena tvrdih zubnih tkiva uređajem KaVo DIAGNOdent Pen,
7. Ispitati utječe li frekvencija demineralizacijskih promjena na koncentraciju salivarnoga sCD14.

Hipoteza ovoga istraživanja je:

„Osobe s karijesom tvrdih zubnih tkiva imaju povećanu koncentraciju salivarnoga sCD14 te koncentracija sCD14 može uputiti na prisutnost demineralizacije tvrdih zubnih tkiva“.

3. ISPITANICI I METODE

Svi ispitanici istraživanja uključeni su u istraživanje dobrovoljno uz poštivanje svih bioetičkih standarda. Uzeti uzorci sline označeni su šiframa kako bi se osobni podatci ispitanika očuvali tajnima. Istim su se šiframa označili i ispunjeni anketni listići kako bi se podatci dobiveni na taj način također sačuvali tajnim.

3.1. Ispitanici i prikupljanje podataka

Ispitanici eksperimentalnih skupina i kontrolne skupine dobrovoljci su Zavoda za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svaki ispitanik informiran je o svrsi istraživanja te je dao pristanak na pregled. Prije početka pregleda ispunio je anketni listić. Kriterije koje su svi ispitanici trebali zadovoljiti jesu da imaju većinu svojih prirodnih zuba bez obzira na njihovo stanje, kako bismo mogli registrirati promjene na tvrdim zubnim tkivima. Također, oralni status bez potpunih proteza, dob od 20 do 40 godina, a kod žena i isključenu trudnoću, kako hormonski status i degenerativne promjene u usnoj šupljini ne bi utjecali na rezultate istraživanja. Oni dobrovoljci koji su bili unazad dva tjedna bolesni ili su koristili protuupalne lijekove (analgetici, antipiretici, antibiotici, kortikosteroidi), koji boluju od kroničnih bolesti, koji su imali stomatološke ili medicinske zahvate unazad dva tjedna ili su u postupku endodontske sanacije zuba, te oni kojima je stomatološkim pregledom utvrđena upala sluznice usta, gingive ili parodonta, bili su isključeni iz istraživanja.

Ispitanici su izabrani prema rezultatima koji su dobiveni njihovim stomatološkim pregledom, potpisanom izjavom ispitanika o njihovom općem zdravlju i samim pristankom na istraživanje.

Prikupljanje podataka napravljeno je uz pomoć anketnog listića (Prilog 1), istog za sve skupine ispitanika.

Anketni listić sadržavao je varijable vezane za utvrđivanje općeg zdravlja ispitanika te za određivanje ugroženosti od pojave demineralizacijskih promjena tvrdih zubnih tkiva, te je uključivao slijedeće podatke:

- dob i spol ispitanika
- pitanja vezana za opće bolesti i poremećaje probavnog sustava
- pitanja vezana za prehranu
- uzimanje lijekova
- pitanja vezana za loše navike (pušenje, uživanje droga itd.).

3.1.1. Klinički opis prikupljanja podataka

Stomatološki pregledi provodili su se u ordinacijama Zavoda. Svi podatci dobiveni pregledom, bilježili su se u za to posebno kreiran obrazac (Prilog 2). Prije utvrđivanja broja i lokalizacije demineralizacijskih promjena tvrdih zubnih tkiva, utvrdilo se stanje parodonta jer su upale gingive ili parodonta bile faktor isključenja iz daljnjeg istraživanja. Pažljivo su se parodontološkom sondom sondirala sva suspektna mjesta. Pritisak koji se primjenjuje pri sondiranju nije smio biti veći od 20g što bi bilo približno jednako praktičnom testu za primjenu sile kao pritisak sonde na prst dok se ne pojavi promjena boje (205,213,214). Ako bi se utvrdila upala gingive ili parodonta ispitanik bi bio isključen iz istraživanja. Zatim je slijedio klinički pregled za utvrđivanje demineralizacijskih promjena. Obavljen je uz pomoć sonde i ravnog zrcala, nakon prethodnog sušenja komprimiranim zrakom uz korištenje klasičnog osvjetljenja na stomatološkoj stolici. Neki od kliničkih nalaza prikazani su fotografijama (Slike 6-9).



Slika 6. Erozivne promjene labijalnih ploha gornjih inciziva



Slika 7. Erozivne promjene labijalnih ploha; na kaninu je erozivna promjena kombinirana s nastankom karijesa



Slika 8. Karijes centralne fisure molara



Slika 9. Aproksimalni karijes molara

Za preciznu detekciju karijesnih promjena korišten je uređaj DDPen (KaVo America, Lake Zurich, IL). Mjesto na zubu se prethodno osušilo komprimiranim zrakom ili pamučnim tupferom (Slika 10). Ovaj uređaj se koristio za određivanje stupnja demineralizacije patoloških lezija.



Slika 10. Mjerenje demineralizacijskih promjena uređajem KaVo DIAGNOdent Pen (KaVo America, Lake Zurich, IL)

3.1.2. Uzorkovanje

Ispitivanje statusa sline obavljeno je ujutro (9 - 11 sati), natašte (215). U uzorcima stimulirane i nestimulirane sline određen je protok, pH-vrijednosti sline, puferski kapacitet sline i koncentracija topivoga receptora CD14.

Nestimulirana slina:

Metodom skupljanja sline, kroz 1 minutu (bez gutanja sline), mjerili smo volumen (mL) nestimulirane sline, odnosno protok (216). Uzorci nestimulirane sline skupljeni su u graduiranu sterilnu epruvetu preko staklenoga lijevka.

Protok sline razdijelili smo u skupine:

– normalan: > 0.21 mL/min

– nizak: 0.11 – 0.2 mL/min te

– vrlo nizak: ≤ 0.1 mL/min (1).

Stimulirana slina:

Ispitanici su prvo progutali sadržaj sline u ustima te relaksirani, u sjedećem položaju, započinjali žvakati 1,5 grama čistoga voska (Parafilm®, American National CAn, Greenwich, CT, USA). Izlučena slina se tijekom žvakanja 5 minuta skupljala u graduiranu sterilnu epruvetu te je time utvrđen i ukupni volumen izlučene stimulirane sline. Svi uzorci sline su se odmah pohranjivali u zamrzivač na temperaturu -20 °C u sterilnim (pyrogen-free) polipropilenskim epruvetama od 15 mL (Kartell, Noviglio, Italija) (Slika 11).

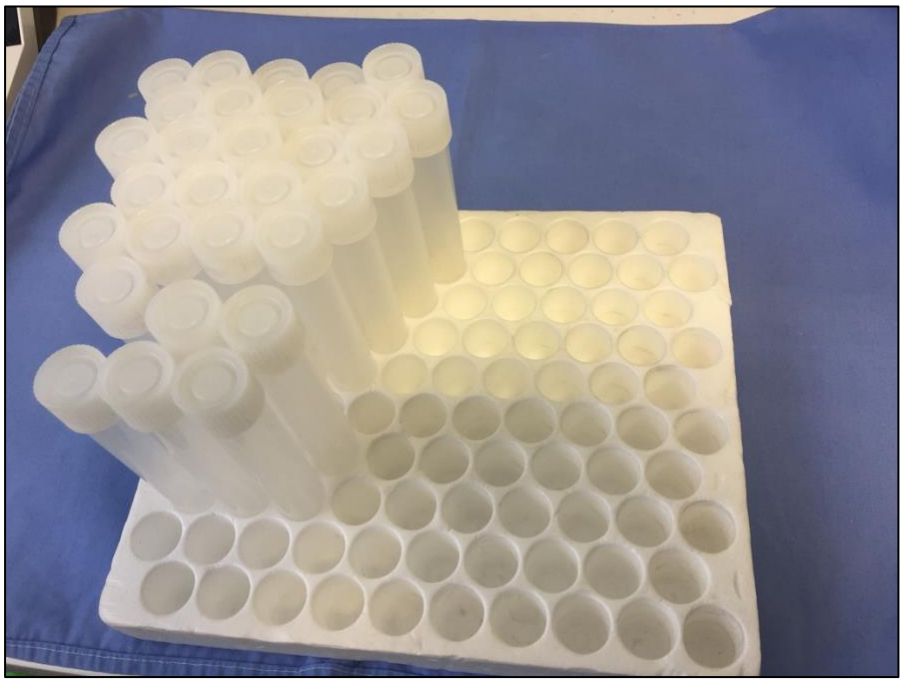
Protok stimulirane sline skupljen u 5 minuta razdijelili smo u skupine:

- normalan: > 5 mL,
- nizak: 3.5 – 5.0 mL, te
- vrlo nizak: < 3.5 mL (217)

Nadalje, skupinu ispitanika s rizičnim protokom stimulirane sline podijelili smo u dvije skupine:

– s niskim protokom (0.71 – 1.00 mL/min) i
– vrlo niskim protokom (≤ 0.7 mL/min) (217).

Vrlo nizak protok stimulirane sline (< 0.7 mL/min) je ustanovljen kod hiposalivacije i kserostomije (218,219).



Slika 11. Polipropilenske sterilne epruvete (Kartell, Noviglio, Italija)

3.2. Postupci

3.2.1. Određivanje karijesa

Dentalni status se registrirao pomoću „decayed, missing and filled teeth“ indeksa (DMFT). On nam daje uvid u trenutno stanje zubala, gdje nam je posebno važna frekvencija karijesa. Iz njega također vidimo i prijašnje karijese prema broju postojećih ispuna.

DMFT indeks

Za obilježivanje dentalnoga statusa služili smo se brojevima kako je prikazano u tablici (Tablica 2).

Tablica 2. DMFT indeks

OZNAKA	STATUS ZUBA
0	Intaktan
1	Karijes
2	Ispun s karijesom
3	Ispun bez karijesa
4	Nedostaje zbog karijesa
5	Nedostaje – drugi razlog
6	Fisurni pečat
7	Protetski nadomjestak (most, krunica, fasetirana ljuska)
8	Zub nije izniknuo
T	Trauma
9	Nije zabilježen

Kodovi određeni po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) su slijedeći (220):

0. Intaktna kruna bez dokaza tretiranoga ili netretiranoga kliničkog karijesa. Kako se karijes koji prethodi kavitaciji ne može pouzdano detektirati, on je isključen. Tako kruna sa sljedećim defektima može ipak biti zabilježena kao intaktna:
   - Bijele mrlje
   - Diskolorirane mrlje koje su tvrde na sondiranje
   - Obojene jamice ili fisure u caklini koje nemaju vidljive znakove uništene cakline ili omekšanja pri sondiranju
   - Tamna, sjajna, čvrsta, točkasta područja cakline koja pokazuju znakove umjerene do jake fluoroze
   - Lezije koje se pojavljuju zbog abrazije
1. Karijes je zabilježen kao lezija na omekšanoj zubnoj površini, vidljiva kavitacija i potkopana caklina. Tu ubrajamo i zub s privremenim ispunom.
2. Tu podrazumijevamo zub s ispunom, ali i karijesom.
3. Punjen zub bez karijesa. Tu ubrajamo i zub koji je zbog karijesa restauriran krunicom.
4. Nedostatak zuba kao posljedica karijesa.
5. Nedostatak zuba zbog drugih razloga. Rabi se za kongenitalne nedostatke ili ekstrakciju zuba zbog parodontnih bolesti, traume ili iz ortodontskih razloga.
6. Fisurno pečaćenje. Ako zub s pečatom ima karijes, obilježujemo ga kao da ima karijes.
7. Nosač mosta, specijalne krunice ili ljuskice. Koristimo ih za zube koji su restaurirani ili nadomješteni iz drugih razloga osim karijesa. Ako se radi o ljuski, tada takav zub nema karijesa.
8. Neizrasla kruna zuba. Ne uključuje se kongenitalni nedostatak zuba ili zub izgubljen traumom.

T. Trauma. Predstavlja frakturu neke od površina zuba kao rezultat traume, bez dokaza karijesa.

9. Zub nije zabilježen. Rabi se za bilo koji izniknuli zub koji ne može biti istražen iz nekog razloga (ortodontske pregrade…).

Iz podataka dobivenih utvrđivanjem dentalnoga statusa možemo računati dva vrlo važna indeksa: Decayed, missing and filled teeth/surface index (DMFT/DMFS).

D-komponenta obuhvaća kategorije 1 i 2, M-komponenta obuhvaća 4 i 5, a F-komponenta obuhvaća samo zube s oznakom 3. Ubrajaju se svi zubi i treći molari, a zubi zabilježeni brojem 6 (pečatni ispuni) ili 7 (nosači mosta, specijalne krunice ili ljuskice) nisu uključeni u DMFT indeks. DMFT opisuje zastupljenost dentalnoga karijesa, te se ovakva brojčana vrijednost pojavnosti karijesa dobiva zbrajanjem brojeva karioznih zuba (D ili K), zuba koji nedostaje (M ili E) i zuba s ispunom (F ili P). Ako zub ima i ispun i karijes, računa se samo kao kariozan (D).

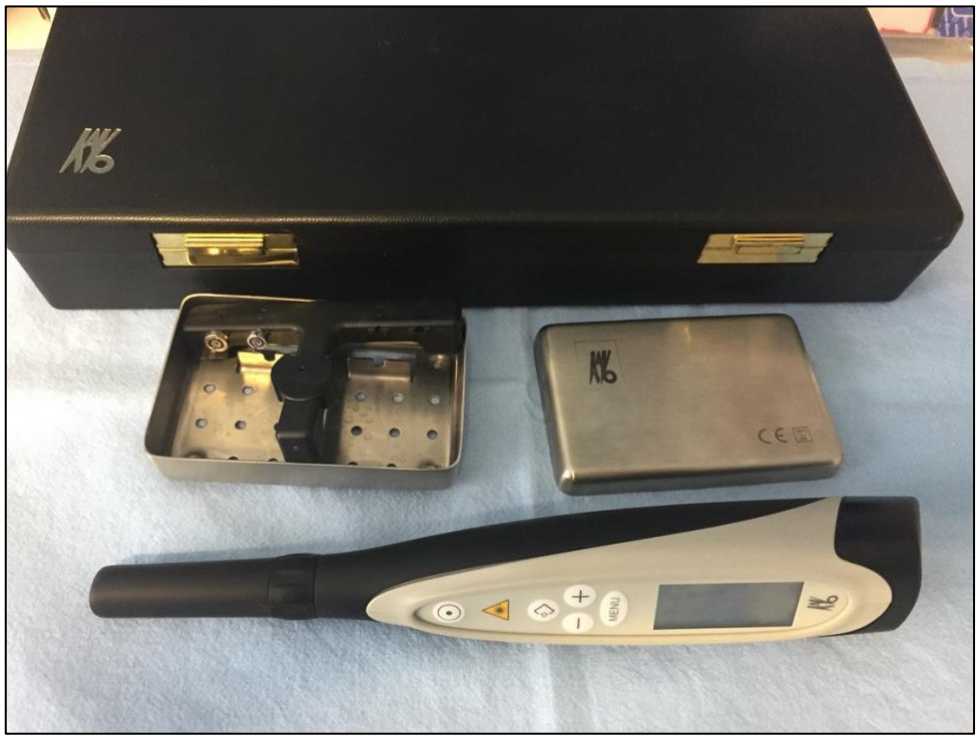
DMFS indeks

Detaljniji indeks od DMFT indeksa je DMFS indeks, koji obuhvaća zubne plohe. Molari i premolari imaju pet ploha, a prednji zubi četiri. Svi dobiveni podatci unosili su se u testnu listu (Prilog 2).

3.2.2. Detekcija i mjerenje jačine demineralizacije tvrdih zubnih tkiva pomoću uređaja KaVo DIAGNOdent Pen

Za precizniju detekciju karijesnih promjena te za mjerenje jačine demineralizacije zubne supstance korišten je uređaj KaVo DIAGNOdent Pen. Primjena uređaja ne predstavlja opasnost po zdravlje pacijenta i doprinosi objektivnoj i preciznoj dijagnozi (174). To je uređaj koji neinvazivnom metodom omogućuje ranu detekciju demineralizacije tvrde zubne supstance na okluzalnim i aproksimalnim površinama. Radi na principu registracije i evaluacije fluorescentnoga zračenja koje emitira promijenjeno zubno tkivo, obasjano svjetlom specifične valne duljine od 655 nm (221). Ta se svjetlosna energija osigurava kroz središte svjetlosne sonde, a koja se aplicira na suspektno mjesto na zubu. Kod patoloških promjena fluorescentno se svjetlo vraća u uređaj putem vanjskih vlakana i evaluira u DDPen-u. Osnovna komponenta uređaja je svjetlosna sonda. Koherentna svjetlost koju emitira svjetlosna sonda uređaja reflektira se od zubnoga tkiva i potom evaluira na ekranu kontrolne jedinice.

S novim nastavcima na laserskoj sondi, DIAGNOdent Pen može reflektirati lasersku zraku pod kutom od 90° te tako analizirati i aproksimalnu plohu zuba gdje se karijes dotada prethodno mogao pravilno detektirati, uglavnom samo radiološkom metodom ugriza u traku BW, engl. *bite-wing*). Takvom primjenom dijagnostike karijesa omogućeno je neinvazivnim postupkom bez zračenja pacijenta dijagnosticirati karijes u najkraćem mogućem vremenu (Slika 12).



Slika 12. Uređaj KaVo DIAGNodent Pen i nastavci za svjetlosnu sondu (KaVo America, Lake Zurich, IL)

Kontrolna jedinica, osim ekrana koji prikazuje numeričke vrijednosti promjena zubnoga tkiva od 0 do 99, sadrži i kontrolne točke za kalibraciju svjetlosnih vlakana sonde, gumb za zvučni signal i indikator istrošenosti baterije. Što je veća numerička vrijednost, to je i patološka promjena veća. Ako uređaj pokaže negativnu vrijednost može se reći da su ta područja čak i „zdravija“.

Klasifikacija numeričkih vrijednosti mjerenja demineraliziranih područja uređajem DDPen (222):

- 0 – 10 nema karijesa ili karijes tek počinje u caklini
- 10 – 20 karijes je dublje u caklini ili dentinu, ali nema lateralne proširenosti
- 20 – 30 karijes je u dentinu s lateralnom proširenošću
- 30 – 99 opseg karijesa se povećava s većim brojem.

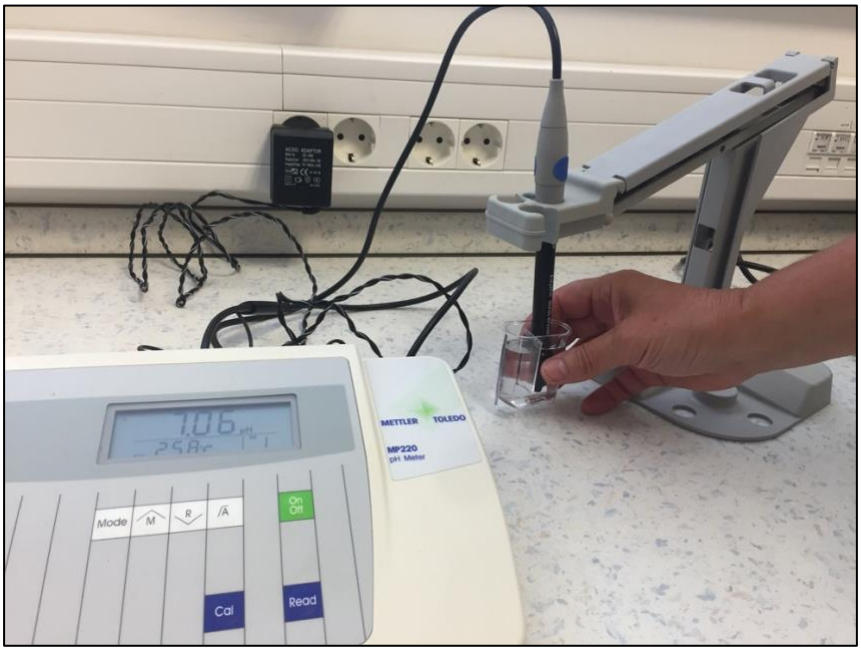
3.3. Metode

3.3.1. Određivanje pH-vrijednosti sline

Uzorci sline otopljeni su na sobnoj temperaturi te ostavljeni na ambijentalnom zraku (3 sata) kako bi se pH stabilizirao. Odredili smo pH-vrijednost sline koristeći digitalni pH-metar (MP 220 Toledo, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) koji koristi standardnu elektrodu InLAB 413 (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Švicarska). Prije svake serije mjerenja, pH-metar smo kalibrirali koristeći standardne pufere pH 7.00 i pH 4.01 (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) (Slike 13, 14). Rezultate smo očitali unutar 30 sekundi. Analizirali smo pH-vrijednosti sline nakon dvaju mjerenja i rezultati prikazuju srednju vrijednost tih mjerenja.



Slika 13. Standardni puferi za kalibraciju pH-metra (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Švicarska)



Slika 14. Digitalni pH-metar i digitalna elektroda (MP 220 Toledo, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Švicarska)

3.3.2. Određivanje puferskoga kapaciteta sline

Prijašnja ispitivanja pokazala su da su neki biokemijski parametri stimulirane sline u boljoj korelaciji s parametrima oralne higijene nego li u nestimuliranoj slini (223). Zbog toga su Kitasako i sur. (2006.) preporučili ispitivanje puferskoga kapaciteta u stimuliranoj slini (224).

Uzorke stimulirane sline (0.5 mL) titrirali smo s 0.1 mol/L klorovodične kiseline (HCl, engl. *hydrocloric acid*) (Kemika, Zagreb, Hrvatska) (96). pH-vrijednosti sline izmjerene su svaki put nakon dodavanja 50 μL i 70 μL kiseline unutar 30 sekundi. Ustanovljeno je da dodavanje 70 μL kiseline daje najbolju procjenu puferskoga kapaciteta sline.

Rezultati su podijeljeni u tri skupine:

- visoki puferski kapacitet: pH > 5.5
- srednji puferski kapacitet: pH 4.5. – 5.5 te
- niski puferski kapacitet: pH < 4.5 (225–227).

3.3.3. Određivanje koncentracije sCD14 u slini ELISA metodom

Koncentracija sCD14 određena je „sendvič“ enzim-imunokemijskim testom (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). ELISA je metoda za mjerenje citokina i drugih medijatora upale ili markera te je visoko osjetljiva i specifična metoda (228). U tipičnom „sendvič“ enzim-imunokemijskom testu ELISA, antitijelo na dnu jažice služi za prihvat antigena (odnosno proteina koji je predmet istraživanja) dok drugo antitijelo, koje je vezano na enzim, osigurava detekciju antigena promjenom boje (228).

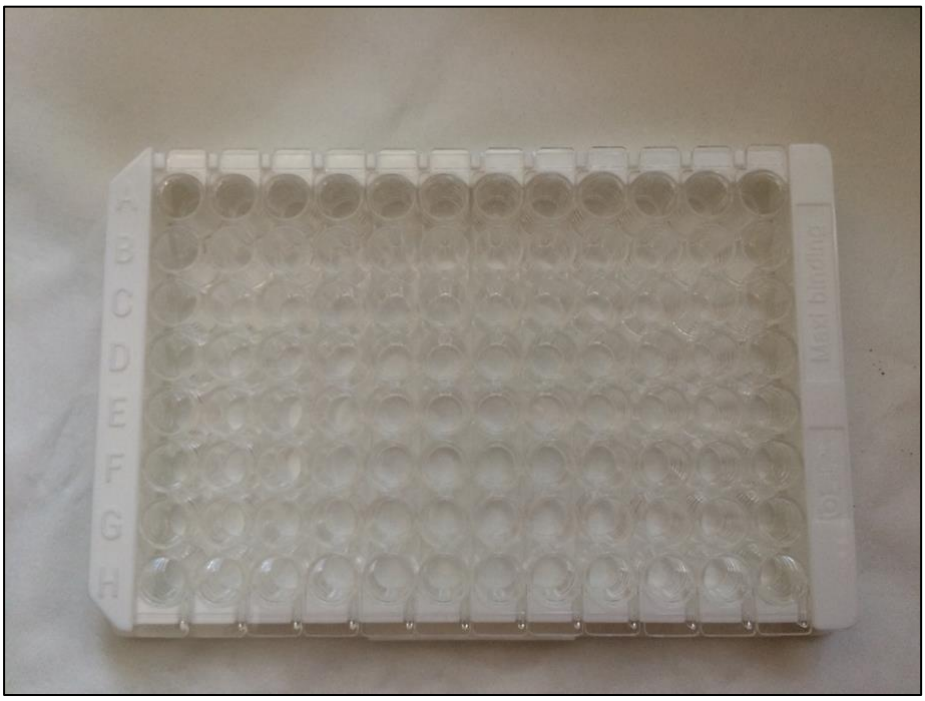
U istraživanju smo se koristili komercijalnim ELISA kitom za određivanje sCD14 u humanom serumu / plazmi / slini (Enzo Life Science kit, Farmingdale, NY, USA; Cat No. ALX-850-302) (96) (Slika 15).



Slika 15. ELISA kit (Enzo Life Science kit, Farmingdale, NY, USA; Cat No. ALX-850-302)

Sadržaj ELISA kita:

– Mikrotitarska pločica s 96 jažica s nasađenim protutijelima na humani sCD14 (mišja monoklonala protutijela) (Slika 16)
– sCD14 standard (liofilizirani humani sCD14)
– Detektirajuće protutijelo (monoklonalno protutijelo na humani CD14 konjugirano s peroksidazom)
– Referentni serum (liofiliziran)
– Fosfatni pufer (tableta)
– Diluent
– Tween 20
– Supstrat (TMB, 3,3',5,5' – Tetrametilbenzidin)
– Reagens za zaustavljanje reakcije (0.25 mol/L H_2SO_4).



Slika 16. Mikrotitarska pločica s 96 jažica prije početka analize (Enzo Life Science kit, Farmingdale, NY, USA; Cat No. ALX-850-302)

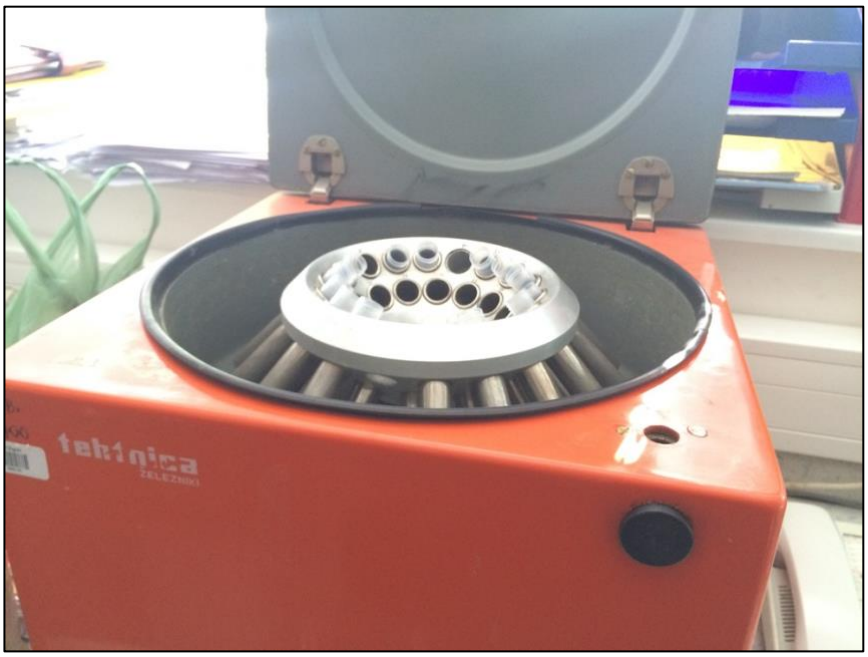
Uvjeti mjerenja:

- volumen reaktanata: 100 µL
- trajanje testa: 3 h
- valna duljina: 450 nm

Priprava 1:10 otopine sline (supernantant)

- volumen sline: 50 µL
- volumen diluenta: 450 µL

Uzorci sline su otopljeni i centrifugirani 10 minuta na 1800 grama (centrifuga: Tehtnica, Železniki, Slovenija) (Slike 17, 18). Supernantant smo koristili za pripremu otopine sline (1:10).



Slika 17. Centrifuga za sedimentaciju uzoraka sline (Tehtnica, Železniki, Slovenija)



Slika 18. Postavljanje epruveta u centrifugu (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Prije izvođenja testa svi reagensi iz ELISA kita su izvađeni iz hladnjaka te ostavljeni na sobnoj temperaturi (20 – 25 °C) 30 min prije početka izvođenja testa.

Priprema reagensa

Svi reagensi pripravljeni su prema uputi proizvođača:

- Fosfatni pufer (PBS, eng. *phosphate buffer saline*): otopiti 1 tabletu PBS-a u 200 mL destilirane H_2O
- Pufer za ispiranje (PBS-T, engl. *phosphate buffer saline with Tween 20*): otopiti 1 tabletu PBS-a u 200 mL destilirane H_2O s dodatkom 100 µL Tween 20
- Diluent: liofilizirani diluent prebacili smo u plastičnu bočicu te dodali 50 mL PBS s dodatkom 50 µL Tween 20. Ova otopina stabilna je 1 – 2 tjedna na + 4 °C.
- Referentni serum: liofilizirani referentni serum smo rekonstituirali s 10 µL deionizirane H_2O te dodali 1.990 mL diluenta. Tako priređeni referentni serum predstavlja razrjeđenje 1:200. Otopinu diluenta podijelili smo u manje alikvote te pohranili na -20 °C. Deklarirana koncentracija sCD14 u referentnom serumu je 3.2 ± 0.6 µL/mL.
- sCD14 standard:

  – *Temeljna standardna otopina sCD14:* (50 ng/mL) liofilizirani sCD14 standard smo rekonstituirali u 30 µL deionizirane H_2O. Nakon miješanja, cijeli sadržaj iz bočice smo prebacili u epruvetu 0 (ep 0) te dodali 970 µL diluenta. Iz epruvete 0 uzeli smo 50 mL i dodali 450 mL diluenta (ep 1). To je standardna otopina sCD14 (50 ng/mL). Temeljnu standardnu otopinu sCD14 smo podijelili u manje alikvote te pohranili na -20 °C.

  – *Radni standardi (3.12550.0 ng/mL):* od temeljne standardne otopine sCD14, pripremili smo radne otopine sCD14 prije izvođenja testa kao što je prikazano u Tablici 3.

Tablica 3. Priprema radnog standarda za određivanje koncentracije sCD14

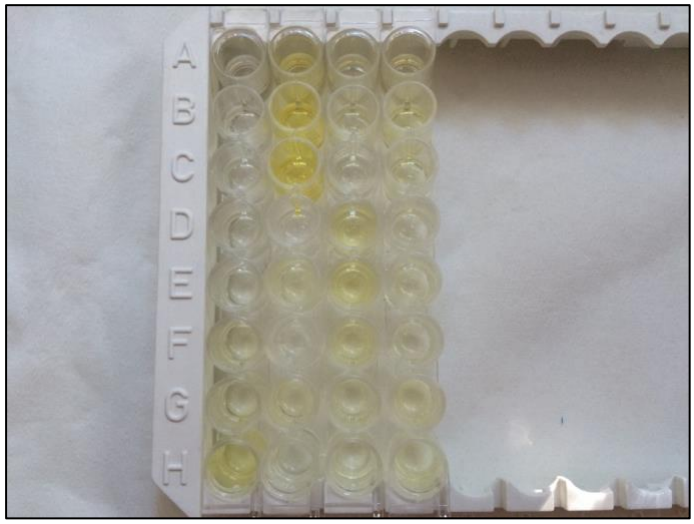
Epruveta redni broj	Volumen	Diluent (µL)	Koncentracija radnog standarda (ng/mL)
1	50 µL ep 0	450	50
2	250 µL ep 1	250	25
3	250 µL ep 2	250	12.5
4	250 µL ep 3	250	6.25
5	250 µL ep 4	250	3.125

ELISA protokol

Svi uzorci sline, standardi i kontrolni serum analizirani su u duplikatu.

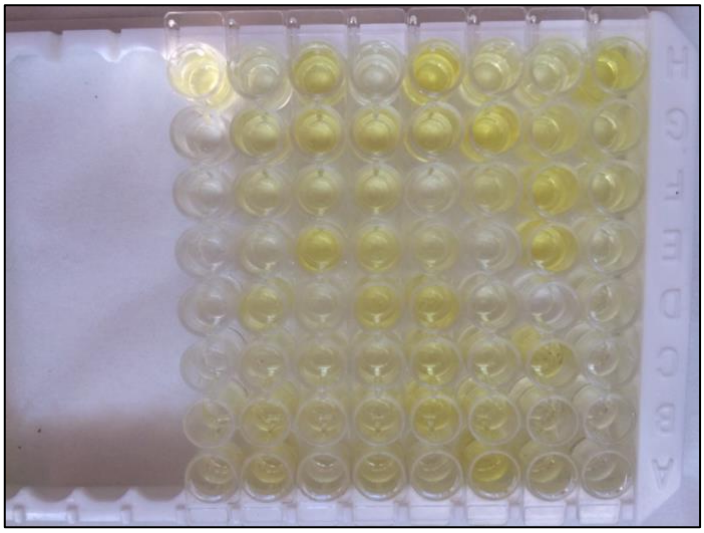
Radni protokol:

1. U određena mjesta na mikrotitarskoj pločici s nasađenim protutijelom doda se 100 µL slijepe probe, radnoga standarda, razrijeđenoga uzorka sline (1:10) te kontrolnoga uzorka (Slika 19).



Slika 19. Prikaz postavke standarda (1B-2C), slijepe probe (1A, 2D) te uzoraka sline (2E-4H) (Enzo Life Science kit, Farmingdale, NY, USA; Cat No. ALX-850-302)

2. Inkubacija 1 h (sobna temperatura) uz blago miješanje
3. Ispiranje pločice s PBS-T puferom (4 puta)
4. Dodati 100 µL detektirajućega protutijela u sve jažice
5. Inkubacija 1 h (sobna temperatura) uz blago miješanje
6. Ispiranje pločice s PBS-T puferom (4 puta)
7. Dodati 100 µL TMB u sve jažice
8. Inkubacija 13 ± 1 min (sobna temperatura) bez miješanja
9. Dodati 100 µL reagensa za zaustavljanje reakcije (stop reagens) u sve jažice (Slika 20).

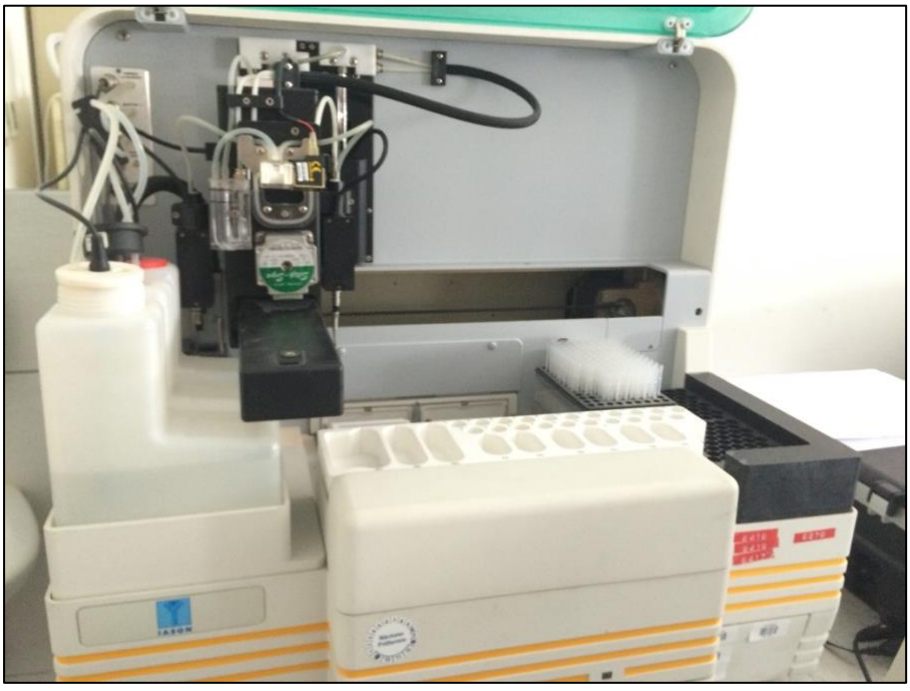


Slika 20. Mikrotitarska pločica nakon dodatka svih reaktanata i reagensa (Enzo Life Science kit, Farmingdale, NY, USA; Cat No. ALX-850-302)

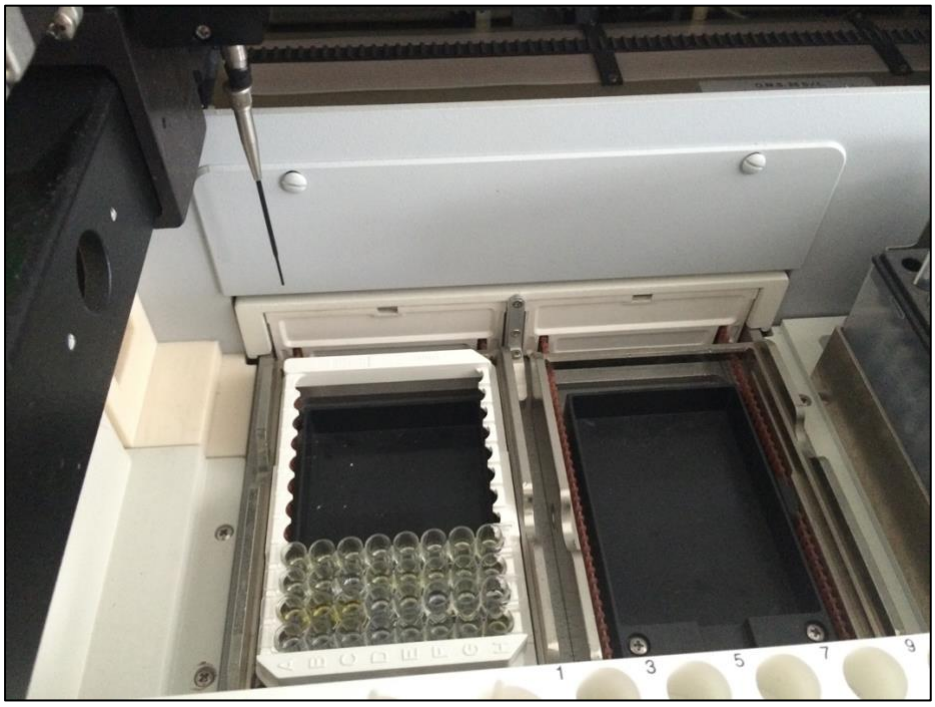
10. Očitati vrijednosti apsorbancije svih analita (standard, uzoraka sline i kontrolnoga uzorka) na čitaču mikrotitarskih pločica (IASON, Graz, Austrija) na valnoj duljini od 450 nm. Promjena boje reakcije (žuta) u plavu proporcionalna je koncentraciji sCD14 u slini (Slike 21-23).



Slika 21. Čitač mikrotitarskih pločica (Personal Lab, IASON, Graz, Austrija)



Slika 22. Čitač mikrotitarskih pločica u pripremi (Personal Lab, IASON, Graz, Austrija)



Slika 23. Postavljanje mikrotitarske pločice u čitač (IASON, Graz, Austrija)

3.4. Statistička obrada podataka

Razina statističke značajnosti određena je na 5 % ($p < 0,05$), a u svim testiranjima korišteni su dvosmjerni (engl. *two-tailed*) statistički testovi te su svi intervali pouzdanosti dani na 95 %-postotnoj razini. Normalnost raspodjela kontinuiranih varijabli testirana je putem Shapiro-Wilkovoga testa. Budući da je u većini slučajeva utvrđeno statistički značajno odstupanje raspodjela rezultata od normalne raspodjele, u svim slučajevima su kao mjere centralne tendencije i raspršenja korišteni medijan i interkvartilni raspon, a skupine sudionika su međusobno uspoređene putem neparametrijskih statističkih testova.

Razlike između dviju skupina sudionika s obzirom na kontinuirane varijable testirane su putem Mann-Whitneyeva U-testa, dok su razlike među trima skupinama sudionika testirane putem Kruskal-Wallisova testa. U slučaju statistički značajnih rezultata Kruskal-Wallisova testa, skupine su dodatno uspoređene serijom Mann-Whitneyevih U-testova uz Holm-Bonferronijevu korekciju razine statističke značajnosti zbog višestrukih testiranja. Razine koncentracije sCD14 u nestimuliranoj i stmuliranoj slini testirali smo Wilcoxonovim testom

ekvivalentnih parova. Povezanosti među dvjema kontinuiranim varijablama određene su putem Kendallova Tau-b koeficijenta korelacije. Razlike među skupinama s obzirom na kategorijalne varijable testirane su putem χ^2 testa, odnosno Fisherova egzaktnoga testa u slučaju 2 x 2 kontingencijskih tablica s očekivanim frekvencijama manjima od pet.

Za univarijatno i multivarijatno predviđanje pojave karijesa i gubitka tvrdih zubnih tkiva korištena je binarna logistička regresija. Budući da je u istraživanje uključen relativno velik broj varijabli u odnosu na broj sudionika, u multivarijatno predviđanje uključeni su spol i dob kao kontrolne varijable, a od ostalih varijabli one koje su s kriterijem bile povezane na razini statističke značajnosti od $p < 0,250$ (229). Za određivanje koncentracije receptora sCD14 u nestimuliranoj slini u kojoj su osjetljivost i specifičnost pri dijagnozi karijesa u optimalnom odnosu korištena je krivulja karakteristika primatelja-operatora (ROC, engl. *receiver operating characteristic*) krivulja. Nakon što je određena indikativna koncentracija receptora sCD14 u slini za pojavu karijesa, određena je njezina dijagnostička valjanost putem analize osjetljivosti, specifičnosti, pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti te pozitivnoga i negativnoga omjera vjerojatnosti. Analize su provedene putem programa IBM SPSS statističkoga paketa, dok je za analizu dijagnostičke valjanosti korišten on-line kalkulator dostupan na stranici: http://statpages.info/ctab2x2.html.

4. REZULTATI

4.1. Demografske karakteristike ispitanika

Tijekom istraživanja pregledano je ukupno 90 ispitanika: 34 muškarca i 56 žena, a istraživanje je završilo ukupno 88 ispitanika: 33 muškaraca i 55 žena. U kontrolnoj skupini je 2 ispitanika manje nego u eksperimentalnima jer su naknadno odustali od istraživanja. Njihovi podatci dobiveni u istraživanju isključeni su iz kasnije statističke obrade. Tako je istraživanje uključivalo ukupno 28 ispitanika kontrolne skupine i po 30 ispitanika eksperimentalnih skupina E1 i E2 (Tablica 4). U svim trima skupinama žene su bile nešto više zastupljene od muškaraca.

Medijan dobi ispitanika kontrolne skupine bio je 35 (30 – 39), u E1 skupini 32 (25 – 38) u E2 skupini 31 (24 – 34). Dob ispitanika je u svim skupinama statistički značajno odstupala od normalne raspodjele, stoga su kao mjere centralne tendencije korišteni medijan i interkvartilni raspon (IQR, engl. *interquartile range*) (Tablica 4). Među trima skupinama ispitanika postojala je statistički značajna razlika u dobi (χ^2 = 9,52; p = 0,009). Daljnjim testiranjem utvrđeno je da su ispitanici kontrolne skupine bili statistički značajno stariji od ispitanika E2 skupine (Mann-Whitney p = 0,001; Holm-Bonferroni p = 0,003). S obzirom na stručnu spremu, u svim skupinama prevladava visoka stručna sprema (Tablica 4) te se udio ispitanika s odgovarajućom stručnom spremom među skupinama nije razlikovao.

Udio pušača / nepušača nije se značajno razlikovao između kontrolne te E1 i E2 skupine. Zbog maloga broja ispitanika koji su prestali pušiti prije makar 6 mjeseci, za potrebe daljnjih analiza oni su spojeni s kategorijom ispitanika koji nikada nisu pušili.

Utvrđena je statistički značajna razlika u konzumaciji sokova s niskim pH-vrijednostima ili gaziranih pića (χ^2 = 6,70; p = 0,035) među skupinama. Pri tome je učestalost konzumacije bila najviša u E2 skupini, no nakon njih je slijedila kontrolna skupina, pa skupina E1. U slučaju konzumacije zaslađene hrane, među trima skupinama ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika.

Većina ispitanika negira trošenje lijekova prije od uvjetovanoga roka od dva tjedna prije uzorkovanja (Tablica 4) te se udio ispitanika koji povremeno uzimaju lijekove (paracetamol i ibuprofen) nije razlikovao među skupinama.

Udio ispitanika koje navode prethodna povremena obolijevanja (inhalacijske alergije, sinuitis, prehlade…) nije se značajno razlikovao među skupinama (Tablica 4).

Tablica 4. Demografske karakteristike ispitanika i navike

	Kontrolna skupina (n=28)	E1 skupina (n=30)	E2 skupina (n=30)	
	n (%)	n (%)	n (%)	p
Spol				
muški	10 (35,7)	11 (36,7)	12 (40,0)	0,938
ženski	18 (64,3)	19 (63,3)	18 (60,0)	
Dob, medijan (IQR)	35 (30-39)	32 (25-38)	31 (24-34)	0,009
Obrazovanje				
srednja škola ili niže	12 (42,9)	13 (43,3)	13 (43,3)	0,999
fakultet ili više	16 (57,1)	17 (56,7)	17 (56,7)	
Pušenje				
ne	18 (64,3)	15 (50,0)	21 (70,0)	0,262
da	10 (35,7)	15 (50,0)	9 (30,0)	
Konzumacija sokova/gaziranih pića				
jednom mjesečno ili rjeđe	13 (46,4)	19 (63,3)	9 (30,0)	
2-3 puta tjedno ili češće	15 (53,6)	11 (36,7)	21 (70,0)	0,035
Konzumacija slatkog				
2-3 puta tjedno ili rjeđe	19 (67,9)	16 (53,3)	24 (80,0)	0,089
barem jednom dnevno	9 (32,1)	14 (46,7)	6 (20,0)	
Povremeno uzimanje lijekova				
ne	12 (42,9)	20 (66,7)	18 (62,1)	0,142
da	16 (57,1)	10 (33,3)	11 (37,9)	
Povremena oboljenja				
ne	19 (67,9)	26 (86,7)	23 (76,7)	0,231
da	9 (32,1)	4 (13,3)	7 (23,3)	

Kratice: IQR = interkvartilni raspon, p = razina statističke značajnosti, rezultat Kruskal-Wallisova testa u slučaju dobi, odnosno χ^2 testa u slučaju ostalih varijabli

Oralne tegobe ispitanika

Učestalost suhoće usta se u trima skupinama ispitanika statistički značajno razlikovala ($\chi^2 = 12,04$; $p = 0,002$). Pri tome je udio ispitanika koji je izvijestio o suhoći usta nekoliko puta godišnje ili češće bio najviši u E2 skupini (Tablica 5).

Učestalost povremenoga krvarenja zubnoga mesa kao i osjećaj pečenja u ustima nije se značajno razlikovao među skupinama.

Tablica 5. Učestalost oralnih tegoba u skupinama ispitanika

	Kontrolna skupina (n=28)	E1 skupina (n=30)	E2 skupina (n=30)	
	n (%)	n (%)	n (%)	p
Pečenje u ustima				
nikada	27 (96,4)	24 (80,0)	27 (90,0)	0,138
nekoliko puta godišnje ili češće	1 (3,6)	6 (20,0)	3 (10,0)	
Suhoća usta				
nikada	18 (64,3)	24 (80,0)	11 (36,7)	
nekoliko puta godišnje ili češće	10 (35,7)	6 (20,0)	19 (63,3)	0,002
Krvarenje zubnog mesa				
nikada	13 (46,4)	10 (33,3)	10 (33,3)	0,497
nekoliko puta godišnje ili češće	15 (53,6)	20 (66,7)	20 (66,7)	
Povraćanje				
nikada	23 (82,1)	25 (83,3)	25 (83,3)	0,990
nekoliko puta godišnje ili češće	5 (17,9)	5 (16,7)	5 (16,7)	

Kratice: p = razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 testa

4.2. Parametri sline: pH-vrijednosti sline, protok i puferski kapacitet

Predanalitičko testiranje pH-vrijednost sline

Tablice 6 i 7 prikazuju pH-vrijednost sline u ispitanika bez karijesa odnosno s karijesom, izmjeren pomoću indikatorske trake (Panpeha, Schleicher & Schuell, Sigma-Aldrich GmbH, Njemačka, 2005) i digitalnim pH-metrom. Razlike u pH-vrijednostima sline izmjerene pomoću tih dviju metoda nisu bile statistički značajne. Također, razlike u pH-vrijednostima sline izmjerene indikatorskom trakom nisu se značajno razlikovale u uzorcima sline nakon odmrzavanja u usporedbi s pH-vrijednostima izmjerenim neposredno nakon uzorkovanja (Tablica 6).

Tablica 6. pH-vrijednosti nestimulirane sline u ispitanika (N = 30) bez karijesa mjeren pomoću indikatorske trake i digitalnim pH-metrom

pH 30 ispitanika bez karijesa	Medijan (IQR)	p
Indikatorska traka		
prije smrzavanja	7,00 (6,50-7,00)	
nakon odmrzavanja	7,00 (6,50-7,00)	
digitalni pH-metar		
nakon odmrzavanja	6,70 (6,53-7,01)	0,920

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Friedmanova testa

Tablica 7. pH-vrijednosti nestimulirane sline u ispitanika (N=30) s karijesom mjeren pomoću indikatorske trake i digitalnim pH-metrom

pH 30 ispitanika s karijesom	Medijan (IQR)	p
Indikatorska traka		
prije smrzavanja	7,00 (7,00-7,00)	
poslije odmrzavanja	7,00 (7,00-7,00)	
digitalni pH-metar		
nakon odmrzavanja	6,97 (6,64-7,02)	0,614

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Friedmanova testa

4.2.1. Nestimulirana slina

pH-vrijednost nestimulirane sline

Medijan pH-vrijednost nestimulirane sline u kontrolnoj skupini iznosio je 7.3, a u E1 i E2 skupini 7.2. Nije ustanovljena statistički značajna razlika u pH-vrijednostima među skupinama (Tablica 8).

Tablica 8. Parametri nestimulirane sline (pH i protok)

Nestimulirana slina	Kontrolna skupina (n=28)	E1 skupina (n=30)	E2 skupina (n=30)	p
pH nestimulirane sline	7,3 (7,2-7,4)	7,2 (7,0-7,2)	7,2 (7,0-7,4)	0,125
pH nestimulirane sline, n (%)				
neutralan (6,50-7,49)	11 (84,6)	11 (91,7)	12 (100,0)	0,371
alkalan (7,50 i više)	2 (15,4)	1 (8,3)	0 (0,0)	
Protok nestimulirane sline mL/min	1,0 (0,5-1,0)	0,5 (0,5-1,0)	0,5 (0,4-1,0)	0,016

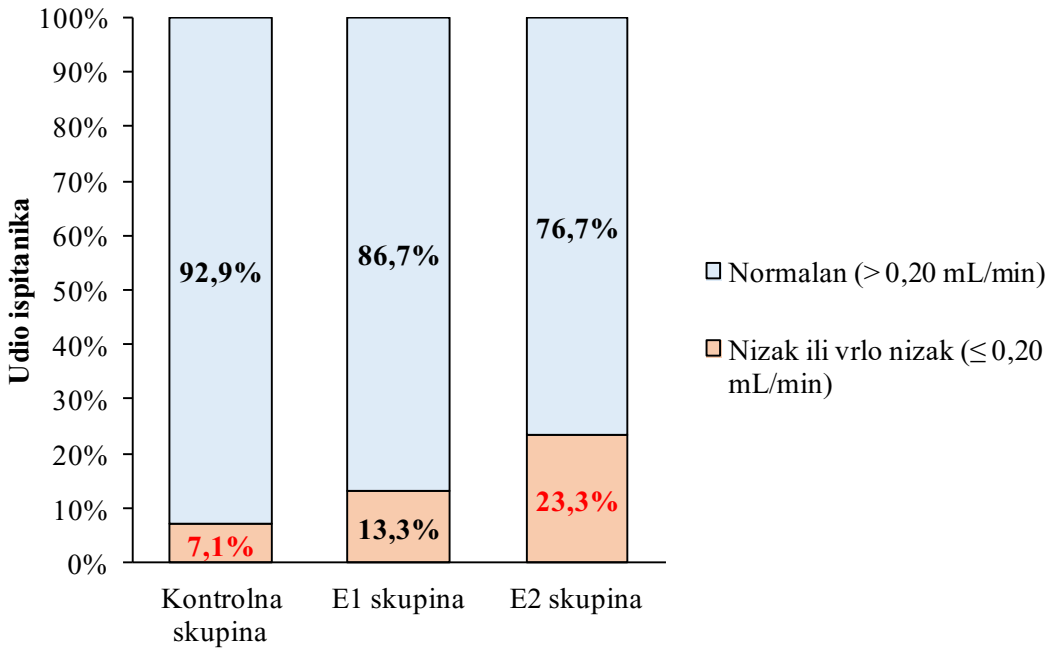
Vrijednosti su prikazane kao medijan (interkvartilni raspon), ako nije drugačije naznačeno

Kratice: p = razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 testa u slučaju u kategorija pH-vrijednosti sline, u slučaju ostalih varijabli rezultat Kruskal-Wallisova testa

Protok nestimulirane sline

Medijan protoka nestimulirane sline u kontrolnoj skupini iznosio je 1 mL/min, u E1 i E2 skupini 0,5 mL/min te je između kontrolne i eksperimentalnih skupina utvrđena statistički značajna razlika ($\chi 2 = 8,33$; ss = 2; p = 0,016) (Tablica 8).

Vrlo nizak protok nestimulirane sline (0,10 mL/min ili manji) nije izmjeren niti kod jednoga ispitanika kontrolne skupine te ni kod 3/30 (10,0 %) sudionika E1 skupine i niti kod 1/30 (3,3 %) ispitanika E2 skupine. Zbog maloga broja ispitanika u ovoj kategoriji, oni su za potrebe daljnjih analiza spojeni s kategorijom onih ispitanika s niskim protokom sline. Nizak ili vrlo nizak protok nestimulirane sline (0,20 mL/min ili manji) bio je prisutan kod 2/28 (7,1 %) ispitanika kontrolne skupine, kod 4/30 (13,3 %) ispitanika E1 skupine te kod 7/30 (23,3 %) ispitanika E2 skupine (Slika 24). Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne i eksperimentalnih skupina (p = 0,213).



Slika 24. Raspodjela kategorija protoka nestimulirane sline

4.2.2. Stimulirana slina

pH-vrijednost stimulirane sline

Medijan pH-vrijednosti stimulirane sline u kontrolnoj eksperimentalnoj skupini (E1 i E2) iznosio je 7.7 (Tablica 9).

Tablica 9. Parametri stimulirane sline (pH, protok i puferski kapacitet)

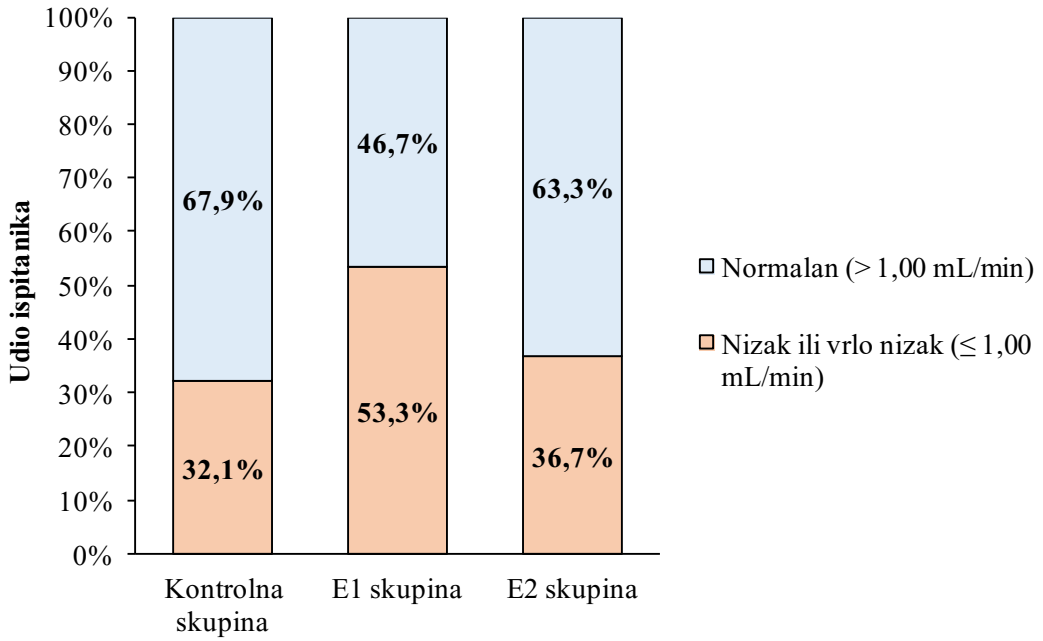
Stimulirana slina	Kontrolna skupina (n=28)	E1 skupina (n=30)	E2 skupina (n=30)	p
pH stimulirane sline	7,7 (7,6-7,8)	7,7 (7,5-7,8)	7,7 (7,6-7,8)	0,459
pH stimulirane sline, n (%)				
neutralan (6,50-7,49)	4 (14,3)	4 (13,3)	5 (16,7)	0,932
alkalan (7,50 i više)	24 (85,7)	26 (86,7)	25 (83,3)	
Protok stimulirane sline mL/min	1,5 (1,0-2,0)	1,0 (0,8-1,6)	1,2 (1,0-1,9)	0,041
Puferski kapacitet stimulirane sline	6,2 (5,6-6,5)	5,6 (4,7-6,1)	5,5 (5,0-6,0)	<0,001

Vrijednosti su prikazane kao medijan (interkvartilni raspon), ako nije drugačije naznačeno
Kratice: p = razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 testa u slučaju kategorija pH-vrijednosti sline, u slučaju ostalih varijabli rezultat Kruskal-Wallisova testa

Protok stimulirane sline

Medijan protoka stimulirane sline kontrolne skupine iznosio je 1,5 mL/min, E1 skupine 1,0 mL/min a E2 skupine 1,2 mL/min. Među trima skupinama ispitanika utvrđena je statistički značajna razlika (p = 0,041) (Tablica 9).

U slučaju protoka stimulirane sline, njegova vrlo niska vrijednost (0,70 mL/min ili manje) izmjerena je kod 1/28 (3,6 %) ispitanika kontrolne skupine, 6/30 (20,0 %) ispitanika E1 skupine te kod 2/30 (6,7 %) ispitanika E2 skupine. Nakon što su, zbog maloga broja, ti ispitanici spojeni s kategorijom onih s niskim protokom stimulirane sline (1,00 mL/min ili manje), udio ispitanika iz te kategorije iznosio je 9/28 (32,1 %) u kontrolnoj skupini, 16/30 (53,3 %) u E1 skupini te 11/30 (36,7 %) u E2 skupini (Slika 25). Nije utvrđena statistički značajna razlika u protoku stimulirane sline između kontrolne i eksperimentalnih skupina s karijesom (p=0,220).



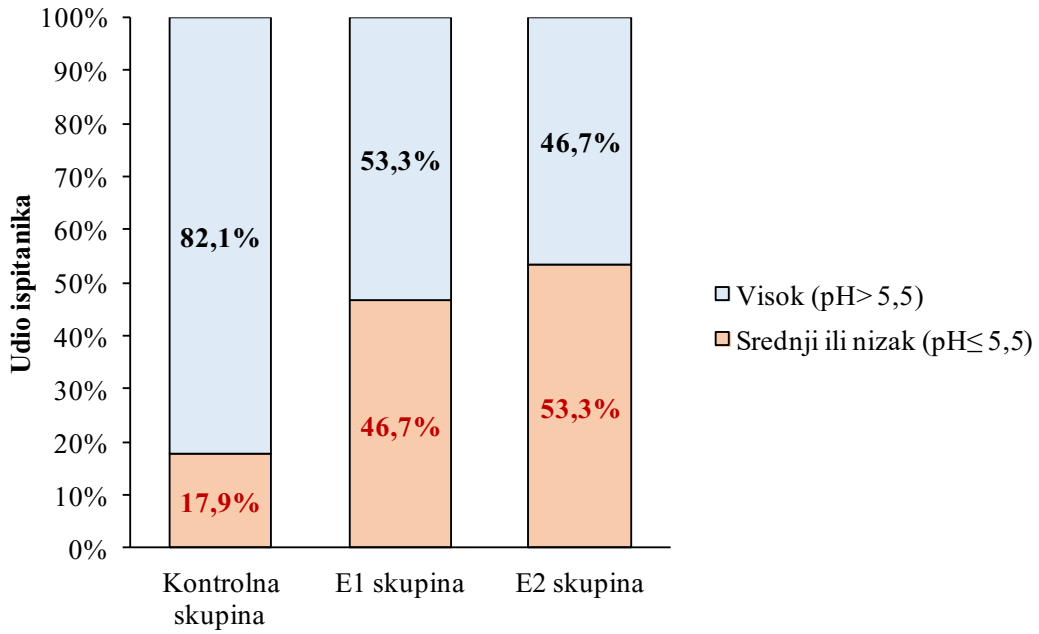
Slika 25. Raspodjela kategorija protoka stimulirane sline

4.2.3. Puferski kapacitet stimulirane sline

Medijan vrijednosti puferskoga kapaciteta stimulirane sline u kontrolnoj skupini iznosio je 6,2 (raspon: 4,8 – 7,1), u E1 skupini 5,6 (raspon: 3,2 – 6,6) te u E2 skupini 5,5 (raspon: 3,3 - 6,6. Puferski kapacitet bio je statistički značajno veći u kontrolnoj skupini u odnosu na E1 skupinu ($p = 0,002$) te u odnosu na E2 skupinu ($p < 0,001$). Među eksperimentalnim skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika ($p = 0,626$). Nizak puferski kapacitet (manji od 4,5)

nije izmjeren kod niti jednoga ispitanika kontrolne skupine. Niski puferski kapacitet izmjeren je kod 5/30 (16,7 %) sudionika E1 skupine te kod 6/30 (20,0 %) ispitanika E2 skupine. Zbog maloga broja ispitanika s niskim puferskim kapacitetom, za analizu su vrijednosti niskoga i srednjega puferskog kapaciteta stavljeni u istu kategoriju.

Srednji ili nizak puferski kapacitet bio je prisutan kod 5/28 (17,9 %) ispitanika kontrolne skupine, u E1 skupini bio je prisutan kod 14/30 (46,7 %), a u E2 skupini kod 16/30 (53,3 %) ispitanika (Slika 26). Utvrđena je statistički značajna razlika (χ^2 = 8,51; ss = 2; p = 0,014) između srednjega / niskoga puferskog kapaciteta između kontrolne i E1/E2 skupina. Između E1 i E2 nije bilo značajne razlike u srednjem/niskom puferskom kapacitetu stimulirane sline.



Slika 26. Raspodjela kategorija puferskoga kapaciteta stimulirane sline

4.3. Dentalni status ispitanika

Analizom podataka dobivenih kliničkim pregledom te njihovom statističkom obradom izračunati su rezultati o broju karijesa i erozija, jačine demineralizacije tih patoloških promjena te je utvrđena njihova lokalizacija u zubalu.

4.3.1. DMFT indeks

Broj karijesa se u E1 skupini kretao od 1 do 5, dok se u E2 skupini kretao od 6 do 20. Pri tome je broj karijesa u E2 skupini bio statistički značajno veći nego u E1 skupini (Mann-Whitney U = 0,00; $p < 0,001$). Broj zuba koji nedostaju se u kontrolnoj i E2 skupini kretao od 0 do 6, a u E1 skupini od 0 do 10 te je među skupinama utvrđena statistički značajna razlika ($\chi2 = 6,95$; ss = 2; $p = 0,031$). Daljnjim testiranjima utvrđeno je da je broj zuba koji nedostaju bio statistički značajno veći u kontrolnoj nego u E2 skupini (Mann-Whitney $p = 0,016$; Holm-Bonferroni $p = 0,048$), dok preostalim usporedbama nisu utvrđene statistički značajne razlike. Broj zuba s ispunom se u kontrolnoj skupini kretao od 0 do 19, u E1 skupini od 0 do 20, a u E2 skupini od 0 do 15 te je među skupinama utvrđena statistički značajna razlika s obzirom na broj zuba s ispunom ($\chi2 = 14,98$; ss = 2; $p = 0,001$). Pri tome su ispitanici E2 skupine imali statistički značajno manji broj zuba s ispunom u odnosu na ispitanike kontrolne (Mann-Whitney $p < 0,001$) te E1 skupine (Mann-Whitney $p = 0,006$; Holm-Bonferroni $p = 0,012$). Između ispitanika kontrolne i E1 skupine nije utvrđena statistički značajna razlika u broja zuba s ispunom (Mann-Whitney $p = 0,227$).

Vrijednosti DMFT indeksa u kontrolnoj su se skupini kretale od 0 do 20, u E1 skupini od 1 do 25, a u E2 skupini od 8 do 26. Među trima skupinama ispitanika utvrđena je statistički značajna razlika s obzirom na DMFT indeks ($\chi2 = 7,75$; ss = 2; $p = 0,021$), no pojedinačnim usporedbama skupina nije utvrđena niti jedna statistički značajna razlika. Rezultate prikazuje Tablica 10.

4.3.2. DMFS indeks

Broj zubnih ploha s karijesom se u E1 skupini kretao od 1 do 10, dok se u E2 skupini kretao od 7 do 58. Pri tome je broj ploha s karijesom bio statistički značajno veći u E2 skupini (Mann-Whitney $p < 0,001$). Broj zubnih ploha koje nedostaju u kontrolnoj se skupini kretao od 0 do 30, u E1 skupini od 0 do 50 te u E2 skupini od 0 do 30. Među skupinama je utvrđena statistički značajna razlika s obzirom na broj zubnih ploha koje nedostaju ($\chi2 = 6,64$; ss = 2; $p = 0,036$), no pojedinačnim usporedbama grupa nije utvrđena ni jedna statistički značajna razlika. U kontrolnoj skupini se broj ploha s ispunom kretao od 0 do 37, u E1 skupini od 0 do 41, a u E2 skupini od 0 do 39 te je razlika među skupinama bila statistički značajna ($\chi2 = 14,63$; ss = 2; $p = 0,001$). Pri tome je broj ploha s ispunom u E2 skupini bio statistički značajno manji nego u kontrolnoj (Mann-Whitney $p = 0,001$; Holm-Bonferroni $p = 0,003$) ili E1 skupini (Mann-Whitney $p = 0,003$; Holm-Bonferroni $p = 0,006$), dok između kontrolne i E1 skupine nije utvrđena statistički značajna razlika (Mann-Whitney; $p = 0,286$). Vrijednosti DMFS indeksa u kontrolnoj su se skupini kretale od 0 do 49, u E1 skupini od 1 do 64, a u E2 skupini od 8 do 92 te razlika među skupinama nije bila statistički značajna (Tablica 10).

Tablica 10. DMFT i DMFS indeks: po skupinama

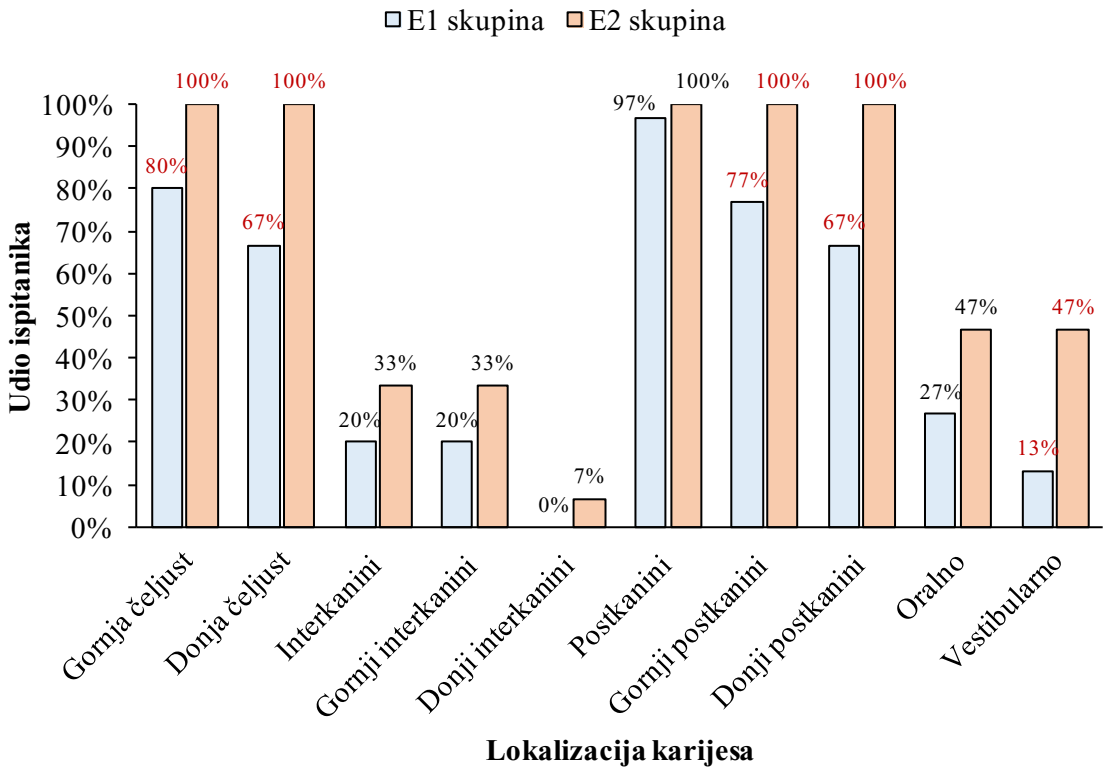
	Kontrolna skupina (n=28)	E1 skupina (n=30)	E2 skupina (n=30)	p
Status zubi (DMFT)				
D-komponenta	- -	3 (2-5)	10 (8-13)	<0,001
M-komponenta	3 (0-4)	2 (0-4)	0 (0-2)	0,031
F-komponenta	10 (6-13)	8 (4-12)	5 (1-8)	0,001
DMFT indeks	13 (9-16)	15 (10-17)	17 (13-20)	0,021
Status zubnih ploha (DMFS)				
D-komponenta	- -	4 (2-7)	14 (11-26)	<0,001
M-komponenta	13 (1-20)	10 (0-20)	0 (0-11)	0,036
F-komponenta	19 (9-25)	13 (7-22)	6 (1-11)	0,001
DMFS indeks	32 (19-44)	30 (23-43)	28 (16-45)	0,966

Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

Kratice: p = razina statističke značajnosti; rezultat Mann-Whitneyeva U-testa kod karijesa, odnosno Kruskal-Wallisova testa u slučaju ostalih varijabli određenoga indeksa

4.3.3. Lokalizacija karijesa u zubalu kod ispitanika eksperimentalnih skupina

Lokalizaciju demineraliziranih površina tvrdih zubnih tkiva uzrokovanih karijesom prikazuje Slika 27.



Slika 27. Učestalost karijesa na određenim lokacijama u zubalu: ispitanici E1 i E2 skupine

U E2 skupini je statistički značajno veći udio ispitanika imao karijes u gornjoj (Fisherov egzaktni p = 0,024; φ = 0,33), kao i donjoj čeljusti ($\chi 2$ = 12,00; p = 0,001; φ = 0,45) u odnosu na E1 skupinu. Među dvjema skupinama ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika s obzirom na učestalost karijesa u interkaninom području. Također, kod većine ispitanika koji su

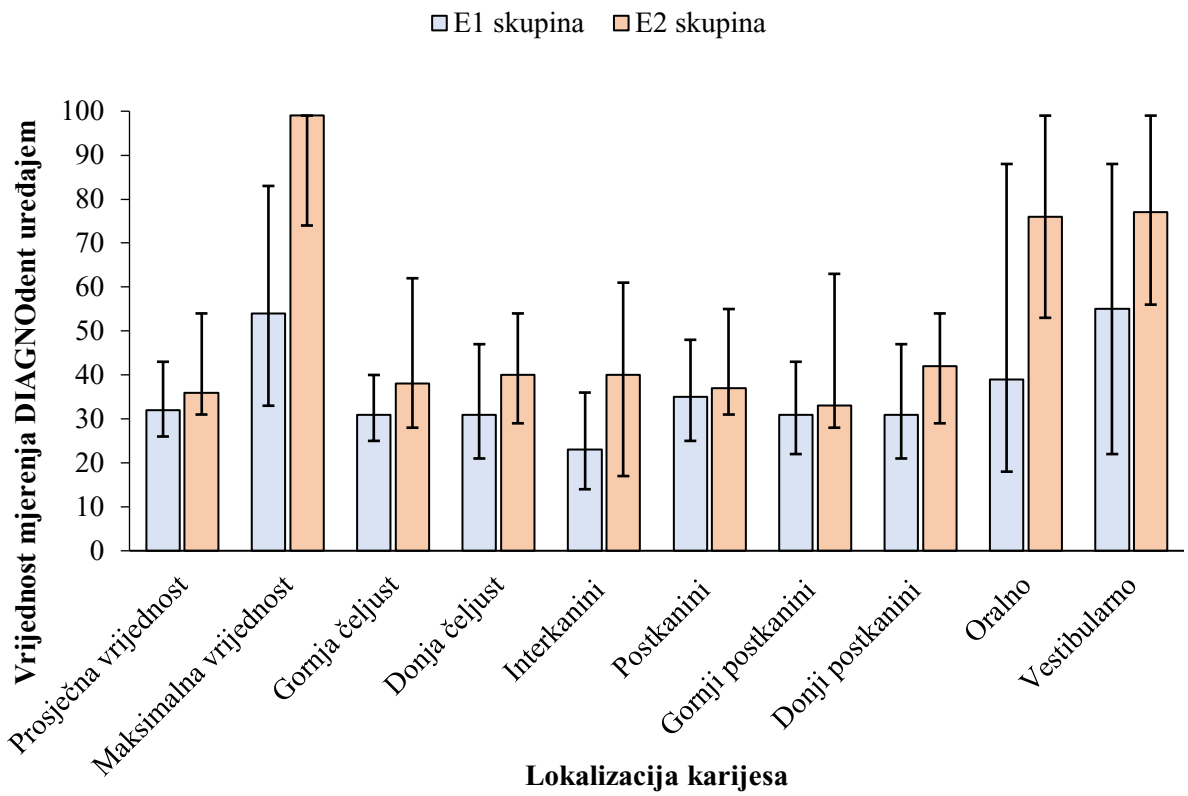
imali karijes u ovom području, riječ je bila o gornjem interkaninom području, stoga u daljnjim analizama nisu razlikovani gornje i donje interkanino područje. U E2 skupini utvrđena je statistički značajno veća učestalost karijesa u gornjem (Fisherov egzaktni $p = 0,011$; $\varphi = 0,36$) te donjem postkaninom području ($\chi2 = 12,00$; $p = 0,001$; $\varphi = 0,45$). Također je utvrđeno da je u E2 skupini učestalost vestibularnih karijesa bila statistički značajno viša nego u E1 skupini ($\chi2 = 7,94$; $p = 0,005$; $\varphi = 0,36$).

4.3.4. Stupanj demineralizacije karijesnih promjena, mjerenih uređajem KaVo DIAGNOdent Pen

Kada je riječ o vrijednostima mjerenja demineralizacijskih promjena uređajem DDPen, za svakoga ispitanika je određena prosječna izmjerena vrijednost te maksimalna izmjerena vrijednost kao i vrijednost za pojedinu lokalizaciju karijesa (Slika 28). Maksimalne izmjerene vrijednosti bile su statistički značajno više u E2 skupini u odnosu na E1 skupinu (Mann-Whitney $p < 0,001$). Pri tome je medijan maksimalne izmjerene vrijednosti u E1 skupini iznosio 54 (33 – 83), dok je u E2 skupini iznosio 99 (74 – 99).

U analizama na razini lokalizacija utvrđeno je da su vrijednosti izmjerene uređajem DDPen u donjoj čeljusti bile statistički značajno više u E2 skupini (Mann-Whitney $p = 0,049$). Medijan tako određene jačine karijesa iznosio je 31 (21 - 47) u E1 skupini, dok je u E2 skupini iznosio 40 (29 – 54).

Među dvjema skupinama ispitanika također je utvrđena statistički značajna razlika s obzirom na stupanj demineralizacije u donjem postkaninom sektoru (Mann-Whitney; $p = 0,037$). Pri tome su vrijednosti izmjerene uređajem DDPen bile više u E2 skupini u kojoj je medijan iznosio 42 (29 – 54), dok je u E1 skupini iznosio 31 (21– 47).

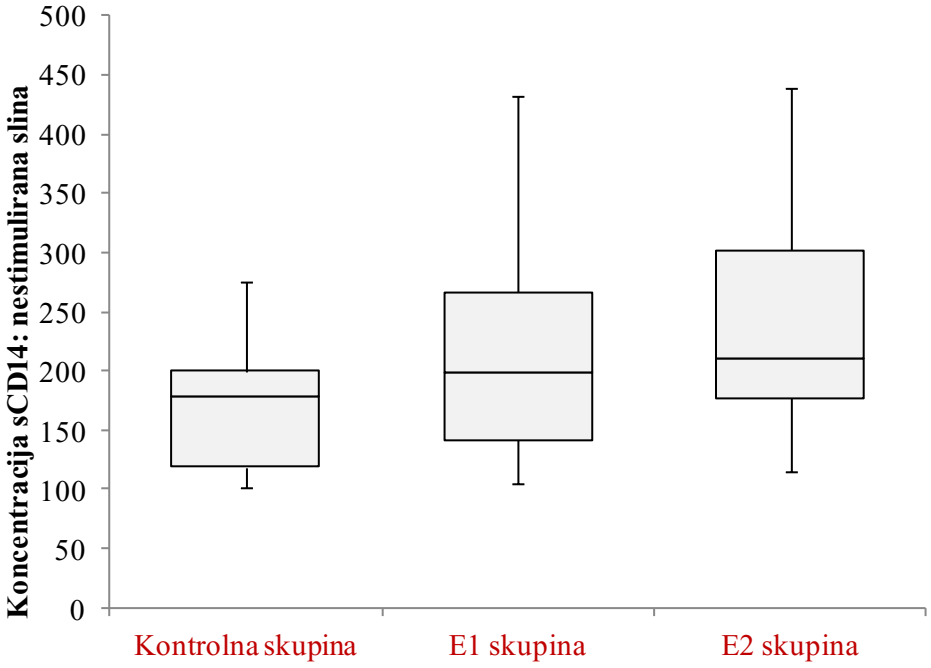


Slika 28. Medijan vrijednosti mjerenja karijesnih promjena uređajem DDPen s obzirom na ukupne vrijednosti izmjerene kod svakoga ispitanika te s obzirom na lokalizaciju karijesa. Stupci pogreške predstavljaju interkvartilni raspon.

4.4. Koncentracija sCD14 u slini

4.4.1. Nestimulirana slina

Medijan koncentracije (ng/mL) s CD14 u nestimuliranoj slini kontrolne skupine iznosio je 178,4, a E1 skupine 198,09 te E2 skupine 210,9 (Tablica 11, Slika 29). Ustanovljena je statistički značajno veća koncentracija sCD14 u objema eksperimentalnim skupinama (E1 i E2) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 11).



Slika 29. Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini. Box-Whisker plot prikazuje medijane skupina, interkvartilne raspone te minimalne i maksimalne izmjerene vrijednosti. Crvenom bojom je označena značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Između kontrolne i E1 skupine pri korigiranoj razini statističke značajnosti utvrđena je statistički značajna razlika ($p = 0,020$), u smjeru da je koncentracija sCD14 bila viša u E1 skupini. U E2 skupini je koncentracija sCD14 također bila statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,003$). Između E1 i E2 skupine nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji sCD14 ($p = 0,469$) (Tablica 9).

Tablica 11. Koncentracija sCD14 nestimulirane sline

	Medijan (IQR)	p
sCD14 u nestimuliranoj slini (ng/mL)		
Kontrolna skupina	178,4 (118,9-200,3)	0,007
E1 skupina	198,0 (141,6-266,5)	
E2 skupina	210,9 (177,0-301,7)	

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Kruskal-Wallisova testa

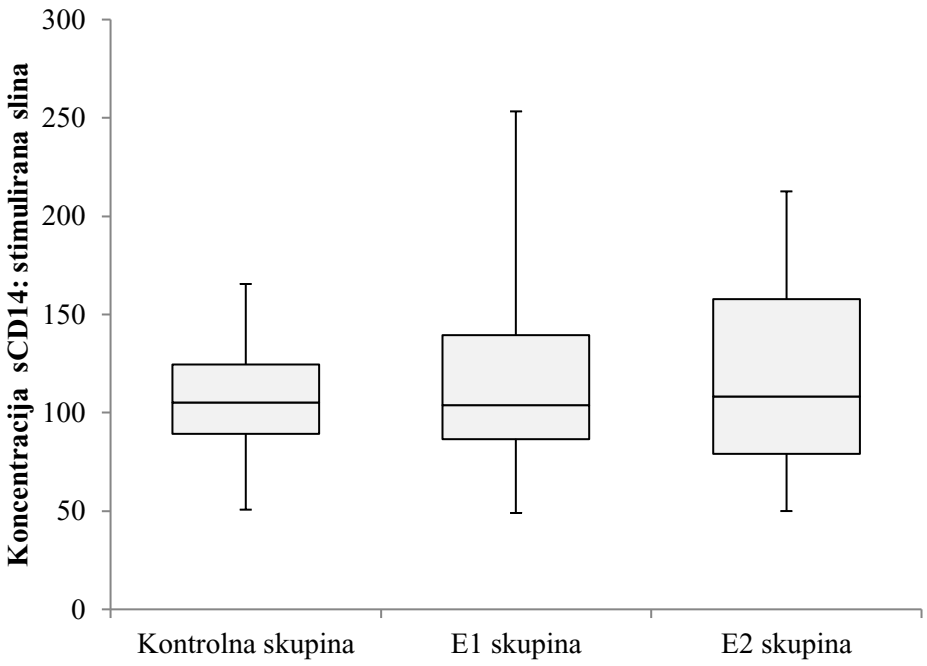
4.4.2. Stimulirana slina

Medijan koncentracije (ng/mL) sCD14 u stimuliranoj slini kontrolne skupine iznosio je 105,2, a E1 skupine 103,9, te E2 skupine 108,3 (Tablica 12, Slika 30). Između kontrolne i eksperimentalnih skupina (E1 i E2) nije ustanovljena statistički značajna razlika u koncentraciji sCD14 u stimuliranoj slini (p = 0.900).

Tablica 12. Koncentracija sCD14 stimulirane sline

	Medijan (IQR)	p
sCD14 u stimuliranoj slini (ng/mL)		
Kontrolna skupina	105,2 (89,2-124,7)	0,900
E1 skupina	103,9 (86,7-139,5)	
E2 skupina	108,3 (79,1-157,8)	

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Kruskal-Wallisovog testa



Slika 30. Koncentracija sCD14 u stimuliranoj. Box-Whisker plot prikazuje medijane skupina, interkvartilne raspone te minimalne i maksimalne izmjerene vrijednosti.

4.4.3. Korelacija između koncentracija sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini

Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini bila je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji na razini cijeloga uzorka i unutar pojedine skupine ispitanika (Tablica 13). Pri tome je povezanost bila u blagom linearnom porastu u skupinama ispitanika s karijesom. Drugim riječima, povezanost je bila najniža u skupini ispitanika bez karijesa, dok je bila najviša u skupini ispitanika s većim brojem karijesa.

Tablica 13. Korelacija između koncentracije sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini

	τ	p
Cijeli uzorak	0,37	<0,001
Kontrolna skupina	0,36	0,007
E1 skupina	0,40	0,002
E2 skupina	0,45	<0,001

Kratice: τ = Kendallov Tau-b koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti

4.4.4. Korelacija između koncentracije sCD14 u slini i parametara sline

Nestimulirana slina

Korelacija između pH-vrijednosti i koncentracije sCD14 nestimulirane sline nije ustanovljena (p = 0.218) (Tablica 14). Ustanovljena je negativna korelacija između koncentracije sCD14 i protoka nestimulirane sline (τ = -0.21, p = 0.010).

Tablica 14. Korelacija koncentracije sCD14 u slini (nestimuliranoj i stimuliranoj) s parametrima sline

	τ	p
Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini		
pH nestimulirane sline	-0,14	0,218
Protok nestimulirane sline	-0,21	0,010
Koncentracija sCD14 u stimuliranoj slini		
pH stimulirane sline	0,08	0,268
Protok stimulirane sline	-0,20	0,009
Puferski kapacitet stimulirane sline	-0,14	0,048

Kratice: τ=Kendallov Tau-b koeficijent korelacije; p=razina statističke značajnosti

Stimulirana slina

Korelacija između pH-vrijednosti i koncentracije sCD14 u stimuliranoj slini nije ustanovljena ($p = 0.268$). Ustanovljena je statistički značajna negativna korelacija između koncentracije sCD14 i protoka stimulirane sline ($\tau = -0.20$, $p = 0.009$) te između koncentracije sCD14 i puferskoga kapaciteta stimulirane sline ($\tau = -0.14$, $p = 0.048$) (Tablica 14).

4.4.5. Korelacija između koncentracije sCD14 u slini i dentalnoga statusa

DMFT indeks

Na razini cijeloga uzorka, između koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini i broja karijesa, utvrđena je statistički značajna, pozitivna korelacija (Tablica 15). Viša koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini također je bila u vezi sa statistički značajno većim DMFT indeksom.

Tablica 15. Korelacija između koncentracije sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini i DMFT indeksa

	τ	p
Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini (ng/mL)		
Decayed	0,22	0,004
Missing	-0,01	0,855
Filling	0,01	0,916
DMFT indeks	0,19	0,011
Koncentracija sCD14 u stimuliranoj slini (ng/mL)		
Decayed	0,00	0,953
Missing	0,06	0,468
Filling	0,02	0,781
DMFT indeks	0,03	0,662

Kratice: τ=Kendallov Tau-b koeficijent korelacije; p=razina statističke značajnosti

DMFS indeks

Između DMFS indeksa i koncentracije receptora sCD14 nije ustanovljena statistički značajna korelacija niti kod jedne skupine ispitanika. Međutim, ustanovljena je statistički značajna korelacija između većega broja ploha i veće koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini ($\tau = 0.21$, $p = 0.005$).

4.4.6. Korelacija između koncentracije sCD14 i lokalizacije karijesa u zubalu

Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini bila je statistički značajno viša u E2 skupini kod ispitanika kod kojih je karijes bio prisutan i u gornjoj čeljusti, u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney p = 0,003; Holm-Bonferroni korigirani p = 0,009) (Tablica 16). Ispitanici koji su imali karijes i u donjoj čeljusti, pri usporedbi s kontrolnom skupinom, koncentracija sCD14 bila je statistički značajno viša i u E1 skupini (Mann-Whitney p = 0,011; Holm-Bonferroni korigirani p = 0,022) i u E2 skupini (Mann-Whitney p = 0,003; Holm-Bonferroni korigirani p = 0,009).

Ispitanici E2 skupine kod kojih je bio prisutan karijes u interkaninom sektoru imali su statistički značajno višu koncentraciju sCD14 u nestimuliranoj slini u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney p = 0,001; Holm-Bonferroni korigirani p = 0,003). Koncentracija sCD14 je bila statistički značajno viša u nestimuliranoj slini E2 skupine ispitanika s prisutnim karijesom u postkaninom sektoru u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney p = 0,003; Holm-Bonferroni korigirani p = 0,009).

Kada je riječ o razlikovanju gornjega i donjega postkaninog sektora, sudionici E2 skupine koji su imali karijes u gornjem postkaninom sektoru imali su statistički značajno višu koncentraciju sCD14 u odnosu na sudionike kontrolne skupine (Mann-Whitney U = 228,5; p = 0,003; Holm-Bonferroni korigirani p = 0,009). U slučaju donjega postkaninog sektora koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini bila je statistički značajno viša i u E1 (158,0; p = 0,011; Holm-Bonferroni p = 0,022) i u E2 skupini (Mann-Whitney p = 0,003; Holm-Bonferroni korigirani p = 0,009) u odnosu na kontrolnu skupinu, dok među dvjema eksperimentalnim skupinama nije utvrđena razlika. U slučaju karijesa lokaliziranoga oralno, koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini bila je statistički značajno viša u E2 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney p = 0,012; Holm-Bonferroni = 0,036).

Tablica 16. Korelacija između koncentracije (ng/mL) sCD14 nestimulirane sline i lokalizacije karijesa u zubalu E1 i E2 skupine s kontrolnom skupinom

	E1 skupina		E2 skupina		
	n	Medijan (IQR)	n	Medijan (IQR)	p
Gornja čeljust	24	190,0 (139,7-258,8)	30	210,9 (177,0-301,7)	0,011
Donja čeljust	20	209,2 (169,9-267,0)	30	210,9 (177,0-301,7)	0,005
Interkanini sektor	6	223,4 (140,2-286,8)	10	270,3 (191,2-328,7)	0,003
Postkanini sektor	29	192,1 (140,7-266,7)	30	210,9 (177,0-301,7)	0,008
Gornji postkanini sektor	23	188,9 (138,8-261,3)	30	210,9 (177,0-301,7)	0,012
Donji postkanini sektor	20	209,2 (169,9-267,0)	30	210,9 (177,0-301,7)	0,005
Oralno	8	190,0 (151,3-247,0)	14	210,9 (179,3-324,5)	0,037
Vestibularno	4	155,9 (111,9-248,2)	14	195,9 (182,7-263,3)	0,067

U kontrolnoj skupini medijan (interkvartilni raspon) iznosio je 178,4 (118,9-200,3)

Kratice: n = broj sudionika; IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Kruskal-Wallisova testa usporedbe kontrolne i dviju eksperimentalnih skupina

4.4.7. Korelacija koncentracije sCD14 i vrijednosti mjerenja demineralizacije karijesnih promjena uređajem KaVo DIAGNOdent Pen

Između koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini i jačine demineralizacije karijesnih promjena izmjerene uređajem DDPen na različitim lokalizacijama, nisu ustanovljene statistički značajne korelacije.

Ustanovljena je statistički značajna negativna korelacija između veličine mjerenja demineralizacije karijesa u oralnom predjelu i koncentracije sCD14 u stimuliranoj slini (Tablica 17).

Tablica 17. Korelacija između koncentracije sCD14 u stimuliranoj slini i veličinom demineralizacije karijesnih promjena tvrdih zubnih tkiva

	E1 skupina		E2 skupina	
	τ	p	τ	p
Prosječna vrijednost	-0,04	0,748	-0,09	0,509
Maksimalna vrijednost	-0,19	0,148	-0,16	0,260
Gornja čeljust	-0,03	0,862	-0,02	0,886
Donja čeljust	-0,06	0,721	-0,15	0,261
Interkanini sektor	-0,07	0,851	-0,09	0,719
Postkanini sektor	-0,05	0,721	-0,11	0,382
Gornji postkanini sektor	-0,01	0,937	-0,03	0,844
Donji postkanini sektor	-0,06	0,721	-0,13	0,301
Oralno	0,00	>0,999	-0,41	0,046
Vestibularno	0,33	0,497	-0,15	0,469

Kratice: τ = Kendallov Tau-b koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti

4.4.8. Koncentracija sCD14 u slini u odnosu na demografske karakteristike ispitanika

Nestimulirana slina

Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini nije ovisila o demografskim karakteristikama ispitanika, pušenju, konzumaciji slatkoga i sokova s niskim pH-vrijednostima (Tablica 18).

Tablica 18. Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini s obzirom na demografske karakteristike ispitanika, pušenje, konzumaciju sokova s niskim pH-vrijednostima i slatkoga

	n	Medijan (IQR)	p
Spol			
muški	33	191,0 (141,3-264,3)	0,743
ženski	55	192,1 (130,2-237,4)	
Obrazovanje			
srednja škola ili niže	38	209,2 (169,9-267,3)	0,157
fakultet ili više	50	186,8 (129,5-224,9)	
Pušenje			
ne	54	193,8 (138,3-258,9)	0,771
da	34	190,0 (133,8-238,8)	
Konzumacija sokova s niskim pH			
jednom mjesečno ili rjeđe	41	188,7 (127,1-240,2)	0,304
2-3 puta tjedno ili češće	47	195,8 (163,8-267,2)	
Konzumacija slatkog			
2-3 puta tjedno ili rjeđe	59	188,8 (145,8-251,4)	0,753
barem jednom dnevno	29	192,1 (127,4-242,8)	

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Mann-Whitneyeva U-testa

Također, koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini nije se značajno razlikovala u ovisnosti o povremenoj pojavi simptoma u usnoj šupljini, uzimanju lijekova ili povremenom obolijevanju ispitanika (Tablica 19).

Tablica 19. Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini s obzirom na pojavu tegoba u usnoj šupljini, povremeno uzimanje lijekova i povremena obolijevanja

	n	Medijan (IQR)	p
Povremeno uzimanje lijekova			
ne	51	188,8 (138,8-243,0)	0,452
da	37	214,5 (132,9-247,2)	
Povremena obolijevanja			
ne	68	192,5 (150,9-265,0)	0,117
da	20	186,6 (125,0-209,8)	
Pečenje u ustima			
nikada	78	188,8 (136,5-242,9)	0,415
nekoliko puta godišnje ili češće	10	199,7 (174,3-278,1)	
Suhoća usta			
nikada	53	191,0 (132,8-240,2)	0,531
nekoliko puta godišnje ili češće	35	192,1 (176,4-266,2)	
Povraćanje			
nikada	73	188,6 (133,5-234,9)	0,091
nekoliko puta godišnje ili češće	15	222,5 (192,1-314,2)	
Krvarenje zubnog mesa			
nikada	33	188,9 (136,2-240,2)	0,819
nekoliko puta godišnje ili češće	55	192,1 (138,8-261,3)	

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Mann-Whitneyeva U-testa

Stimulirana slina

Razina sCD14 u stimuliranoj slini također nije ovisila o ispitivanim karakteristikama (Tablica 20).

Tablica 20. Koncentracija sCD14 u stimuliranoj slini s obzirom na demografske karakteristike ispitanika, pušenje i konzumaciju sokova s niskim pH-vrijednostima

	n	Medijan (IQR)	p
Spol			
muški	33	106,5 (87,5-132,5)	0,962
ženski	55	105,7 (86,9-139,4)	
Obrazovanje			
srednja škola ili niže	38	111,7 (80,1-141,8)	0,590
fakultet ili više	50	99,7 (88,0-134,0)	
Pušenje			
ne	54	113,0 (88,5-147,8)	0,185
da	34	100,7 (83,9-130,5)	
Konzumacija sokova s niskim pH			
jednom mjesečno ili rjeđe	41	104,5 (87,3-136,0)	0,592
2-3 puta tjedno ili češće	47	113,5 (86,2-139,4)	
Konzumacija slatkog			
2-3 puta tjedno ili rjeđe	59	106,5 (86,2-139,4)	0,831
barem jednom dnevno	29	104,7 (87,3-135,7)	

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Mann-Whitneyeva U-testa

Također, koncentracija sCD14 u stimuliranoj slini nije se značajno razlikovala s obzirom na konzumaciju sokova s niskim pH-vrijednostima ili slatkoga te u odnosu na pojavnost tegoba u usnoj šupljini (Tablica 21).

Tablica 21. Koncentracija sCD14 u stimuliranoj slini s obzirom na pojavu tegoba u usnoj šupljini te povremeno obolijevanje i uzimanje lijekova

	n	Medijan (IQR)	p
Povremeno uzimanje lijekova			
ne	51	100,5 (85,6-135,2)	0,268
da	37	114,5 (95,5-139,8)	
Povremena obolijevanja			
ne	68	105,2 (86,4-135,8)	0,948
da	20	108,3 (88,9-139,3)	
Pečenje u ustima			
nikada	78	105,2 (86,2-136,0)	0,442
nekoliko puta godišnje ili češće	10	113,5 (88,3-162,9)	
Suhoća usta			
nikada	53	104,7 (87,0-131,7)	0,382
nekoliko puta godišnje ili češće	35	106,7 (86,9-146,4)	
Povraćanje			
nikada	73	106,5 (87,0-136,2)	0,681
nekoliko puta godišnje ili češće	15	104,7 (86,9-165,5)	
Krvarenje zubnog mesa			
nikada	33	105,7 (88,4-132,5)	0,714
nekoliko puta godišnje ili češće	55	106,7 (86,2-139,4)	

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = razina statističke značajnosti, rezultat Mann-Whitneyeva U-testa

4.5. Predikcija pojave karijesa

Demografske karakteristike i navike

Analizom odnosa između demografskih karakteristika i pojave karijesa utvrđeno je da je samo dob statistički značajno povezana s njegovom pojavom. Pri tome su se sa svakom godinom rasta u dobi izgledi za pojavu karijesa smanjivali za 10 % (OR=0,90; 95 % CI: 0,83 – 0,98). Pušenje, povremeno uzimanje lijekova te povremena obolijevanja nisu bili statistički

značajno povezani s pojavom karijesa (Tablica 22). Konzumacija sokova s niskim pH-vrijednostima i konzumacija slatkoga te učestalost tegoba u usnoj šupljini nisu bili statistički značajno prediktivni za pojavu karijesa (Tablica 22).

Tablica 22. Predikcija karijesa s obzirom na demografske karakteristike, pušenje, konzumaciju sokova s niskim pH-vrijednostima i slatkoga

	Bez karijesa n (%)	Karijes n (%)	OR (95% CI)	p
Spol				
muški	10 (30,3)	23 (69,7)	1	
ženski	18 (32,7)	37 (67,3)	0,89 (0,35-2,27)	0,813
Dob, medijan (IQR)	35 (30-39)	31 (24-35)	0,90 (0,83-0,98)	0,012
Obrazovanje				
srednja škola ili niže	12 (31,6)	26 (68,4)	1	
fakultet ili više	16 (32,0)	34 (68,0)	0,98 (0,40-2,43)	0,966
Pušenje				
ne	18 (33,3)	36 (66,7)	1	
da	10 (29,4)	24 (70,6)	1,20 (0,47-3,04)	0,701
Konzumacija sokova s niskim pH				
do jednom mjesečno	13 (31,7)	28 (68,3)	1	
barem 2-3 puta tjedno	15 (31,9)	32 (68,1)	0,99 (0,40-2,44)	0,983
Konzumacija slatkog				
do 2-3 puta tjedno	19 (32,2)	40 (67,8)	1	
barem jednom dnevno	9 (31,0)	20 (69,0)	1,06 (0,41-2,75)	0,912

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; OR = omjer izgleda; 95 % CI = 95-postotni interval pouzdanosti za omjer izgleda; p = razina statističke značajnosti za omjer izgleda

Tablica 23. Predikcija karijesa s obzirom na pojavu tegoba u usnoj šupljini, povremena obolijevanja i uzimanje lijekova

	Bez karijesa	Karijes		
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	p
Povremeno uzimanje lijekova				
ne	12 (23,5)	39 (76,5)	1	
da	16 (43,2)	21 (56,8)	0,40 (0,16-1,01)	0,053
Povremena obolijevanja				
ne	19 (27,9)	49 (72,1)	1	
da	9 (45,0)	11 (55,0)	0,47 (0,17-1,32)	0,155
Pečenje u ustima				
nikada	27 (34,6)	51 (65,4)	1	
barem ponekad	1 (10,0)	9 (90,0)	4,77 (0,57-39,62)	0,149
Suhoća usta				
nikada	18 (34,0)	35 (66,0)	1	
barem ponekad	10 (28,6)	25 (71,4)	1,29 (0,51-3,25)	0,596
Povraćanje				
nikada	23 (31,5)	50 (68,5)	1	
barem ponekad	5 (33,3)	10 (66,7)	0,92 (0,28-3,00)	0,920
Krvarenje zubnog mesa				
nikada	13 (39,4)	20 (60,6)	1	
barem ponekad	15 (27,3)	40 (72,7)	1,73 (0,69-4,33)	0,239

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; OR = omjer izgleda; 95 % CI = 95postotni interval pouzdanosti za omjer izgleda; p = razina statističke značajnosti za omjer izgleda

Parametri sline i koncentracija sCD14 u slini

Puferski kapacitet stimulirane sline je jedini statistički značajni prediktor pojave karijesa (Tablica 24). Pri tome su ispitanici sa srednjim ili niskim puferskim kapacitetom imali preko četiri puta veće izglede za pojavu karijesa u odnosu na ispitanike s visokim puferskim kapacitetom (OR = 4,60; 95 % CI: 1,54 - 13,70). Također je utvrđeno da su s jediničnim rastom

koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini izgledi za pojavu karijesa povećavaju za 1 % (OR=1,01; 95 % CI: 1,004 – 1,02) (Tablica 22).

Tablica 24. Predikcija pojave karijesa s obzirom na parametre sline

	Bez karijesa (n=28)	Karijes (n=60)		
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	p
pH nestimulirane sline				
neutralan (6,50-7,49)	11 (32,4)	23 (67,6)	1	
alkalan (7,50 i više)	2 (66,7)	1 (33,3)	0,24 (0,02-2,93)	0,263
pH stimulirane sline				
neutralan (6,50-7,49)	4 (30,8)	9 (69,2)	1	
alkalan (7,50 i više)	24 (32,0)	51 (68,0)	0,94 (0,26-3,38)	0,930
Protok nestimulirane sline (mL/min)				
normalan (> 0,20)	26 (34,7)	49 (65,3)	1	
nizak ili vrlo nizak	2 (15,4)	11 (84,6)	2,92 (0,60-14,17)	0,184
Protok stimulirane sline (mL/min)				
normalan (> 1,0)	19 (36,5)	33 (63,5)	1	
nizak ili vrlo nizak	9 (25,0)	27 (75,0)	1,73 (0,67-4,43)	0,256
Puferski kapacitet stimulirane sline				
visok (>5,5)	23 (43,4)	30 (56,6)	1	
srednji ili nizak	5 (14,3)	30 (85,7)	4,60 (1,54-13,70)	0,006

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; OR = omjer izgleda; 95 % CI = 95-postotni interval pouzdanosti za omjer izgleda; p = razina statističke značajnosti za omjer izgleda.

Tablica 25. Predikcija pojave karijesa u odnosu na koncentraciju sCD14 u slini

sCD14 (ng/mL)	Bez karijesa (n=28)	Karijes (n=60)		
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	p
nestimulirana slina, medijan (IQR)	178,4 (118,9-200,3)	201,6 (164,2-278,5)	1,01 (1,004-1,02)	0,003
stimulirana slina, medijan (IQR)	105,2 (89,2-124,7)	106,6 (85,8-144,7)	1,00 (0,99-1,02)	0,472

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; OR = omjer izgleda; 95 % CI = 95-postotni interval pouzdanosti za omjer izgleda; p = razina statističke značajnosti za omjer izgleda.

4.5.1. Multivarijantni prediktivni model

Budući da je u istraživanje uključen relativno velik broj varijabli u odnosu na broj ispitanika, u model su spol i dob uključeni kao kontrolne varijable, a od ostalih varijabli uključene su one koje su na univarijantnoj razini bile povezane s pojavom karijesa na razini statističke značajnosti $p < 0,250$ (229). Multivarijantnim predviđanjem utvrđeno je da je koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini statistički značajan prediktor pojave karijesa i nakon kontrole ostalih varijabli uključenih u analizu (Tablica 26). Također, statistički značajni prediktor pojave karijesa je puferski kapacitet stimulirane sline (OR=5,20; 95 % CI: 1,28 – 21,12). Srednji ili niski puferski kapacitet povezan je s do pet puta većim izgledom za pojavu karijesa u odnosu na ispitanike s visokim puferskim kapacitetom (Tablica 26). Dob je statistički značajan prediktor pojave karijesa. S godinom rasta u dobi, uz kontrolu drugih varijabla, izgledi za karijes smanjivali su se 16 % (OR = 0,84; 95% CI: 0,74 – 0,94) (Tablica 26).

Tablica 26. Multivarijatno predviđanje pojave karijesa s obzirom na koncentraciju sCD14 u nestimuliranoj slini i parametara sline

	Bez karijesa (n=28)	Karijes (n=60)		
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	p
sCD14 (ng/mL) nestimulirana slina, medijan (IQR)	178,4 (118,9-200,3)	201,6 (164,2-278,5)	1,02 (1,01-1,03)	0,006
Puferski kapacitet stimulirane sline				
visok (>5,5)	23 (43,4)	30 (56,6)	1	
srednji ili nizak	5 (14,3)	30 (85,7)	5,20 (1,28-21,12)	0,021
Protok nestimulirane sline (mL/min)				
normalan (> 0,20)	26 (34,7)	49 (65,3)	1	
nizak ili vrlo nizak	2 (15,4)	11 (84,6)	1,26 (0,17-9,38)	0,819
Dob, medijan (IQR)	35 (30-39)	31 (24-35)	0,84 (0,74-0,94)	0,003

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; OR = omjer izgleda; 95 % CI = 95-postotni interval pouzdanosti za omjer izgleda; p = razina statističke značajnosti za omjer izgleda

4.5.2. Dijagnostička vrijednost koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini za predikciju karijesa

Dijagnostičku vrijednost određivanja sCD14 u nestimuliranoj slini kvantificirali smo izračunavanjem:

– Dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti

– Pozitivnom i negativnom prediktivnom vrijednosti

– Površinom ispod krivulje ROC.

Osjetljivost, specifičnost i prediktivne vrijednosti koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini

Analizom osjetljivosti i specifičnosti vrijednosti koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini za dijagnostiku karijesa utvrđeno je da su obje mjere u optimalnom omjeru pri koncentraciji sCD14 od 182,9 ng/mL. To je tzv. granična vrijednost, tj. indikativna koncentracija (Tablica 27).

Tablica 27. Osjetljivost, specifičnost i prediktivne vrijednosti koncentracije sCD14 (ng/mL) u nestimuliranoj slini kao prediktora pojave karijesa

		Karijes		
		Prisutan	Odsutan	
Koncentracija sCD14	indikativna (≥182,9)	stvarno pozitivni 41/60	lažno pozitivni* 12/28	Pozitivna prediktivna vrijednost 77% (69%-85%)
	nije indikativna (<182,9)	lažno negativni† 19/60	stvarno negativni 16/28	Negativna prediktivna vrijednost 46% (32%-58%)
		Osjetljivost 68% (61%-76%)‡	Specifičnost 57% (40%-72%)	

***** Pogreška tipa I (alpha); P vrijednost, odnosno razina statističke značajnosti; vjerojatnost da će nulta hipoteza biti odbačena kad u populaciji doista ne postoji razlika

†Pogreška tipa II (beta); vjerojatnost da će nulta hipoteza biti prihvaćena u slučaju kada u populaciji doista postoji razlika

‡ U zagradama 95-postotni interval pouzdanosti.

Ukupna osjetljivost koncentracije sCD14 za prepoznavanje karijesa iznosi 68 % (95 % CI: 61 % - 76 %), dok specifičnost iznosi 57 % (95 % CI: 40 % – 72 %). Drugim riječima, na temelju koncentracije sCD14 karijes se može dijagnosticirati kod 68 % onih kod kojih je zaista prisutan te se neće dijagnosticirati kod 57 % onih kod kojih je zaista odsutan. Pozitivna

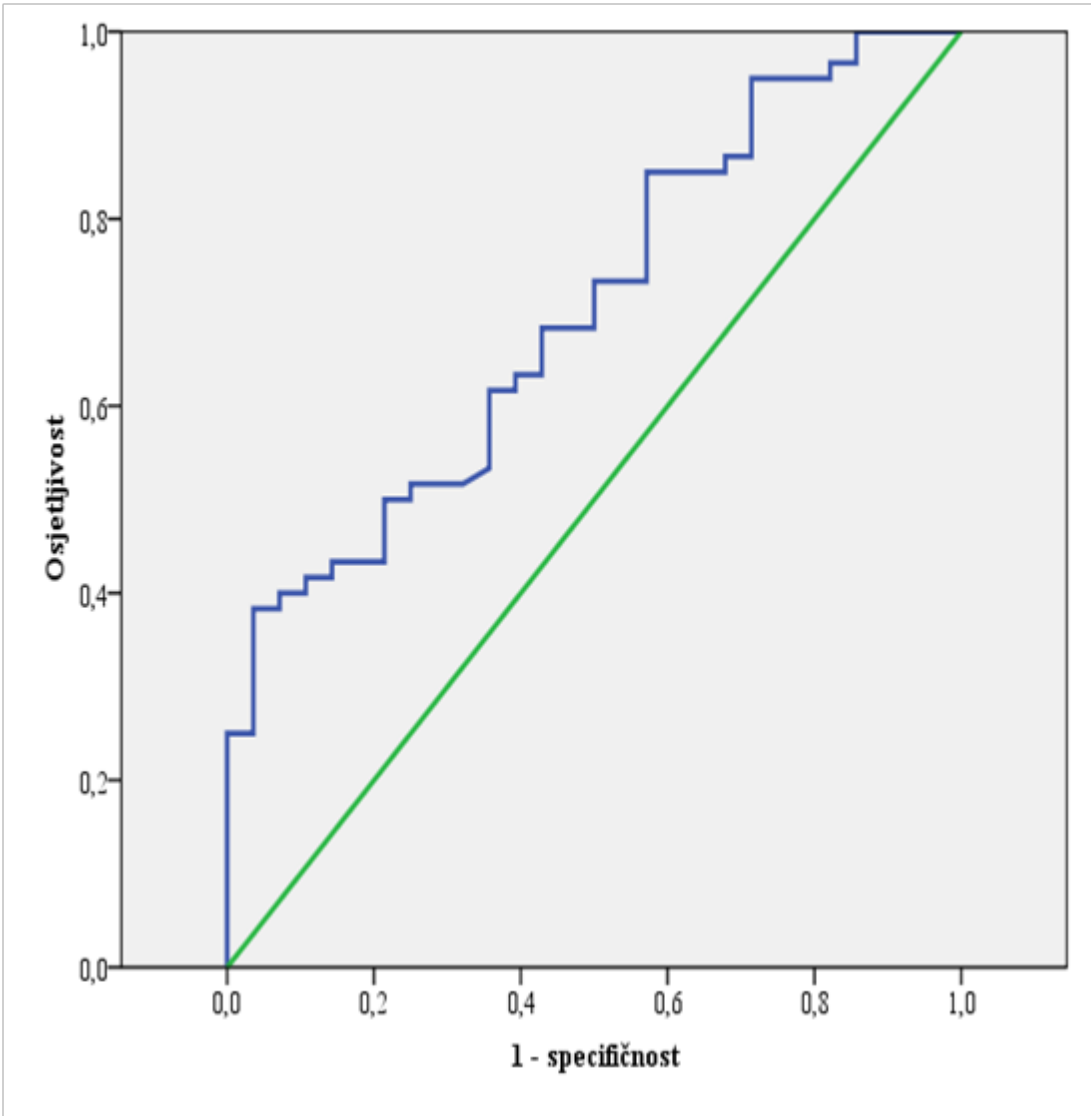
prediktivna vrijednost iznosi 77 % (95 % CI: 69 % – 85 %), što znači da 77 % onih koji imaju indikativnu koncentraciju sCD14 ujedno ima i karijes.

Negativna prediktivna vrijednost iznosi 46 % (95 % CI: 32 % - 58 %), što znači da 46 % onih koji nemaju indikativnu koncentraciju sCD14 ujedno nema ni karijes. Ukupna točnost, odnosno mogućnost klasifikacije sudionika na one s karijesom i one bez njega na temelju koncentracije sCD14 iznosi 65 % (95 % CI: 54 % – 75 %).

Krivulja ROC

Budući da se osjetljivost i specifičnost nekoga testa mijenjaju s izborom granične vrijednosti, koristeći se rasponom graničnih vrijednosti i odgovarajuće dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti, može se konstruirati krivulja. Po obliku krivulje i površini ispod nje možemo procijeniti koliko je njezina dijagnostička točnost.

Ukupna točnost predikcije, odnosno površina ispod krivulje iznosila je 0,70 te je bila statistički značajna (p = 0,002; 95 % CI: 0,59 – 0,82) (Slika 31).



Slika 31. ROC krivulja koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini prema prisutnosti karijesa

4.5.3. Prediktivna vrijednost indikativne koncentracije sCD14 u slini

Kako bi se odredila prediktivna vrijednost indikativne razine sCD14 uz kontrolu drugih varijabli, provedeno je multivarijatno predviđanje u kojem su kontrolirane prethodno identificirane varijable koje su zadovoljavale specificirani kriterij statističke značajnosti u univarijatnoj analizi ($p < 0,250$). Multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da je indikativna koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini statistički značajan prediktor pojave karijesa i nakon

kontrole ostalih varijabli uključenih u analizu (Tablica 28). Pri tome su ispitanici s indikativnom koncentracijom sCD14 u nestimuliranoj slini (≥ 182,9 ng/mL) imali preko pet puta veće izglede za pojavu karijesa u odnosu na ispitanike čija koncentracija nije bila indikativna (OR = 5,37; 95 % CI: 1,38 – 20,94). Osim koncentracije sCD14 u slini, statistički značajni prediktori pojave karijesa bili su i dob te puferski kapacitet stimulirane sline. Niski ili srednju puferski kapacitet stimulirane sline povezan je s do šest puta većim rizikom za pojavu karijesa u odnosu na visoki puferski kapacitet (OR = 6,02; 95 % CI: 1,49 – 24,25) (Tablica 28).

Tablica 28. Multivarijantno predviđanje karijesa na temelju indikativne koncentracije receptora sCD14 u nestimuliranoj slini i kontrolnih varijabla

	Bez karijesa (n=28)	Karijes (n=60)		
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	p
Indikativna koncentracija sCD14 (ng/mL)				
>182,9	16 (45,7)	19 (54,3)	1	
≥182,9	12 (22,6)	41 (77,4)	5,37 (1,38-20,94)	0,015
Puferski kapacitet stimulirane sline				
visok (>5,5)	23 (43,4)	30 (56,6)	1	
srednji ili nizak	5 (14,3)	30 (85,7)	6,02 (1,49-24,25)	0,012
Protok nestimulirane sline (mL/min)				
normalan (> 0,20)	26 (34,7)	49 (65,3)	1	
nizak ili vrlo nizak	2 (15,4)	11 (84,6)	1,17 (0,17-8,16)	0,876

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; OR = omjer izgleda; 95 % CI = 95-postotni interval pouzdanosti za omjer izgleda; p = razina statističke značajnosti za omjer izgleda

5. RASPRAVA

Rana detekcija bolesti ključna je za pravilnu prognozu i prevenciju daljnjega napredovanja bolesti. Slina, kao produkt organizma, pokazala je veliki potencijal kao dijagnostičko sredstvo naprema seruma i ostalih tjelesnih tekućina, upravo zbog neinvazivne metode prikupljanja sline kao uzorka te svoje ekonomičnosti. Komponente sline su produkt organizma te služe kao biljezi za dijagnozu i prognozu različitih sistemskih i lokalnih bolesti. Dijagnostički potencijal salivarnih biljega različitih medicinskih područja, uključujući i područja dentalne medicine, sve se više istražuje unazad 10 godina (230,231).

Unatoč napretku u razvoju raznih metoda rane detekcije i učinkovitim mjerama prevencije, karijes i dalje predstavlja bolest s dosta velikom prevalencijom širom svijeta. Slina se pokazala kao idealan alternativni dijagnostički medij, upravo zbog velike populacije koja može sudjelovati u istraživačkom programu (232). Određivanje nekih analita u slini kao biljega za dijagnozu i praćenje različitih bolesti pobudilo je veliku pozornost širom svijeta, pa tako i u stomatološkoj praksi (230). Smatra se za mnoge salivarne proteine da imaju ulogu kariogenih ili nekariogenih faktora, zavisno o njihovoj mogućnosti da inhibiraju rast acidogenih bakterija, da agregiraju bakterije, da pospješuju adheziju bakterija na površinu zuba ili da utječu na proces demineralizacije / remineralizacije (75,233)

5.1. Demografske karakteristike

Rezultati ovoga rada pokazali su da je prosječna dob kontrolne skupine 35, E1 skupine 32 i E2 skupine 31 godina. Razlika između E2 i kontrolne skupine se pokazala statistički značajnom ($p = 0,003$). Međutim, kako je uvjet za uključivanje u istraživanje bila dob ispitanika od 20 do 40 godina, tako je ipak medijan svih skupina ispitanika bio približno jednak, bez obzira na odstupanje od normalne raspodjele. Prijašnje studije su pokazale da je idealna dob za uzorkovanje sline 20 - 40 godina (234–236).

Rezultati ovoga rada pokazali su da su žene bile nešto više zastupljene od muškaraca te među skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika. Prijašnjim istraživanjima se pokazalo da muškarci imaju veću sekreciju nestimulirane sline u odnosu na žene, zbog većih žlijezda slinovnica, a shodno tomu i većoj produkciji sline (236,237).

Pradnya V i suradnici u svojoj studiji zaključuju da se u utvrđivanju rizika za pojavu karijesa pojedinca, parametri sline trebaju objediniti s sociodemografskim podatcima ispitanika, određenim navikama i zdravljem pacijenta (50).

Sudionike ovoga istraživanja smo usmeno i pismeno, anketnim upitnikom, precizno odabirali i prema korištenju lijekova. Time su uključeni u istraživanje mogli biti samo oni ispitanici koji nisu trošili nikakve lijekove ni sistemski niti lokalno unazad dva tjedna, kako ti lijekovi ne bi imali utjecaj na fiziološke i imunosne funkcije organizma i time na rezultate mjerenja sCD14 u slini. Poseban naglasak je bio na lijekovima protuupalne prirode (antibiotici, analgetici, antipiretici, kortikosteroidi) (96) te onima koji mogu imati za neželjeni učinak smanjenu sekreciju sline (psihotropni lijekovi, antihipertenzivi, antihistaminici, dekongestivi, antikolinergici, diuretici, sedativi i ostali simpatomimetici) (149,238).

Osim što lijekovi mogu utjecati na naš organizam, također mogu utjecati i razna patološka stanja. Tako je dokazano da GERB, kronično povraćanje u trudnoći i u alkoholizmu, ovisnost o opijatima, anorexia nervosa, bulimia nervosa i hiatus hernia mogu dovesti do povećanja kiselosti sline endogeno te utjecati na razvoj demineralizacije tvrdih zubnih tkiva (149,197–199,239). I Sjögrenova bolest, radijacijski sindrom nakon radioterapije tumora u području glave i vrata te teža oboljenja s dehidracijom organizma mogu dovesti do smanjene sekrecije sline (39,240,241), a različite kronične i akutne bolesti i stanja (imunosnoga sustava, trudnoća i šećerna bolest) mogu utjecati na promjenu koncentracije receptora sCD14, u krvi i u slini (242–245). Analizom podataka iz anketnoga upitnika dobiveni su rezultati koji pokazuju da ispitanici svih skupina ne boluju ni od kakvih bolesti.

Kako na nastanak i progresiju karijesa može utjecati više faktora, kao što su genetika, stil života i navike pojedinca (lijekovi, prehrana, pušenje) te oralna higijena, za odabir odgovarajućega terapijskog protokola u sanaciji karijesa i određivanja individualnoga programa prevencije, podatci o štetnim navikama i kvaliteti prehrane su važni.

Rezultati ovoga rada pokazuju da udio pušača / nepušača nije bio statistički značajno različit između kontrole i eksperimentalnih skupina. Nekoliko radova ustanovilo je da pušenje utječe na pH-vrijednost sline (246–248), na sekreciju sline (247,249) i puferski kapacitet sline (247).

Učestala konzumacija rafiniranih šećera, uključujući voćnih i gaziranih sokova, predstavljaju rizik za nastanak demineralizacija tvrdih zubnih tkiva zbog erozivnoga potencijala pića s niskim pH-vrijednostima i slatkih grickalica (6). Tu tvrdnju potvrđuju i druga istraživanja (183,202,250–252). Rezultati ovoga rada pokazali su da je učestalost konzumacije sokova s niskim pH-vrijednostima značajno veća u skupini E2 u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,035$).

U našem istraživanju ispitanici svih triju skupina podjednako konzumiraju slatko te nije utvrđena statistički značajna razlika u konzumaciji između kontrolne skupine ispitanika i ostalih skupina.

Smanjena sekrecija sline kronično može dovesti do pojave određenih tegoba usne šupljine koje pojedinci mogu opaziti, kao što su: suhoća usta, otežano gutanje, krvarenje zubnoga mesa, pečenje sluznice usta (240). Rezultati ovoga rada pokazali su da pečenje u ustima kao i krvarenje desni nije statistički značajno između kontrolne i eksperimentalnih skupina. Jedino se razlika među skupinama pokazala statistički značajnom u odnosu na pojavu suhoće usta, koju je osjetio veći broj ispitanika iz E2 skupine u odnosu na kontrolnu i E1 skupinu (Tablica 5).

5.2. Parametri sline

Ph-vrijednost sline

Rezultati predanalitičkoga ispitivanja pokazali su da se pH-vrijednosti sline pomoću testne trake ne razlikuju statistički značajno od pH-vrijednosti izmjerene pH-metrom. Zbog

toga, rezultati ovoga rada pokazuju da su pH-vrijednosti sline izmjerene pomoću indikatorske trake pouzdane što je osobito pogodno tijekom rutinskoga stomatološkog pregleda. Rezultati ovoga rada pokazali su da se pH-vrijednosti sline (nestimulirana i stimulirana) nisu statistički značajno razlikovale između kontrolne i eksperimentalnih skupina (E1 i E2).

Ipak, neke prijašnje studije pokazale su kako se niže pH-vrijednosti sline mogu dovesti u vezu s većom pojavnosti i karijesa i erozija (36,50,54,253). Također u našoj studiji nije dokazana statistički značajna razlika u pH-vrijednosti sline kod pušača i nepušača, vjerojatno zbog maloga udjela pušača u ukupnom uzorku.

Protok sline

Rezultati ovoga rada pokazali su da ispitanici kontrolne skupine imaju statistički značajno veći protok nestimulirane sline u odnosu na ispitanike E2 skupine ($p = 0,015$). Između kontrolne skupine i E1 skupine nije bilo statistički značajne razlike u salivarnom protoku (Tablica 8). U ovom radu hiposalivacija (protok $\leq$ 0,10 mL/min) je utvrđena samo kod ispitanika eksperimentalnih skupina. Hiposalivacija je ustanovljena u uzorcima nestimulirane sline kod 10,0 % sudionika E1 skupine i kod 3,3 % ispitanika E2 skupine. U slučaju protoka stimulirane sline, njegova vrlo niska vrijednost ($\leq$ 0,70 mL/min) izmjerena je kod 3,6 % ispitanika kontrolne skupine, 20,0 % ispitanika E1 skupine te kod 6,7 % ispitanika E2 skupine.

Rezultati ovoga rada pokazali su da je prevalencija vrlo niskoga protoka sline (nestimulirane i stimulirane) oko tri puta veća kod ispitanika s karijesom, nego kod ispitanika bez karijesa. Zbog toga su rezultati ovoga rada u skladu s prijašnjim studijama koje su ustanovile da salivarni protok, prije nego same salivarne komponente, ima važnu protektivnu ulogu za nastanak karijesa i eroziju tvrdih zubnih tkiva (45,241). Međutim, neke studije prikazuju drugačije rezultate (254). Protok također utječe na neutralizaciju kiselina iz dentalnoga plaka reducirajući tako incidenciju karijesa (255) te je smanjeni protok sline važan faktor rizika za nastanak karijesa (256), a posebice karijesa lokaliziranoga na kvržicama i korijenu zuba (55).

Prijašnja istraživanja pokazala su kako razvoj infekcija oralnih sluznica uslijed smanjene sekrecije sline, kao važnog obrambenog čimbenika usne šupljine (257), mogu

uzrokovati osjećaj peckanja u ustima (240). Osim toga, istraživanje je pokazalo i da ispitanici koji imaju niži protok sline češće osjete povremenu suhoću usta, što također može biti jedan od simptoma hiposalivacije i kserostomije, a što potvrđuju i prijašnje studije (240,257). U ukupnom uzorku nizak ili vrlo nizak protok nestimulirane sline bio je statistički značajno učestaliji u skupini sudionika kod kojih je suhoća usta bila prisutna nekoliko puta godišnje ili češće u odnosu na sudionike kod kojih ona nikada nije bila prisutna ($\chi^2 = 5,53$; ss = 1; p = 0,019).

Zbog toga smo u ovom radu ispitali oralne tegobe (osjećaj suhoće usta, pečenje…) kontrolne i ekperimentalnih skupina. Rezultati ovoga rada pokazali su da je suhoću usta osjetio veći broj ispitanika E2 skupine (63,3 %). Osim toga rezultati ovoga rada pokazali su da ispitanici kod kojih nikada nije bilo prisutno pečenje u ustima imaju statistički značajno veći protok stimulirane sline u odnosu na ispitanike kod kojih je pečenje bilo prisutno samo nekoliko puta godišnje ili češće (Mann-Whitney U = 230,0; p = 0,034).

Puferski kapacitet sline

Rezultati ovoga rada pokazuju da je puferski kapacitet stimulirane sline između kontrolne i eksperimentalnih skupina E1 i E2 skupine statistički značajno različit ($p < 0.001$). Puferski kapacitet bio je statistički značajno veći u kontrolnoj skupini u odnosu na E1 skupinu ($p = 0,004$) te u odnosu na E2 skupinu ($p < 0,001$), dok među eksperimentalnim skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika u mjerenjima. Nizak puferski kapacitet se često povezuje s razvojem karijesa zbog smanjene mogućnosti neutralizacije kiseline iz plaka i reducirane remineralizacije inicijalnih caklinskih lezija, dok su pacijenti s visokim puferskim kapacitetom često „karijes-otporni“ (50).

Prijašnje studije dovode u vezu veći protok sline s većim puferskim kapacitetom sline (258,259), što se potvrdilo i u našem istraživanju. Moritsuka i suradnici su u svojem istraživanju zaključili kako kvantitativna mjerenja sline mogu na taj način odrediti i pacijente s niskim puferskim kapacitetom (225).

Osim toga, rezultati ovoga rada pokazali su da je puferski kapacitet bio statistički značajno veći u skupini ispitanika koji sokove s niskim pH-vrijednostima konzumiraju jednom

mjesečno ili rjeđe u odnosu na ispitanike koji ih konzumiraju 2 – 3 puta tjedno ili češće ($p = 0,047$). Naši rezultati u skladu su s nedavnim ispitivanjima (260) što upućuje na važnost edukacije pacijenata o pravilnoj i zdravoj prehrani kako bi unos sokova s niskim pH-vrijednostima sveli na najmanju moguću mjeru (261).

Uzorkovanje sline

Mnoge studije daju naglasak na važnost metodologije u prikupljanju sline (106,262) jer nedostatak standardizacije postupka prikupljanja sline može utjecati na rezultate istraživanja i njihovu interpretaciju u različitim granama dentalne medicine (230,263).

Tako se primjerice u prijašnjim studijama protok nestimulirane sline pokazao osjetljivijim na utjecaj medikamenata naspram protoka stimulirane sline (86). Kod dijagnostike hiposalivacije, nestimulirani protok sline se preporučuje kao bolji izbor uzorka jer može biti smanjen dok je istovremeno protok stimulirane sline nepromijenjen (1). S druge strane, za određivanje puferskoga kapaciteta sline se preporučuje prikupljati uzorke stimulirane sline (224). Nestimuliranu slinu je, generalno gledajući, lakše prikupljati nego stimuliranu te je ona najčešće korištena kao uzorak u istraživanjima za detekciju različitih medijatora upale u slini (IL-1β, IL-6, IL-8, MMP-8, MIP-1α) (4–6,85,141,264). Međutim, količina sline prikupljene tom metodom vrlo često je mala, posebice kod starije populacije ispitanika ili dojenčadi (218,230). Tako se i u ovom istraživanju količina uzorka nestimulirane sline pokazala nedovoljnom kod nekih ispitanika. Za određivanje puferskoga kapaciteta sline koristili su se uzorci samo stimulirane sline te tako taj manjak nije ni bio potreban pa stoga nije niti utjecao na rezultate istraživanja. Za sva ostala testiranja u istraživanju smo zbog nedostatka standardizacije postupka prikupljanja uzoraka sline koristili obje metode uzorkovanja, kako bi rezultate mogli usporediti.

5.3. Demineralizacijske promjene tvrdih zubnih tkiva kod dviju eksperimentalnih skupina ispitanika i njihova usporedba te dentalni status ispitanika kontrolne skupine

Kliničkim pregledom ispitanika utvrđen je dentalni status prema indeksu DMF zuba i ploha. Prema broju karijesom zahvaćenih zuba ispitanici eksperimentalnih skupina su se svrstavali u dvije skupine: E1 1 – 5 karijes i E2 6 i više karijesa, dok su se za kontrolnu skupinu ispitanika bez karijesa bilježile ostale varijable indeksa DMF zuba i ploha. Rezultati ukupnoga DMFT indeksa pokazuju manje razlike u medijanima pojedinih skupina ispitanika pa je tako medijan za kontrolnu skupinu bio 13, E1 15 i E2 17. Međutim, međusobnom usporedbom razlika se pokazala statistički značajnom ($p = 0,021$).

Iako kontrolna skupina nije imala karijes, medijan ukupnoga DMFT indeksa je približan medijanima eksperimentalnih skupina jer su ispitanici kontrolne skupine imali prosječno veći broj ekstrahiranih zuba u odnosu na E2 skupinu ($p = 0,048$) i prosječno veći broj zuba s ispunom i odnosu na ostale skupine ispitanika ($p = 0,001$). U usporedbi eksperimentalnih skupina, očekivana je statistički značajna razlika između broja karioznih zuba (Mann-Whitney $U = 0,00$; $p < 0,001$) gdje je medijan broja karioznih zuba u E1 skupini bio 3, a u E2 skupini 10. U odnosu na ostale varijable DMFT indeksa ispitanici E1 skupine imaju više zuba s ispunom (medijan 8) i više ekstrahiranih zuba (medijan 3). Prijašnje studije upućuju na negativnu korelaciju incidencije karijesa s obzirom na protok sline (50,265). I ovo istraživanje potvrđuje takve rezultate. Također bi se iz ovoga istraživanja dalo zaključiti da neznatno manji medijan ukupnoga DMFT indeksa kontrolne skupine u odnosu na eksperimentalne upućuje na činjenicu da su i ispitanici kontrolne skupine, iako trenutno bez karijesa, ipak prije imali karijesom zahvaćene zube, a koji su potom sanirani te da receptor sCD14 u slini kao protein akutne faze imunosnoga odgovora može mijenjati svoju koncentraciju prema trenutnom stanju u zubalu i da se može rabiti kao biljeg za tu patološku promjenu tvrdih zubnih tkiva.

Analizirajući rezultate dobivenih registracijom indeksa DMF ploha zaključili smo da je medijan ukupnoga indeksa DMF ploha kontrolne skupine malo veći od medijana eksperimentalnih skupina ispitanika bez obzira na to što se razlika nije pokazala statistički značajnom. Pri tome je broj ploha s ispunom bio statistički značajno veći u odnosu na broj ploha s ispunom eksperimentalnih skupina ispitanika ($p = 0,001$). To nas upućuje na činjenicu da su zubi ispitanika kontrolne skupine koji su sanirani ispunom bili čak i više destruirani karijesom

u odnosu na sanirane zube ispitanika eksperimentalnih skupina. Registracijom indeksa DMF ploha dobili smo podatke o lokalizaciji karijesa u zubalu. Tako su rezultati pokazali da se učestalost karijesa u interkaninom području nije previše razlikovala između E1 i E2 skupine dok je karijes bio više lokaliziran u lateralnom području kod obiju skupina ispitanika, i to više u gornjoj čeljusti. Zbog fiziološkoga čišćenja prednjih zuba i boljega četkanja smanjena je prevalencija karijesa u frontalnoj regiji, nego u lateralnom području. Također je utvrđena veća učestalost vestibularnih karijesa u E2 skupini te je razlika bila statistički značajna ($p = 0,005$; $\varphi = 0,36$). Takav nalaz se može tumačiti većom incidencijom vestibularnih karijesa kod smanjenoga protoka sline (240), gdje su ispitanici E2 skupine imali manji protok nestimulirane sline, nego ispitanici E1 skupine.

U našem istraživanju detekcija karijesa se provodila i mjernim instrumentom tehnike laserske fluorescencije, a u prethodnim studijama metodološki pristup bio je samo vizualno-taktilan što je dokazano kao nedovoljna metoda, posebice u lateralnoj regiji. Sve demineralizirane promjene su se mjerile uređajem KaVo DIAGNOdent Pen. Pri tome je medijan maksimalne izmjerene vrijednosti u E1 skupini iznosio 54 (33 – 83), dok je u E2 skupini iznosio 99 (74 – 99) te se razlika pokazala statistički značajnom ($p < 0,001$). Najmanje prosječne vrijednosti medijana izmjerene su u interkaninom predjelu te se među skupinama nije pokazala statistički značajna razlika.

U istraživanju Almose NA i suradnika iz 2014. godine vrijednosti mjerenja demineraliziranih površina zuba uređajem DDPen tumače se kao: 0 – 13 zdrav zub, 14 – 20 caklinski karijes, 21 – 29 duboki caklinski karijes i ≥ 30 karijes dentina (266). Prema tome, medijan prosječne vrijednosti mjerenja pokazuje da se karijes nalazio u caklini te u caklini i dentinu kod E1 skupine (medijan 32 (26 - 43)), a najviše u dentinu kod E2 skupine (medijan 36 (31 - 54)).

Kod obiju skupina ispitanika u interkaninom području mjerenja pokazuju manje vrijednosti: E1 skupina medijan 23 (14 – 36) i E2 skupina medijan 40 (17 – 61), dok u postkaninom području mjerenja pokazuju veće vrijednosti: E1 skupina medijan 35 (25 – 48) i E2 skupina 37 (31 - 55). To upućuje na činjenicu da je u lateralnom području karijes više napredovao. Ovo istraživanje pokazalo je veću prevalenciju karijesa u lateralnom području, s većom destrukcijom tvrdih zubnih tkiva. Stoga je vrlo važno pravilno dijagnosticirati i

evaluirati karijesne lezije toga područja. Međutim, detekcija karijesa u lateralnom području, posebice karijesa aproksimalnih ploha, vrlo je zahtjevna (267).

Prijašnja istraživanja navode dijagnostiku karijesa primjenom laserske fluorescencije kao preciznijom u odnosu na vizualnu evaluaciju u identifikaciji karijesnih lezija bez prisutnosti kavitacije kod molara (133,268,269), što potvrđuje i istraživanje Mansour i suradnika iz 2016. godine (270). Što se tiče dijagnostike aproksimalnih karijesa, de Souza i suradnici su 2014. godine u svojoj studiji analizirali 246 aproksimalnih ploha prednjih zuba *in vitro*. Došli su do zaključka da uređaj DDPen bolje detektira aproksimalni karijes cakline i dentina, nego klasična radiološka tehnika BW, dok je detekcija dubljih karijesa dentina objema metodama dala slične rezultate (174).

Radiografska metoda BW je uz vizualnu tehniku prije predstavljala „zlatni-standard“, kao pomoćnoga sredstva u dijagnostici karijesa (271), ali zbog različitih tehnika izvođenja snimanja, ekspozicije pacijenata ionizirajućem zračenju te zbog toga što radiografska snimka ne prikazuje stvarnu veličinu lezije, ta metoda se sve manje rabi u dijagnostici karijesa (272). Bader i suradnici u svom su preglednom istraživanju došli do zaključka kako uporabom konvencionalnih kliničkih i radiografskih metoda praktičar može detektirati samo otprilike polovicu lezija i previdjeti neke zdrave površine kao kariozne te smatraju da radiografija može pouzdano detektirati samo dublje dentinske lezije okluzalnih površina (273). U jednom novijem istraživanju (2016) Bizhanga M i suradnika, uspoređene su metode radigrafije BW i laserske fluoroskopije tipa Pen u detekciji aproksimalnih karijesa *in vivo* kod ispitanika odrasle populacije (267). Zaključili su kako metoda detekcije laserskom fluoroskopijom tipa Pen ima bolje rezultate nego radiografska metoda BW te može zamijeniti i nadoknaditi radiografiju u daljnjim postupcima za dijagnostiku karijesa u znanstvenim istraživanjima.

Mjerenja demineraliziranih područja laserskom fluoroskopijom također mogu poslužiti i u preporuci za sanaciju lezija (221): 0 – 13 normalna profilaksa, 14 – 20 intenzivna profilaksa (fluoridacija, Healozone) i prevencija, 21 – 29 minimalno invazivno liječenje (Healozone, zračna abrazija, laser, ultrazvučni i ostali mikro instrumenti i intenzivnma profilaksa), 30 – 99 restaurativni zahvati i intenzivna profilaksa. Time se točnije može odrediti terapija, s naglaskom na minimalno invanzivnu terapiju, jer preciznija dijagnostička mjerenja lezija daju uvid i u veličinu destrukcije tvrdih zubnih tkiva (274).

S obzirom da usna šupljina predstavlja jednu funkcionalnu sredinu, također smo pri kliničkom pregledu ispitanika registrirali i prisutnost demineralizacijskih promjena tvrdih zubnih tkiva nastalih zbog nekarijesnih oštećenja erozijom, kod svih grupa ispitanika. Registrirali smo ih pomoću TWI metode i upisali u obrazac (Prilog 2).

Analizom rezultata registriranih erozija kod ispitanika kontrolne skupine i njihovom statističkom obradom utvrdili smo da čak 50 % (14/14) ispitanika te skupine ima prisutne erozije tvrdih zubnih tkiva. Rezultati su u skladu s rezultatima pregledne studije iz 2015. godine gdje su Salas M i suradnici utvrdili prevalenciju erozija kod 30.4 % adolescenata u dobi 8 – 19 godina. Tako velika frekvencija erozija u adolescentskoj populaciji upućuje na činjenicu da je erozija sve više te je kliničaru neophodna suradnja s medicinskim specijalističkim stručnjacima kako bi se uzrok takve destrukcije tvrdih zubnih tkiva na vrijeme dijagnosticirao i time spriječila njihova daljnja progresija (275).

Također bi se pri dijagnosticiranju erozivnih promjena trebala primijeniti metoda mjerenja suspektnih lezija reflektometrom jer je metoda točna i neinvazivna (180,209). Laserska fluoroskopija mjeri demineralizaciju karijesnih lezija na način da zapravo mjeri apsorpciju fluorescencije bakterijskih produkata u porama karijesne lezije te se preporučuje samo za mjerenje demineralizacija nastalih zbog karijesnih oštećenja (276).

Primjenom ovakve dodatne metode, s preciznijom detekcijom demineraliziranih područja, rezultate istraživanja trebali bi potvrditi mjereći populaciju većega uzorka, a sve u svrhu dobivanja boljih informacija o povezanosti karijesa, erozija i koncentracije sCD14 u slini kao njihova potencijalnoga biljega.

5.4. Koncentracija sCD14 u slini kao biljeg karijesa

Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da je medijan koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini bio statistički značajno veći kod ispitanika s karijesom (E1 i E2 skupine) u odnosu na kontrolnu skupinu bez karijesa (Tablica 11). U E2 skupini je koncentracija sCD14 također bila statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,009$). Ta povećana

koncentracija sCD14 u slini ispitanika s karijesom može se dovesti u vezu s većom količinom gram-negativnih bakterija u usnoj šupljini i posljedičnom aktivacijom receptora CD14. Također, rezultati su pokazali da se među dvjema eksperimentalnim skupinama razlika u koncentraciji sCD14 nije pokazala statistički značajna ($p = 0,469$).

Nadalje, rezultati ovoga rada pokazali su da se koncentracija sCD14 nije statistički značajno razlikovala u stimuliranoj slini između kontrolne i eksperimentalnih skupina kao što je to slučaj za nestimuliranu slinu. Slične rezultate dobili smo u prijašnjoj studiji gdje nismo utvrdili statistički značajnu razliku u koncentraciji sCD14 u stimuliranoj slini između osoba s karijesom i bez karijesa (96).

Također, u našem prijašnjem radu utvrdili smo statistički značajnu višu koncentraciju sCD14 u nestimuliranoj slini ispitanika s karijesom u usporedbi s kontrolnom skupinom bez karijesa (203.3 vs 167.9 ng/mL, $p < 0.01$) (96). Međutim, Bergandi i suradnici (27) su dobili drugačije rezultate za koncentraciju sCD14 u slini djece (dob 8 – 9 godina), tj. koncentraciju sCD14 u slini nije bila povišena kod ranih karijesnih lezija. Literaturnih podataka o koncentraciji sCD14 u slini odraslih ispitanika ima vrlo malo pa zato nismo mogli rezultate ovoga rada uspoređivati s ostalim studijama.

Nasuprot tomu, nekoliko studija ispitivalo je koncentraciju sCD14 u slini djece s karijesom različitih dobi (27,133). Biria i suradnici (133) ustanovili su veću koncentraciju sCD14 u nestimuliranoj slini djece s karijesom (36 – 71 mjesec starosti) u usporedbi s djecom bez karijesa. Autori toga rada koristili su istu metodu za određivanje koncentracije sCD14 u slini kao što je primijenjeno u ovoj studiji, ali bez dodatnih analiza parametara sline. Drže da je povećana koncentracija sCD14 u skladu s ulogom ovoga koreceptora u progresiji upale te da sCD14 ima dijagnostički potencijal kao biljeg za karijes, tj. njegovu progresiju i aktivnost (133). Kako se sCD14 smatra proteinom upale, logično je pretpostaviti da je njegova pojačana sekrecija upravo tijekom upale, a smanjena sekrecija nakon smirivanja upale. Poznato je da velike žlijezde slinovnice luče sCD14 u slinu (50). On ima važnu ulogu u obrani od upale, jer s velikim afinitetom može vezati endotoksin (277). Osim što je receptor za LPS i druge bakterijske komponente (278), on regulira aktivaciju i funkciju limfocita T i B (279). Uočeno je da se ponaša kao protein akutne faze te su stoga njegove koncentracije u serumu povišene kod upala (9). U reakciji domaćina kod upale dosta funkcija se pripisuje upravo proteinima akutne faze: obnova tkiva, modulacija koagulacije, neuroendokrina sekrecija, hematopoeza,

metabolizam, vezanje metala te borba protiv upale (280,281). U akutnoj fazi odgovora, sCD14 može premostiti tu razliku između prirodnoga i stečenoga imuniteta, modulirajući staničnu i humoralnu imunost (282). Stoga autori drže da je razlika u metodologiji i protokolu sanacije zubala dovela do razlike u koncentracijama sCD14 u slini nakon tretmana. Pri tome se vode činjenicom da upale sluznica, desni i parodonta mogu utjecati na rast koncentracije sCD14 u slini (283), što kod ispitanika dječje populacije u prijašnjim istraživanjima nije uzimano u obzir (133). Naravno, moramo uzeti u obzir da se imunosni sustav od rođenja pa do starosti stalno mijenja te da njegovo sazrijevanje traje i u adolescenciji pa sve do odrasle dobi (izuzev trudnoće) (284).

Prema dosadašnjim studijama, ovo je prvo istraživanje koje ispituje koncentraciju sCD14 u uzorcima sline ispitanika odrasle populacije s karijesom. Također, ovo je prva studija koja je ispitivala koncentraciju sCD14 u uzorcima nestimulirane i stimulirane sline. Kako su ispitanici bili zdravi, nisu uzimali lijekove te je razlika u dobi bila vrlo mala, iz rezultata bismo mogli zaključiti da se veća prevalencija hiposalivacije kod ispitanika s karijesom može dovesti u vezu s aktivnošću karijesa. Slično tomu, druge studije utvrdile su priličan pad protoka sline kod djece i odraslih s karijesom u usporedbi s ispitanicima bez karijesa (217,285,286). Razlike u dobi ispitanika kod dječje populacije zbog procesa sazrijevanja imuniteta mogu biti glavni uzrok drugačijih rezultata imunosnih istraživanja. S obzirom da je receptor sCD14 identificiran kao protein upale koji povezuje prirođeni i stečeni imunitet, a IgA i IgG dosežu svoj maksimum u dobi 7 – 12 godina, njegova povećana koncentracija u toj dobi povezuje se s nedostatnom produkcijom tih imunoglobulina (9).

Također, rezultati ovoga istraživanja pokazali su da postoji negativna, statistička korelacija između koncentracije sCD14 i puferskoga kapaciteta stimulirane sline (Tablica 14). Kako podataka u literaturi o povezanosti salivarne koncentracije sCD14 s puferskim kapacitetom sline u osoba s karijesom nema, držimo da rezultati ovoga rada predstavljaju dobru bazu za daljnja ispitivanja karijesa.

5.4.1. Međusobni odnos varijabli istraživanja s koncentracijom sCD14 u slini

Prijašnje studije su pokazale različite rezultate mjerenja koncentracije sCD14 u slini kao potencijalnom biljegu prisutnosti karijesa (27,133). Cilj im je bio ispitati potencijalni biljeg ranoga karijesa u djece, kako bi se karijes na taj način mogao detektirati i prevenirati već u ranoj subkliničkoj fazi.

Naravno da je za svakoga kliničara važno spriječiti bolest prije same pojave i da je važno utvrditi pojavnost karijesa još u najranijoj dobi kako bi zubi bili što duže očuvani kroz život. Ipak, studije pokazuju kako je unatoč dobroj prevenciji karijesa i u dječjoj dobi, karijes još uvijek dosta raširen te njegova prevalencija raste s dobi (287) i predstavlja problem kod odrasle populacije (288). Također, uzorak s mlađom populacijom ispitanika (vrtićka djeca i adolescenti) u istraživanju imunosnih komponenata pokazao se nepouzdanim, vjerojatno zbog nezreloga imuniteta (284). Stoga je uzorak ovoga istraživanja činila odrasla populacija, kako bi on bio što reprezentativniji.

U ovom radu, analizom međuodnosa koncentracije sCD14 u slini i općih karakteristika uzorka, odnosno ispitanika, nije utvrđena ni jedna statistički značajna korelacija. Prema tomu, na koncentraciju receptora sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini u ovom istraživanju nisu utjecale demografske karakteristike ispitanika, učestalost pušenja, prijašnje povremeno uzimanje lijekova ili prijašnje obolijevanje ispitanika. Također nije utvrđena statistički značajna povezanost koncentracije receptora sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini ni u odnosu na konzumaciju sokova s niskim pH-vrijednostima i gaziranih pića te konzumaciju slatkoga. Provedenim testiranjima nije utvrđena ni statistički značajna povezanost koncentracije sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini niti s obzirom na prisutnost oralnih tegoba (pečenje usta, suhoća usta, povraćanje itd.). Ova dodatna analiza pokazuje da sve ispitane karakteristike uzorka nisu utjecale na rezultate istraživanja te se uzorak pokazao reprezentativnim.

Analizirajući odnos koncentracije sCD14 u slini na razini cijeloga uzorka i parametara sline, uočena je statistički značajna negativna povezanost gdje se veći protok nestimulirane sline povezuje s manjom koncentracijom sCD14. Daljnjom analizom povezanosti među skupinama ispitanika veći protok nestimulirane i stimulirane sline statistički je značajno povezan s nižom koncentracijom sCD14 u nestimuliranoj i stimuliranoj slini kod kontrolne

skupine ispitanika. To možemo objasniti činjenicom da ispitanici kontrolne skupine imaju manji medijan koncentracije sCD14 spram eksperimentalnih skupina, a čiji je protok sline niži u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika. Iz rezultata možemo zaključiti da ispitanici koji imaju manji protok sline imaju veću šansu da imaju veću koncentraciju sCD14 u slini što može upućivati na prisutnost upala. Prijašnje studije dovode u vezu smanjeni protok sline i prisutnost upala u usnoj šupljini, uključujući i aktivnost karijesa (50).

Pri usporedbi koncentracije sCD14 u slini i dentalnoga statusa nije utvrđena statistički značajna korelacija niti jednoga parametra DMFT/DMFS indeksa osim karijesa. U odnosu na parametar karijesa iz DMFT/DMFS indeksa veći broj karijesa bio je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji što znači da su ispitanici s većim brojem karijesa imali i veću koncentraciju receptora sCD14 u nestimuliranoj slini. S obzirom da je sCD14 protein akutne faze upale (9) njegova povećana koncentracija u slini može biti povezana s aktivnošću karijesa, kao demineralizacijske promjene tvrdih zubnih tkiva uzrokovane bakterijama.

Daljnjom analizom, uspoređene su lokalizacije karijesa u zubalu i njihov odnos s obzirom na koncentraciju sCD14 u slini. Među eksperimentalnim skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na lokalizaciju karijesa i koncentraciju sCD14. Iz dobivenih rezultata ne može se predvidjeti najvjerojatnija lokalizacija karijesa u zubalu pri povećanoj koncentraciji sCD14 u slini, već samo moguća aktivnost karijesa tvrdih zubnih tkiva.

Mjerenjem demineraliziranih promjena uređajem DDPen dobivene su vrijednosti jačine demineralizacije koje su u istraživanju također uspoređene s koncentracijom sCD14 u slini. Korelacija nije pokazala statistički značajnu povezanost osim kod mjerenja karijesnih lezija na oralnim plohama. Međutim, s obzirom da su oralne plohe bile zahvaćene karijesom u većoj frekvenciji kod ispitanika E2 skupine (47 %), kod te je skupine ispitanika ionako već utvrđena veća koncentracija ispitivanoga receptora u slini. Takav odnos možemo povezati s manjim protokom sline kod te grupe ispitanika, gdje je kod 23.3 % ispitanika te skupine utvrđen nizak protok sline i kod 3.3 % ispitanika hiposalivacija. Već su prijašnje studije utvrdile da hiposalivacija može dovesti do razvoja cervikalnih karijesa (240).

5.4.2. Predviđanje karijesa prema karakteristikama ispitanika, vrijednostima parametara sline i koncentraciji sCD14 u slini

Pokazalo se da je koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini statistički značajan prediktor za pojavu karijesa i nakon kontrole ostalih varijabli uključenih u istraživanju, gdje su se s jediničnim porastom koncentracije sCD14 u slini izgledi za pojavu karijesa povećavali za 2 % (OR = 1,02; 95 % CI: 1,01 – 1,03).

Daljnjom analizom predikcije karijesa utvrđena je statistički značajna predikcija prema puferskom kapacitetu stimulirane sline (OR = 4,60; 95 % CI: 1,54 – 13,70). Već je prije utvrđeno da je niski puferski kapacitet sline povezan s povećanim rizikom za razvoj karijesa (36,289) zbog njegove nemogućnosti neutralizacije kiseline iz dentobakterijskoga plaka i smanjene remineralizacije ranih caklinskih lezija (50) što se pokazalo i u ovom istraživanju. Ispitanici sa srednjim ili niskim puferskim kapacitetom imali su preko četiri puta veće izglede za pojavu karijesa u odnosu na ispitanike s višim puferskim kapacitetom.

Međutim, poznati faktori rizika za razvoj demineralizacija tvrdih zubnih tkiva prema prijašnjim istraživanjima (50) u ovom uzorku nisu utjecali na razvoj karijesa u toj mjeri da bi se pokazali prediktivnim na njegovu aktivnost, osim niskog puferskoga kapaciteta stimulirane sline.

Konzumacija sokova s niskim pH-vrijednostima, gaziranih pića i konzumacija slatkoga predstavljaju rizik za pojavu demineralizacije tvrdih zubnih tkiva (erozije i karijes), međutim, u našem uzorku se ta predikcija za razvoj karijesa nije pokazala statistički značajnom, vjerojatno zbog istoga razloga.

S obzirom na to da suhoća usta može biti povezana sa smanjenom produkcijom sline (50), a time i većim rizikom za pojavu karijesa (290), povremena suhoća koja se kod ispitanika pojavljivala prema njihovoj subjektivnoj procjeni, nije se pokazala prediktivnom za pojavu karijesa. Odnosno, nije bila izražena u toj mjeri da bi upućivala na vjerojatnu pojavu karijesa.

Poznato je da pušenje isušuje usta, smanjuje protok sline i djeluje na imunitet te tako može utjecati na povećani rizik od karijesa (249) i parodontne bolesti (291). Kako je samo manji dio ispitanika pušio, ta varijabla nije pokazala statistički značajnu predikciju za karijesa u ovom

istraživanju. Također, prijašnje povremeno uzimanje lijekova ili povremena obolijevanja ispitanika nisu pokazala statistički značajnu predikciju za karijes.

U ovoj analizi rezultati su pokazali da su se sa svakom godinom rasta dobi izgledi za pojavu karijesa smanjivali za 10 % (OR = 0,90; 95 % CI: 0,83 – 0,98). Takve rezultate možemo objasniti metodološki, odnosno odabirom uzorka, gdje je medijan dobi ispitanika kontrolne skupine (bez karijesa) bio 35 (IQR 30-39), a eksperimentalnih skupina (s karijesom) 31 (IQR 24 – 35). Iako je razlika u medijanima mala, imala je utjecaj na predikciju u ovom slučaju zbog odabira ispitanika prema prisutnosti (za eksperimentalne skupine) ili odsutnosti karijesa (za kontrolnu skupinu).

Unatoč tomu što smo znali da opis uzorka može utjecati na ovu analizu, napravili smo testiranje jer su Bernabe E i Sheiham A 2014. napravili studiju u kojoj su analizirali podatke o dentalnom statusu u Engleskoj i Walesu, Japanu, Švedskoj i Sjedinjenim Američkim Državama od 1960. godine do 2011. u odnosu na dob ispitanika (288). Iz studije su opazili kako porast dobi dosta utječe na prevalenciju karijesa, tako da incidencija karijesa raste do adolescencije te nakon toga raste još u odrasloj dobi, a među najstarijima incidencija karijesa opada.

5.4.3. Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini kao potencijalni biljeg prisutnosti karijesa

Istraživanja o receptoru CD14 su u malo više od 20 godina dosta pokazala o receptoru, od prvotnoga saznanja o njegovoj prisutnosti na površini monocita/makrofaga do danas (98). Prepoznaje se i u aktivaciji receptora TLRs (98). Dugo se držalo da je izražen samo na mijeloidnim stanicama, međutim pokazalo se da je izražen i na stanicama drugih tkiva, kao endotelu, epitelu, glatkim mišićima, stanicama otočića gušterače, fibroblastima i spermatozoama (98), koja na taj način sudjeluju u imunosnom odgovoru domaćina, ne samo na LPS, nego i na ostale mikrobiološke komponente koje receptor prepoznaje (lipoteična kiselina, topivi peptidoglikani i muramilpeptidi, fragmenti stijenke bakterija…) (292). Najbolji primjer tkiva koje je konstantno u doticaju s niskim razinama LPS je epitel usta, ždrijela i pluća te se tako drži da su alveolarni makrofagi hiposenzitivni na utjecaj LPS (98). Također, i žlijezde

slinovnice konstantno luče receptor CD14 u slinu kao imunosni odgovor na prisutnost LPS (293).

Iako je već prije utvrđena njegova uloga kod sistemskih bolesti (293), funkcija sCD14 u slini još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra da je upravo taj receptor važan za očuvanje oralnoga zdravlja (27). Jedni autori smatraju da je pad koncentracije sCD14 u slini upravo rezultat prisutnosti karijesa, kao njegove preventivne uloge u nastanku karijesa (293), dok drugi smatraju da je njegova povećana koncentracija odgovor imunosnoga sustava na prisutnost karijesa (133).

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da je srednji ili nizak puferski kapacitet stimulirane sline statistički značajan prediktor pojave karijesa. Također, rezultati ovoga rada pokazuju da je i povećana koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini prediktor pojave karijesa. S obzirom na to da nemaju svi ispitanici eksperimentalnih skupina srednji ili nizak puferski kapacitet (njih 53,3 %), a ipak imaju karijes, držimo da puferski kapacitet sline nije pouzdan biljeg za pojavu karijesa. Stoga se provodila daljnja analiza pouzdanosti predikcije sCD14 u nestimuliranoj slini. Prema tim mjerenjima se konstruirala ROC krivulja (engl. *Receiver operating characteristic*) kako bi odredili prediktivnu točnost receptora sCD14 u slini kao potencijalnoga biljega za prisutnost karijesa. Ona nam je poslužila za određivanje osjetljivosti i specifičnosti sCD14 u slini za dijagnozu karijesa u optimalnom omjeru. Točnost predikcije je iznosila 0,70 i pokazala se statistički značajnom ($p = 0,002$). Daljnjom analizom određena je ukupna točnost određivanja osoba prema koncentraciji sCD14 u nestimuliranoj slini na one s karijesom i one bez te je ta točnost iznosila ukupno 65 %. Rezultati ovoga rada pokazali su da je koncentracija sCD14 $\geq$ 182,9 (indikativna koncentracija) preko 1,5 puta vjerojatnija kod ispitanika s karijesom, nego kod ispitanika bez karijesa. Prema rezultatima ovoga istraživanja možemo zaključiti da bi salivarni sCD14 mogao biti potencijalni biljeg za karijes.

Klinička primjena određivanja koncentracije sCD14 kao potencijalnoga biljega i prediktora upale kod karijesa trebala bi se dalje ispitati. Osobitu pozornost treba usmjeriti na uzorkovanje sline, tj. na predanalitički dio obrade uzorka sline.

5.5. Ograničenja istraživanja

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja. Premda je veličina uzorka od 30 mjerenja generalno prihvaćena kao mali uzorak i primjenjuje se kod biomedicinskih istraživanja (294), držimo da bi veći uzorak dao preciznije rezultate mjerenja s obzirom na varijacije u produkciji sline tijekom vremena, a kod istoga ispitanika (50). Podatci za pH-vrijednosti nestimulirane sline nisu prikupljeni za preko polovice sudionika svake skupine sudionika budući da količina sline nije bila dovoljna za njegovo određivanje. Zbog toga ova varijabla nije mogla biti razmatrana u multivarijantnom prediktivnom modelu. Međutim, pH-vrijednost nestimulirane kao ni stimulirane sline nije bila statistički značajno povezana s koncentracijom sCD14 ni s pojavom karijesa, stoga, pod pretpostavkom da vrijednosti koje nisu izmjerene nisu povezane niti s jednom za ishod važnom varijablom, rezultati provedenoga istraživanja ovime nisu u većoj mjeri narušeni. Još jedan potencijalni nedostatak odnosi se na činjenicu da su uzorci sline zamrznuti prije analize pH-vrijednosti, što je moglo utjecati na izmjerene pH-vrijednosti. Međutim, na dodatnom uzorku sline koji smo analizirali kod ukupno 30 ispitanika utvrđeno je da se pH-vrijednosti sline izmjerene različitim metodama međusobno statistički značajno ne razlikuju, a pH-vrijednosti izmjerene različitim metodama u pojedinoj skupini ispitanika uspoređene su Friedmanovim testom te između pH-vrijednosti dobivenih trima mjerama nije utvrđena statistički značajna razlika ni u skupini ispitanika bez karijesa ($\chi^2 = 0,17$; ss = 2; p = 0,920), ni u skupini ispitanika s karijesom ($\chi^2 = 0,98$; ss = 2; p = 0,614). Stoga ovime valjanost dobivenih zaključaka nije narušena u većoj mjeri.

Poznato je da cirkardijalni ritam utječe na sekreciju sline i na koncentraciju nekih njezinih komponenti (295). U ovom radu nismo istražili dnevne varijacije koncentracije sCD14 u uzorcima sline (primjerice, uzorak sline prikupljen ujutro i poslijepodne). Međutim, pokušali smo ipak izbjeći utjecaj doba dana na mjerenja, prikupljajući uzorke sline svim ispitanicima u isto vrijeme, ujutro (9 – 11 sati).

Držimo da bi praćenje istih ispitanika nakon sanacije karijesa i shodno tomu ponovna mjerenja koncentracije receptora sCD14 u slini također dao bolji uvid u „ponašanje“ ovoga receptora na prisutnost / odsutnost karijesa, s obzirom na pad ili porast koncentracije i brzinu promjena tih koncentracija.

Nasuprot tomu, ELISA metoda je pouzdana metoda za određivanje koncentracije sCD14 u slini, ali je njezin nedostatak relativno visoka cijena komercijalnoga testa, kvalificirano osoblje za izvođenje testa te potrebna laboratorijska oprema.

6. ZAKLJUČCI

Iz ovoga istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Medijan koncentracije sCD14 (ng/mL) u nestimuliranoj slini je statistički značajno veći ($p = 0,007$) kod ispitanika s karijesom (medijan E1 = 198,0 i E2 = 210,9), nego kod ispitanika bez karijesa (178,4).
2. Prevalencija karijesa i koncentracija sCD14 pokazale su pozitivnu korelaciju, odnosno s većim brojem karijesa, rasla je i koncentracija sCD14 u slini.
3. Osjetljivost receptora sCD14 u nestimuliranoj slini za prepoznavanje karijesa iznosi 68 %, dok specifičnost iznosi 57 % te su obje mjere u optimalnom omjeru pri koncentraciji sCD14 od 182,9. Prediktivna vrijednost koncentracije sCD14 u nestimuliranoj slini (površina ispod ROC krivulje = 0,70) za pojavu karijesa bila je statistički značajna ($p = 0,002$). Ispitanici s koncentracijom sCD14 u nestimuliranoj slini $\geq$ 182,9 imaju preko pet puta veće izglede za pojavu karijesa, u odnosu na ispitanike čija je koncentracija manja.
4. Ukupna točnost, odnosno mogućnost klasifikacije ispitanika na one s karijesom i one bez karijesa prema koncentraciji sCD14 u nestimuliranoj slini, iznosi 65 %.
5. Ispitanici s karijesom (E1 i E2 skupina) imali su značajno manji protok nestimulirane / stimulirane sline od kontrole. Hiposalivacija je utvrđena samo kod osoba s karijesom.
6. Ispitanici sa srednjim (pH 4.5 – 5.5) ili niskim (pH < 4.5) puferskim kapacitetom imaju preko četiri puta veće izglede za pojavu karijesa u odnosu na ispitanike s visokim puferskim kapacitetom (pH > 5.5).
7. Koncentracija sCD14 u nestimuliranoj slini i puferski kapacitet stimulirane sline statistički su značajni prediktori pojave karijesa ($p < 0,001$).
8. Ispitanici E2 skupine, koji imaju karijes lokaliziran u postkaninom području, imaju statistički značajno veću koncentraciju receptora sCD14 u nestimuliranoj slini ($p = 0,003$) u odnosu na ispitanike kontrolne skupine, nego ispitanici E1 skupine.

9. Nisu utvrđene statistički značajne povezanosti između koncentracije receptora sCD14 u nestimuliranoj slini i jačine demineralizacije karijesnih promjena izmjerene DDPen uređajem na različitim lokalizacijama u zubalu.

7. POPIS LITERATURE

1. Flink H, Tegelberg Å, Lagerlöf F. Influence of the time of measurement of unstimulated human whole saliva on the diagnosis of hyposalivation. Arch Oral Biol. 2005 Jun 1;50(6):553–9.
2. Larsen MJ, Jensen AF, Madsen DM, Pearce EIF. Individual variations of pH, buffer capacity, and concentrations of calcium and phosphate in unstimulated whole saliva. Arch Oral Biol. 1999 Feb;44(2):111–7.
3. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: Apical periodontitis and periodontal disease. J Dent Res. 2007;86(4):306–19.
4. Zhao A, Blackburn C, Chin J, Srinivasan M. Soluble toll like receptor 2 (TLR-2) is increased in saliva of children with dental caries. BMC Oral Health. 2014 Aug 31;14(1):108.
5. Syndergaard B, Al-Sabbagh M, Kryscio RJ, Xi J, Ding X, Ebersole JL, et al. Salivary Biomarkers Associated With Gingivitis and Response to Therapy. J Periodontol. 2014 Aug;85(8):295–303.
6. Gornowicz A, Bielawska A, Bielawski K, Grabowska SZ, Wójcicka A, Zalewska M, et al. Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease. Ann Agric Environ Med. 2012;19(4):711–6.
7. Banderas-Tarabay JA, Zacarías-D'Oleire IG, Garduño-Estrada R, Aceves-Luna E, González-Begné M. Electrophoretic analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental students. Arch Med Res. 2002;33(5):499–505.
8. Dodds MWJ, Johnson DA, Mobley CC, Hattaway KM. Parotid saliva protein profiles in caries-free and caries-active adults. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997 Feb;83(2):244–51.
9. Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD14 Is an Acute-Phase Protein. J Immunol. 2004;172(7):4470–9.
10. Felizardo K, Gonçalves R, Schwarcz W, Poli-Frederico R, Maciel S, Andrade F. An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme and

their association with caries experience and activity. Rev Odonto Ciência. 2010;25(4):344–9.

11. Sikorska MHJ, Mielnik-Blaszczak M, Kapeć E. The relationship between the levels of SigA, lactoferrin and $α$1proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. Oral Microbiol Immunol. 2002;17(5):272–6.

12. Stuchell RN, Mandel ID. A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adults. J Dent Res. 1983;62(5):552–4.

13. Kirstila V, Hakkinen P, Jentsch H, Vilja P, Tenovuo J. Longitudinal analysis of the association of human salivary antimicrobial agents with caries increment and cariogenic micro-organisms: A two year cohort study. J Dent Res. 1998;77(1):73–80.

14. Tar I, Nemes E, Nemes J, Alberth M, Keszthelyi G. The role of salivary immunoglobulins (secretory IgA, IgM, IgG) in caries prevalence and primary B-cell deficiency. Fogorv Sz. 1999;92(11):331–8.

15. Edgerton M, Koshlukova SE. Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. Adv Dent Res. 2000;14:16–21.

16. Gusman H, Travis J, Helmerhorst EJ, Potempa J, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. Infect Immun. 2001;69(3):1402–8.

17. Weyna E, Jaworska D, Dabrowski W, Strzelecka G. Zahnkaries, Parodontopathien und Speichelimmunglobuline. Stomatol DDR. 1979;29(5):353–6.

18. Bruno B, Pezzini A, Menegazzi M. Livelli salivari di immunoglobuline e carie dentale in eta' infantile. Boll Soc Ital Biol Sper. 1985;61(3):381–6.

19. Moslemi M, Sattari M, Kooshki F, Fotuhi F, Modarresi N, Khalili Sadrabad Z, et al. Relationship of Salivary Lactoferrin and Lysozyme Concentrations with Early Childhood Caries. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2015;9(2):109–14.

20. Malekafzali B, Sattari M, Keyvanfar S. Correlation between Salivary Toll Like Receptor-2 Concentration and Early Childhood Caries. Iran J Immunol. 2014;11(3):110–6.

21. de Farias DG, Bezerra ACB. Salivary antibodies, amylase and protein from children with

early childhood caries. Clin Oral Investig. 2003;7(3):154–7.

22. Kuriakose S, Sundaresan C, Mathai V, Khosla E, Gaffoor FMA. A comparative study of salivary buffering capacity, flow rate, resting pH, and salivary Immunoglobulin A in children with rampant caries and caries-resistant children. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2013;31(2):69–73.

23. Ranadheer E, Reddy Nv, Nayak U, Rao VaP. The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2011;29(2):106.

24. Chawda JG, Chaduvula N, Patel HR, Jain SS, Lala AK. Salivary SIgA and dental caries activity. Indian Pediatr. 2011;48(9):719–21.

25. Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro G. Salivary proteins as a biomarker for dental caries - a systematic review. J Dent. 2013;41(1):2–8.

26. Lein E, Ingalls RR. Toll-like receptors. Crit Care Med 1. 2002;30 SRC-:1–11.

27. Bergandi L, Defabianis P, Re F, Preti G, Aldieri E, Garetto S, et al. Absence of soluble CD14 in saliva of young patients with dental caries. Eur J Oral Sci. 2007;115(2):93–6.

28. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins J V. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. J Endotoxin Res. 2006;12(4):205–23.

29. Hahn C Lo, Liewehr FR. Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. J Endod. 2007;33(3):213–9.

30. Isaza-Guzmán DM, Aristizábal-Cardona D, Martínez-Pabón MC, Velásquez-Echeverri H, Tobón-Arroyave SI. Estimation of sCD14 levels in saliva obtained from patients with various periodontal conditions. Oral Dis. 2008;14(5):450–6.

31. Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H. Innate immune responses in oral mucosa. J Endotoxin Res. 2002;8(6):465–8.

32. Uitto VJ. Gingival crevice fluid - An introduction. Periodontol 2000. 2003;31:9–11.

33. Šutalo J. Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva. Zadro; 1994. 538 p.

34. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW. Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. Clin Microbiol Rev. 2013 Oct;26(4):781–91.

35. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. Br Dent J. 1992;172(8):305–12.

36. Llena-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11(5):449–55.

37. Renke W. Saliva and dental caries. Dent Caries Princ Manag. 2016;43(4):59–69.

38. Fejerskov O, Kidd E. Zubni karijes. 2. izdanje. Zagreb: Naklada Slap; 2011. 640 p.

39. Schubert MM, Izutsu KT. Iatrogenic Causes of Salivary Gland Dysfunction. J Dent Res. 1987;66(1):680–8.

40. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb; 2003.

41. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva - A review. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(2):197–212.

42. Dobrijević TT. Karijesne i erozivne lezije zuba u alkoholičara. Magistarski rad, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2002.

43. Navazesh M, Christensen CM. A Comparison of Whole Mouth Resting and Stimulated Salivary Measurement Procedures. J Dent Res. 1982 Oct 8;61(10):1158–62.

44. Bardow A, Ten Cate JM, Nauntofte B, Nyvad B. Effect of unstimulated saliva flow rate on experimental root caries. Caries Res. 2003;37(3):232–6.

45. Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. Community Dent Oral Epidemiol. 1997 Feb;25(1):82–6.

46. Silberring J, Ciborowski P. Biomarker discovery and clinical proteomics. TrAC - Trends Anal Chem. 2010 Feb;29(2):128–40.

47. Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salamán CR. Biomarker discovery and validation: Technologies and integrative approaches. Trends Biotechnol. 2004 Aug;22(8):411–6.

48. Wagner PD, Verma M, Srivastava S. Challenges for biomarkers in cancer detection. Ann N Y Acad Sci. 2004 Jun;1022(1):9–16.

49. Kurian S, Grigoryev Y, Head S, Campbell D, Mondala T, Salomon DR. Applying genomics to organ transplantation medicine in both discovery and validation of biomarkers. Int Immunopharmacol. 2007 Dec 20;7(14):1948–60.

50. Bansode P V, Pathak SD, Wavdhane MB, Birage PP. Salivary Biomarkers of Dental Caries-A Review Article. IOSR J Dent Med Sci e-ISSN. 2018;17(3):12–8.

51. Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. Arch Oral Biol. 2014 Jun;59(6):631–8.

52. Hara AT, Zero DT. The Potential of Saliva in Protecting against Dental Erosion. Erosive Tooth Wear From Diagnosis to Ther. 2012;25:197–205.

53. Zero DT, Lussi A. Erosion - Chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. Int Dent J. 2005;55(4 SUPPL. 1):285–90.

54. Buzalaf MAR, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. J Appl Oral Sci. 2012;20(5):493–502.

55. Fox PC. Acquired salivary dysfunction - Drugs and radiation. Ann N Y Acad Sci. 1998 Apr 15;842:132–7.

56. von Bültzingslöwen I, Sollecito TP, Fox PC, Daniels T, Jonsson R, Lockhart PB, et al. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2007 Mar;103(SUPPL.):57–65.

57. Navazesh M, Christensen C, Brightman V. Clinical Criteria for the Diagnosis of Salivary Gland Hypofunction. J Dent Res. 1992 Jul 8;71(7):1363–9.

58. Owens BM. The potential effects of pH and buffering capacity on dental erosion. Gen Dent. 2007;55(6):527–31.

59. Mira A, Artacho A, Camelo-Castillo A, Garcia-Esteban S, Simon-Soro A. Salivary Immune and Metabolic Marker Analysis (SIMMA): A Diagnostic Test to Predict Caries Risk. Diagnostics. 2017 Jun 27;7(3):38.

60. Kitasako Y, Burrow MF, Stacey M, Huq L, Reynolds EC, Tagami J. Comparative analysis of three commercial saliva testing kits with a standard saliva buffering test. Aust Dent J. 2008 Jun;53(2):140–4.

61. Elkwatehy WM, Salama RI. Cariogram and Oratest in Caries Risk Assessment for. J Oral Biol. 2018;5(1):1–6.

62. Kolenbrander PE. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth

on saliva as sole nutritional source. Int J Oral Sci. 2011;3(2):49–54.

63. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. J Clin Periodontol. 2003;30(7):644–54.

64. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. Appl Environ Microbiol. 2006;72(4):2837–48.

65. Suvin M. Biološki temelji-totalna proteza. Zagreb: Školska knjiga; 1963.

66. Stelzner A. Oral Microbiology and Immunology. J Basic Microbiol. 1994;30(5):382.

67. Cook TJ. Oral microbiology and infectious disease. Vol. 16, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology. Baltimore; London: Williams & Wilkins; 1963. 894 p.

68. Jakubovics NS. Oral microbiology. Encyclopedia of Microbiology. Oxford: Wright; 2019. 329–357 p.

69. Ivanković L. Utjecaj mobilnih proteza na promjenu mikrobne flore usne šupljine ovisno o materijalu. Magistarski rad, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2003.

70. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson E, Lau CN, Levanos V a, et al. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. J Bacteriol. 2001;183(12):3770–83.

71. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. J Dent Res. 2003;82(5):338–44.

72. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. Caries Res. 2011;45(1):69–86.

73. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. Int J Oral Sci. 2017 Nov 10;9(11):1.

74. Laputková G, Schwartzová V, Bánovčin J, Alexovič M, Sabo J. Salivary protein roles in oral health and as predictors of caries risk. Open Life Sci. 2018 May 18;13(1):174–200.

75. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. Adv Dent Res. 2000 Dec;14(1):40–7.

76. Rudney JD. Saliva and dental plaque. Adv Dent Res. 2000;14:29–39.

77. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85(2):162–9.

78. Rudney JD. Relationships between human parotid saliva lysozyme lactoferrin, salivary peroxidase and secretory immunoglobulin A in a large sample population. Arch Oral Biol. 1989;34(7):499–506.

79. Gråhn E, Tenovuo J, Lehtonen OP, Eerola E, Vilja P. Antimicrobial systems of human whole saliva in relation to dental caries, cariogenic bacteria, and gingival inflammation in Young adults. Acta Odontol Scand. 1988;46(2):67–74.

80. Jenssen H, Hancock REW. Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie. 2009;91(1):19–29.

81. Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. Adv Dent Res. 2012 Sep 16;24(2):72–6.

82. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MAR. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion *in situ*. J Dent Res. 2010 May 3;89(5):468–72.

83. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res. 2006 Jan 11;85(1):22–32.

84. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. Vol. 70, Periodontology 2000. 2016. p. 11–25.

85. Aurer A, Jorgić-Srdjak K, Plančak D, Stavljenić-Rukavina A, Aurer-Koželj J. Proinflammatory factors in saliva as possible markers for periodontal disease. Coll Antropol. 2005 Dec;29(2):435–9.

86. Zhou J, Yao Y, Jiao K, Zhang J, Zheng X, Wu F, et al. Relationship between gingival crevicular fluid microbiota and cytokine profile in periodontal host homeostasis. Front Microbiol. 2017;8(NOV):21–44.

87. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilahti J, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival creviclular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. Vol. 70, Periodontology 2000. 2016. p. 142–63.

88. Salminen A, Gursoy UK, Paju S, Hyvärinen K, Mäntylä P, Könönen E, et al. Salivary

biomarkers of bacterial burden, inflammatory response, and tissue destruction in periodontitis. J Clin Periodontol. 2014 May 1;41(5):442–50.

89. Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci. 2005 Feb;113(1):2–13.

90. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components *in vivo* human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. J Proteome Res. 2007 Jun;6(6):2152–60.

91. Hannig M, Balz M. Influence of *in vivo* Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion. Caries Res. 1999;33(5):372–9.

92. Glantz PO, Baier RE, Christersson CE. Biochemical and physiological considerations for modeling biofilms in the oral cavity: A review. Dent Mater. 1996 May;12(3):208–14.

93. Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an *in situ* pilot study. Clin Oral Investig. 2003 Sep 26;7(3):158–61.

94. Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges *in situ*. J Dent Res. 2006 Jul 20;85(7):612–6.

95. Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhães AC, Sener B, Attin T. Impact of the *in situ* formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. Acta Odontol Scand. 2008 Jan 2;66(4):225–30.

96. Prester L, Protrka N, Macan J, Katunarić M. Salivary sCD14 as a potential biomarker of dental caries activity in adults. Arh Hig Rada Toksikol. 2017;68(4):315–21.

97. Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Jeffery S, Kaski JC. CD14 and toll-like receptor 4: A link between infection and acute coronary events? Heart. 2004 Sep;90(9):983–8.

98. Jersmann HP. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. Immunol Cell Biol. 2005;83(5):462–7.

99. Zhou J, Ouyang X, Cui X, Schoeb TR, Smythies LE, Johnson MR, et al. Renal CD14 expression correlates with the progression of cystic kidney disease. Kidney Int. 2010

Sep;78(6):550–60.

100. Kirkland TN, Viriyakosol S. Structure-function analysis of soluble and membrane-bound CD14. Prog Clin Biol Res. 1998;397:79–87.

101. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bažil V, Espevik T, et al. Soluble cd14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. J Exp Med. 1992;176(6):1665–71.

102. Funda DP, Tučková L, Farré MA, Iwase T, Moro I, Tlaskalová-Hogenová H. CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells *in vitro*: Lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. Infect Immun. 2001;69(6):3772–81.

103. Labeta MO, Vidal K, Nores JE, Arias M, Vita N, Morgan BP, et al. Innate recognition of bacteria in human milk is mediated by a milk-derived highly expressed pattern recognition receptor, soluble CD14. J Exp Med. 2000;191(10):1807–12.

104. Kelley SL, Lukk T, Nair SK, Tapping RI. The Crystal Structure of Human Soluble CD14 Reveals a Bent Solenoid with a Hydrophobic Amino-Terminal Pocket. J Immunol. 2013 Feb 1;190(3):1304–11.

105. Nakata T, Yasuda M, Fujita M, Kataoka H, Kiura K, Sano H, et al. CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex. Cell Microbiol. 2006 Dec;8(12):1899–909.

106. Topkas E, Keith P, Dimeski G, Cooper-White J, Punyadeera C. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of proteins. Clin Chim Acta. 2012;413(13–14):1066–70.

107. Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, et al. Severe impairment of interleukin-1 and toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. Nature. 2002 Apr;416(6882):750–4.

108. Kitchens RL. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. Chem Immunol. 1999;74:61–82.

109. Tapping RI, Tobias PS. Soluble CD44-mediated cellular responses to

lipopolysaccharide. Chem Immunol. 1999;74:108–21.

110. Thomas CJ, Kapoor M, Sharma S, Bausinger H, Zyilan U, Lipsker D, et al. Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. FEBS Lett. 2002;531(2):184–8.

111. Yu B, Wright SD. LPS-dependent interaction of Mac-2-binding protein with immobilized CD14. J Inflamm. 1995;45(2):115–25.

112. Flies A, Ph D, Ermak TH, Ph D. Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) as an Indicator of Disease States in Multiple Species. Cell Sciences Inc.; 2016. p. 13–6.

113. Andreis I, Taradi M. Imunologija. In: Imunologija. 6th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. p. 1–3.

114. Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. J Biol Chem. 1995 May 5;270(18):10482–8.

115. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. J Exp Med. 1994 Jan 1;179(1):269–77.

116. Patra MC, Kwon HK, Batool M, Choi S. Computational insight into the structural organization of full-length toll-like receptor 4 Dimer in a model Phospholipid Bilayer. Front Immunol. 2018;9(MAR):489.

117. Miguel RN, Wong J, Westoll JF, Brooks HJ, O'Neill LAJ, Gay NJ, et al. A dimer of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. Klefstrom J, editor. PLoS One. 2007 Aug 29;2(8):788.

118. Zanoni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. Front Cell Infect Microbiol. 2013;4(JUL):32.

119. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal. 2001;13(2):85–94.

120. Grunwald U, Fan X, Jack RS, Workalemahu G, Kallies A, Stelter F, et al. Monocytes can phagocytose Gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism. J Immunol. 1996 Nov 1;157(9):4119–25.

121. Jack RS, Grunwald U, Stelter F, Workalemahu G, Schütt C. Both membrane-bound and soluble forms of CD14 bind to Gram-negative bacteria. Eur J Immunol. 1995 May;25(5):1436–41.

122. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, et al. Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes. J Immunol. 2001 Nov 15;167(10):5887–94.

123. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-β. Nat Immunol. 2008 Apr 24;9(4):361–8.

124. Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. Nat Immunol. 2005 May 15;6(6):565–70.

125. Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. Curr Biol. 2011;21(13):488–93.

126. Kirschning CJ, Schumann RR. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. Curr Top Microbiol Immunol. 2002;270:121–44.

127. Moreillon P, Majcherczyk PA. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from Gram-positive bacteria. Scand J Infect Dis. 2003;35(9):632–41.

128. Hong SW, Baik JE, Kang SS, Yun CH, Seo DG, Han SH. Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans* interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. Mol Immunol. 2014;57(2):284–91.

129. Charadram N, Farahani RM, Harty D, Rathsam C, Swain M V, Hunter N. Regulation of reactionary dentin formation by odontoblasts in response to polymicrobial invasion of dentin matrix. Bone. 2012;50(1):265–75.

130. Zunt SL, Burton L V, Goldblatt LI, Dobbins EE, Srinivasan M. Soluble forms of Toll-like receptor 4 are present in human saliva and modulate tumour necrosis factor-alpha secretion by macrophage-like cells. Clin Exp Immunol. 2009;156(2):285–93.

131. Srinivasan M, Kodumudi KN, Zunt SL. Soluble CD14 and toll-like receptor-2 are

potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome. Clin Immunol. 2008;126(1):31–7.

132. Jin L, Darveau RP. Soluble CD 14 Levels in Ginigival Crevicular Fluid of Subjects With Untreated Adult Periodontitis. J Periodontol. 2001;72(5):634–40.

133. Biria M, Sattari M, Golpayegani MV, Kooshki F. Association of salivary sCD14 concentration levels with early childhood caries. Iran J Immunol. 2010;7(3):193–7.

134. Viriyakosol S, Kirkland TN. The N-terminal half of membrane CD14 is a functional cellular lipopolysaccharide receptor. Infect Immun. 1996;64(2):653–6.

135. Takeshita K, Tsujimoto H, Kawamura Y, Kawase H, Sekine I NS. Increased levels of circulating soluble CD14 in Kawasaki disease. Clin Exp Immunol. 2000;119(2):376–81.

136. Wüthrich B, KÄgi MK, Joller-Jemelka H. Soluble CD14 but not interleukin-6 is a new marker for clinical activity in atopic dermatitis. Arch Dermatol Res. 1992;284(6):339–42.

137. Oesterreicher C, Pfeffel F, Petermann D, Müller C. Increased *in vitro* production and serum levels of the soluble lipopolysaccharide receptor sCD14 in liver disease. J Hepatol. 1995;23(4):396–402.

138. Horneff G, Sack U, Kalden JR, Emmrich F, Burmester GR. Reduction of monocyte-macrophage activation markers upon anti-CD4 treatment. Decreased levels of IL-1, IL-6, neopterin and soluble CD14 in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 1993;91(2):207–13.

139. Uehara A, Sugawara S, Watanabe K, Echigo S, Sato M, Yamaguchi T, et al. Constitutive Expression of a Bacterial Pattern Recognition Receptor, CD14, in Human Salivary Glands and Secretion as a Soluble Form in Saliva (Retraction of vol 10, pg 286, 2003). Clin Vaccine Immunol. 2010;17(4):698.

140. Takayama A, Satoh A, Ngai T, Nishimura T, Ikawa K, Matsuyama T, et al. Augmentation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of human oral epithelial cells and up-regulation of interleukin-8 production by saliva CD14. Infect Immun. 2003;71(10):5598–604.

141. Feghali K, Tanabe S, Grenier D. Soluble CD14 induces cytokine release by human oral

epithelial cells. J Periodontal Res. 2011;46(1):147–52.

142. Boraas JC, Messer LB, Till MJ. A Genetic Contribution to Dental Caries, Occlusion, and Morphology as Demonstrated by Twins Reared Apart. J Dent Res. 1988;67(9):1150–5.

143. Simeon P. Eksperimentalna prosudba ručnog propuštanja cerviksnih ispuna. Magistarski rad, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 1998.

144. Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process. Aust Dent J. 2008;53(3):286–91.

145. Gray CH, Nicholson DC. Pathways of Bile Pigment Metabolism. Ann N Y Acad Sci. 1963;111(1):281–9.

146. Tatevossian A, Newbrun E. Diffusion of small ionic species in human saliva, plaque fluid and plaque residue *in vitro.* Arch Oral Biol. 1983;28(2):109–15.

147. Margolis HC, Moreno EC, Murphy BJ. Importance of High pKA Acids in Cariogenic Potential of Plaque. J Dent Res. 1985;64(5):786–92.

148. Bibby BG, Fu J. Changes in Plaque pH *in vitro* by Sweeteners. J Dent Res. 1985;64(9):1130–3.

149. Dukić W, Dobrljević TT, Katunarić M, Milardović S, Segovlć S. Erosive lesions in patients with alcoholism. J Am Dent Assoc. 2010 Dec 6;141(12):1452–8.

150. Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. Eur J Oral Sci. 1996;104(2 (Pt 2)):199–206.

151. Featherstone JD, Glena R, Shariati M, Shields CP. Dependence of *in vitro* demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. J Dent Res. 1990;69 Spec No(1983):620–36.

152. Caufield PW, Childers NK, Allen DN, Hansen JB. Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. Infect Immun. 1985;48(1):51–6.

153. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50(4):353–80.

154. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. Community Dent Oral Epidemiol. 1999;27(1):31–40.

155. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. J Am Dent Assoc. 2000;131(7):887–99.

156. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. J Am Dent Assoc. 1989;119(2):298–304.

157. Mandel ID. Relation of Saliva and Plaque to Caries. J Dent Res. 1974;53(2):246–66.

158. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res. 1994;8(2):263–71.

159. Ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. Caries Res. 1982;16(3):201–10.

160. Ten Cate JM, Featherstone JDB. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. Crit Rev Oral Biol Med. 1991;2(3):283–96.

161. Berkowitz RJ. Acquisition and transmission of mutans streptococci. J Calif Dent Assoc. 2003;31(2):135–8.

162. Berkowitz RJ, Jordan H V. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. Arch Oral Biol. 1975;20(11):725–30.

163. Berkowitz RJ, Jordan H V., White G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. Arch Oral Biol. 1975;20(3):171–4.

164. Black G, Black A. The technical procedures in filling teeth. Vol. 2, Medico Dental Publishing Company. Ohio: Medico-dental publishing Company; 1917. 766 p.

165. Mount GJ. A new paradigm for operative dentistry. Aust Dent J. 2007;52(4):264–70.

166. Singh M, Papas A, Vollmer W, Bader J, Laws R, Maupome G, et al. Predictors of coronal caries progression in adults: Results from the Prevention of Adult Caries Study. Community Dent Oral Epidemiol. 2013;41(6):558–64.

167. Mount GJ, Tyas MJ, Duke ES, Lasfargues JJ, Kaleka R, Hume WR. A proposal for a new classification of lesions of exposed tooth surfaces. Int Dent J. 2006;56(2):82–91.

168. Ekstrand KR, Ricketts DN, Kidd EA. Occlusal caries: pathology, diagnosis and logical management. Dent Update. 2001;28(8):380–7.

169. Bozdemir E, Aktan AM, Ozsevik A, Sirin Kararslan E, Ciftci ME, Cebe MA.

Comparison of different caries detectors for approximal caries detection. J Dent Sci. 2016;11(3):293–8.

170. Soderholm KJ. The impact of recent changes in the epidemiology of dental caries on guidelines for the use of dental sealants: clinical perspectives. J Public Health Dent. 1995;55(5 Spec No):302–11.

171. Siegal MD, Kumar J V. Workshop on Guidelines for Sealant Use: Preface. J Public Health Dent. 1995;55(5):261–2.

172. Ekstrand KR, Ricketts DN, Kidd EA. Reproducibility and accuracy of three methods for assessment of demineralization depth of the occlusal surface: an *in vitro* examination. Caries Res. 1997;31:224–31.

173. Takamori K, Hokari N, Okumura Y, Watanabe S. Detection of Occlusal Caries under Sealants by Use of a Laser Fluorescence System. J Clin Laser Med Surg. 2001;19(5):267–71.

174. De Souza JF, Diniz MB, Boldieri T, Rodrigues JA, Lussi A, De Cássia Loiola Cordeiro R. *In vitro* performance of a pen-type laser fluorescence device and bitewing radiographs for approximal caries detection in permanent and primary teeth. Indian J Dent Res. 2014;25(6):702–10.

175. Shi XQ, Welander U, Angmar-Mansson B. Occlusal caries detection with Kavo DIAGNOdent and Radiography:An *in vitro* comparison. Caries Res. 2000;34(2):151–8.

176. Verdonschot EH, Bronkhorst EM, Wenzel A. Approximal caries diagnosis using fiber-optic transillumination: a mathematical adjustment to improve validity. Community Dent Oral Epidemiol. 1991 Dec;19(6):329–32.

177. Verdonschot EH, Bronkhorst EM, Burgersdijk RCW, König KG, Schaeken MJM, Truin GJ. Performance of some diagnostic systems in examinations for small occlusal carious lesions. Caries Res. 1992;26(1):59–64.

178. Flaitz CM, Hicks MJ, Silverstone LM. Radiographic, histologic, and electronic comparison of occlusal caries: an *in vitro* study. Pediatr Dent. 1986;8(1):24–8.

179. Rock WP, Kidd EA. The electronic detection of demineralisation in occlusal fissures. Br Dent J. 1988;164(8):243–7.

180. Carvalho TS, Baumann T, Lussi A. A new hand-held optical reflectometer to measure enamel erosion: Correlation with surface hardness and calcium release. Sci Rep. 2016 Jul 28;6(1):252–9.

181. Darby ET. Dental erosion and gouty diathesis: Are they usually associated. Dent Cosm. 1892;34:629–40.

182. Miller WD. Experiments and observations on the wasting of tooth tissue variously designated as erosion, abrasion, chemical abrasion, denudation, etc. Dent Cosm. 1907;49:1–23.

183. Dugmore CR, Rock WP. A multifactorial analysis of factors associated with dental erosion. Br Dent J. 2004;196(5):283–6.

184. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. Caries Res. 2004;38:34–44.

185. Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: Diagnosis, risk factors and prevention. Am J Dent. 2006;19(6):319–25.

186. Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. Monogr Oral Sci. 2006;20:88–99.

187. Zero DT, Lussi A. Behavioral factors. Monogr Oral Sci. 2006;20:100–5.

188. Lussi A, Jaeggi T. Dental erosion in children. Monogr oral Sci. 2006;20:140–51.

189. Levine RS. Fruit juice erosion-an increasing danger? J Dent. 1973;2(2):85–8.

190. Allan D. Dental erosion from vomiting. A case report. Br Dent J. 1969;126(7):311–2.

191. Järvinen V, Meurman JH, Hyvärinen H, Rytömaa I, Murtomaa H. Dental erosion and upper gastrointestinal disorders. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol. 1988;65(3):298–303.

192. Jensdottir T, Arnadottir IB, Thorsdottir I, Bardow A, Gudmundsson K, Theodors A, et al. Relationship between dental erosion, soft drink consumption, and gastroesophageal reflux among Icelanders. Clin Oral Investig. 2004;8(2):91–6.

193. Rush E, Schulz S, Obolonkin V, Simmons D, Plank L. Are energy drinks contributing to the obesity epidemic? Asia Pac J Clin Nutr. 2006;15(2):242–4.

194. Sugawara S. Host Defense of Oral Mucosa and the Molecular Mechanism of Oral

Mucosal Signal Transduction Diseases. J Oral Biosci. 2005;47(2):115–25.

195. Robb ND, Smith BG. Prevalence of pathological tooth wear in patients with chronic alcoholism. Br Dent J. 1990;169(11):367–9.

196. Krutchkoff DJ, Eisenberg E, O'Brien JE, Ponzillo JJ. Zidovudine Overdose in a Child. N Engl J Med. 1990 Feb 8;322(6):408–9.

197. Howden GF. Erosion as the presenting symptom in hiatus hernia. A case report. Br Dent J. 1971;131(10):455–6.

198. Meurman JH, Toskala J, Nuutinen P, Klemetti E. Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol. 1994;78(5):583–9.

199. Andrews FF. Dental erosion due to anorexia nervosa with bulimia. Br Dent J. 1982;152(3):89–90.

200. Yip KHK, Smales RJ, Kaidonis JA. The diagnosis and control of extrinsic acid erosion of tooth substance. Gen Dent. 2003;51(4):350–3.

201. Cekić-Arambašin A i sur. Oralna medicina. Oralna medicina. Zagreb: Školska knjiga; 2005. 42 p.

202. Zero DT. Etiology of dental erosion-extrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104(2):162–77.

203. Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:44–65.

204. Järvinen V, Rytömaa I, Meurman JH. Location of dental erosion in a referred population. Caries Res. 1992;26(5):391–6.

205. Valena V, Young WG. Dental erosion patterns from intrinsic acid regurgitation and vomiting. Aust Dent J. 2002;47(2):106–15.

206. Ganss C. Definition of Erosion and Links to Tooth Wear. Dent Eros. 2006;20:9–16.

207. Lussi A. Erosive Tooth Wear – A Multifactorial Condition of Growing Concern and Increasing Knowledge. Monogr Oral Sci. 2006;20:1–8.

208. Rakhmatullina E, Bossen A, Höschele C, Wang X, Beyeler B, Meier C, et al. Application

of the specular and diffuse reflection analysis for *in vitro* diagnostics of dental erosion: correlation with enamel softening, roughness, and calcium release. J Biomed Opt. 2011 Oct;16(10):107–12.

209. Carvalho TS, Assunção CM, Jost F, Bürgin WB, Rodrigues JA, Lussi A. *In vitro* validation of a hand-held optical reflectometer to measure clinically observed erosive tooth wear. Lasers Med Sci. 2016 Aug 16;31(6):1105–12.

210. Smith BG, Knight JK. An index for measuring the wear of teeth. Br Dent J. 1984 Jun 23;156(12):435–8.

211. López-Frías FJ, Castellanos-Cosano L, Martán-González J, Llamas-Carreras JM, Segura-Egea JJ. Clinical measurement of tooth wear: Tooth wear indices. J Clin Exp Dent. 2012 Feb;4(1):48–53.

212. Bartlett D, Ganss C, Lussi A. Basic Erosive Wear Examination (BEWE): A new scoring system for scientific and clinical needs. Clin Oral Investig. 2008 Mar;12:65–8.

213. Cutress TW, Ainamo J, Sardo-Infirri J. The community periodontal index of treatment needs (CPITN) procedure for population groups and individuals. Int Dent J. 1987 Dec;37(4):222–33.

214. Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). Int Dent J. 1982 Sep;32(3):281–91.

215. Hofman LF. Human saliva as a diagnostic specimen. J Nutr. 2001 May 1;131(5):1621–5.

216. NAVAZESH M. Methods for Collecting Saliva. Ann N Y Acad Sci. 1993 Sep 20;694(1):72–7.

217. Kaur A, Kwatra K, Kamboj P. Evaluation of non-microbial salivary caries activity parameters and salivary biochemical indicators in predicting dental caries. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2012;30(3):212–7.

218. Hirotomi T, Yoshihara A, Ogawa H, Ito K, Igarashi A, Miyazaki H. A preliminary study on the relationship between stimulated saliva and periodontal conditions in community-dwelling elderly people. J Dent. 2006 Oct 1;34(9):692–8.

219. Pannunzio E, Amancio OMS, Vitalle MS de S, de Souza DN, Mendes FM, Nicolau J. Análise da saliva total estimulada em escolares com sobrepeso e obesos. Rev Assoc Med Bras. 2010;56(1):32–6.

220. World Health Organization. Oral Health Surveys - Basic Methods 5th edition. Who. Geneva: World Health Organization; 2013. 125 p.

221. Lussi A, Hibst R, Paulus R. DIAGNOdent: An optical method for caries detection. J Dent Res. 2004;83(SPEC. ISS. C):80–3.

222. Ross G. Caries diagnosis with the DIAGNOdent laser: a user's product evaluation. Ont Dent. 1999 Mar;76(2):21–4.

223. Aiuchi H, Kitasako Y, Fukuda Y, Nakashima S, Burrow MF, Tagami J. Relationship between quantitative assessments of salivary buffering capacity and ion activity product for hydroxyapatite in relation to cariogenic potential. Aust Dent J. 2008 Jun 1;53(2):167–71.

224. Kitasako Y, Ikeda M, Burrow MF, Tagami J. Oral health status in relation to stimulated saliva buffering capacity among Japanese adults above or below 35 years of age. J Med Dent Sci. 2006;53(4):175–80.

225. Moritsuka M, Kitasako Y, Burrow MF, Ikeda M, Tagami J, Nomura S. Quantitative assessment for stimulated saliva flow rate and buffering capacity in relation to different ages. J Dent. 2006 Oct 1;34(9):716–20.

226. Moritsuka M, Kitasako Y, Burrow MF, Ikeda M, Tagami J. The pH change after HCl titration into resting and stimulated saliva for a buffering capacity test. Aust Dent J. 2006 Jun 1;51(2):170–4.

227. Ganesan S, Jayaraj D. Salivary pH and Buffering Capacity as Risk Markers for Early Childhood Caries: A Clinical Study. Int J Clin Pediatr Dent. 2015;8(3):167–71.

228. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci. 2008 Aug;63(8):879–84.

229. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. Hoboken, NJ, USA; 2005. 375 p.

230. Nunes LAS, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: A systematic review. Biochem Medica. 2015 Jun 15;25(2):177–92.

231. Baliga S, Muglikar S, Kale R. Salivary pH: A diagnostic biomarker. J Indian Soc Periodontol. 2013 Jul;17(4):461–5.

232. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. Clin Chem. 2011 May 1;57(5):675–87.

233. Nieuw Amerongen A V, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cardiology. Caries Res. 2004;38(3):247–53.

234. Gupta A, Epstein JB, Sroussi H. Hyposalivation in elderly patients. J Can Dent Assoc (Tor). 2006 Nov;72(9):841–6.

235. Al-Ak'hali MS, Halboub ES, Mujam OH, Alahmar NM, Jerah SA, Mutawwam FA. Salivary parameters among Arabian snuff (Shammah) users. Saudi Med J. 2017 Dec;38(12):1201–6.

236. Fenoll-Palomares C, Muñoz-Montagud J V., Sanchiz V, Herreros B, Hernández V, Mínguez M, et al. Débito basal, pH y capacidad tampón de la secreción salivar en sujetos sanos. Rev Esp Enfermedades Dig. 2004 Nov;96(11):773–83.

237. Scott J. Age, sex and contralateral differences in the volumes of human submandibular salivary glands. Arch Oral Biol. 1975 Dec 1;20(12):885-IN35.

238. de Almeida PDV, Grégio AMT, Brancher JA, Ignácio SA, Machado MÂN, de Lima AAS, et al. Effects of antidepressants and benzodiazepines on stimulated salivary flow rate and biochemistry composition of the saliva. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2008 Jul;106(1):58–65.

239. Protrka N, Katunarić M, Filipović I, Verzak Ž. Caries prevalence in heroin addicts. Acta Clin Croat. 2014;52(4):436–43.

240. Ying Joanna N Di, Thomson WM. Dry mouth – An overview. Singapore Dent J. 2015 Dec 1;36:12–7.

241. Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. J Am Dent Assoc. 2008 May 1;139(5 SUPPL.):18S-24S.

242. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Fricke K, Folwaczny C. The CD14 - 159C-to-T promoter polymorphism in periodontal disease. J Clin Periodontol. 2004 Nov 1;31(11):991–5.

243. Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, et al. Increased circulating soluble cd14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. J Infect Dis. 1995 Mar 1;171(3):639–44.

244. Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, Scherberich JE. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol. 1994 Apr;96(1):15–9.

245. Nockher WA, Bergmann L, Scherberich JE. Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. Clin Exp Immunol. 1994 Dec;98(3):369–74.

246. PARVINEN T. Stimulated salivary flow rate, pH and lactobacillus and yeast concentrations in non-smokers and smokers. Eur J Oral Sci. 1984 Aug;92(4):315–8.

247. Ahmadi-Motamayel F, Falsafi P, Goodarzi MT, Poorolajal J. Comparison of salivary pH, buffering capacity and alkaline phosphatase in smokers and healthy non-smokers: Retrospective cohort study. Sultan Qaboos Univ Med J. 2016 Aug;16(3):317–21.

248. Singh M, Yadav P, Ingle N, Ingle E, Kaur N. Effect of long-term smoking on salivary flow rate and salivary pH. J Indian Assoc Public Heal Dent. 2015;13(1):11.

249. Rad M, Kakoie S, Niliye Brojeni F, Pourdamghan N. Effect of Long-term Smoking on Whole-mouth Salivary Flow Rate and Oral Health. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2010;4(4):110–4.

250. Provatenou E, Kaklamanos EG, Kevrekidou A, Kosma I, Kotsanos N. Erosive Tooth Wear and Related Risk Factors in 8- and 14-Year-Old Greek Children. Caries Res. 2016;50(4):349–62.

251. Johansson AK. On dental erosion and associated factors. Swed Dent J Suppl. 2002;(156):1–77.

252. Buzalaf MAR, Magalhães AC, Rios D. Prevention of erosive tooth wear: Targeting nutritional and patient-related risks factors. Br Dent J. 2018 Mar 2;224(5):371–8.

253. Cunha-Cruz J, Scott JA, Rothen M, Mancl L, Lawhorn T, Brossel K, et al. Salivary characteristics and dental caries: Evidence from general dental practices. J Am Dent Assoc. 2013 May;144(5):31–40.

254. Watanabe Y, Mizoguchi H, Masamura K, Nagaya T. No relationship of salivary flow rate or secretory immunoglobulin A to dental caries in children. Environ Health Prev Med. 1997 Oct;2(3):122–5.

255. Stookey GK. The effect of saliva on dental caries. J Am Dent Assoc. 2008 May;139(5 SUPPL.):11–7.

256. Diaz De Guillory C, Schoolfield JD, Johnson D, Yeh CK, Chen S, Cappelli DP, et al. Co-Relationships between glandular salivary flow rates and dental caries. Gerodontology. 2014 Sep;31(3):210–9.

257. Fox PC, van der Ven PF, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. J Am Dent Assoc. 1985 Apr;110(4):519–25.

258. Kanaya T, Kaneko N, Amaike C, Fukushima M, Morita S, Miyazaki H, et al. The effect of orthodontic appliances on levels of S*treptococcus mutans, Streptococcus sobrinus* and microbial flora in saliva. Int Congr Ser. 2005 Sep 1;1284:189–90.

259. Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. Eur J Orthod. 2004 Dec 1;26(6):623–9.

260. Maran S, Pachori A, Kambalimath H, Bhambhani G, Malhotra G. Evaluation of Changes in Salivary pH after Intake of Different Eatables and Beverages in Children at Different Time Intervals. Int J Clin Pediatr Dent. 2018 Jun;11(3):177–82.

261. Tahmassebi JF, Duggal MS, Malik-Kotru G, Curzon MEJ. Soft drinks and dental health: A review of the current literature. J Dent. 2006 Jan;34(1):2–11.

262. Poll EM, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, Stanzel S, Gilsbach JM, Gressner A, et al. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. Clin Chim Acta. 2007 Jul;382(1–2):15–9.

263. MacDonald M, Ghani NAA, Wan Y, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C. Profiling of immunoglobulins in resting and mechanically stimulated saliva. Bioanalysis.

2014;6(5):697–704.

264. Lisa Cheng Y-S, Jordan L, Gorugantula LM, Schneiderman E, Chen H-S, Rees T. Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients With Oral Cancer and Patients With Chronic Oral Inflammatory Diseases. J Periodontol. 2014 Jul;85(7):956–65.

265. Fahad AH, FaisalAl-Huwaizi R, Al-Rubbaey YA, Alhuwaizi AF. Salivary pH, flow rate and *streptococcus mutans* count in relation to oral health status among colored eyes adolescentsin Baghdad/Iraq. Biomed Pharmacol J. 2018 Dec 28;11(4):2085–9.

266. Almosa NA, Lundgren T, Aldrees AM, Birkhed D, Kjellberg H. Diagnosing the severity of buccal caries lesions in governmental and private orthodontic patients at debonding, using the icdas-ii and the diagnodent pen. Angle Orthod. 2014 May 21;84(3):430–6.

267. Bizhang M, Wollenweber N, Singh-Hüsgen P, Danesh G, Zimmer S. Pen-type laser fluorescence device versus bitewing radiographs for caries detection on approximal surfaces. Head Face Med. 2016 Nov 4;12(1):30.

268. Rosa MI, Schambeck VS, Dondossola ER, Alexandre MCM, Tuon L, Grande AJ, et al. Laser fluorescence of caries detection in permanent teeth *in vitro*: a systematic review and meta-analysis. J Evid Based Med. 2016 Nov;9(4):213–24.

269. Lussi A, Imwinkelried S, Pitts NB, Longbottom C, Reich E. Performance and Reproducibility of a Laser Fluorescence System for Detection of Occlusal Caries *in vitro*. Caries Res. 1999;33(4):261–6.

270. Mansour S, Ajdaharian J, Nabelsi T, Chan G, Wilder-Smith P. Comparison of caries diagnostic modalities: A clinical study in 40 subjects. Lasers Surg Med. 2016;48(10):924–8.

271. Huth KC, Lussi A, Gygax M, Thum M, Crispin A, Paschos E, et al. *In vivo* performance of a laser fluorescence device for the approximal detection of caries in permanent molars. J Dent. 2010 Dec;38(12):1019–26.

272. Wenzel A. Bitewing and digital bitewing radiography for detection of caries lesions. J Dent Res. 2004;83(SPEC. ISS. C):72–5.

273. Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ. Systematic Reviews of Selected Dental Caries Diagnostic and Management Methods. J Dent Educ. 2001 Oct;65(10):960–8.

274. Jingarwar MM, Bajwa NK, Pathak A. Minimal intervention Dentistry - A new frontier in clinical Dentistry. J Clin Diagnostic Res. 2014 Jul;8(7):4–8.

275. Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, et al. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear—diagnosis and management. Clin Oral Investig. 2015 Sep 1;19(7):1557–61.

276. Khalife MA, Boynton JR, Dennison JB, Yaman P, Hamilton JC. In Vivo evaluation of DIAGNOdent for the occlusal dental caries. Oper Dent. 2009 Mar;34(2):136–41.

277. Soler-Rodriguez AM, Zhang H, Lichenstein HS, Qureshi N, Niesel DW, Crowe SE, et al. Neutrophil Activation by Bacterial Lipoprotein Versus Lipopolysaccharide: Differential Requirements for Serum and CD14. J Immunol. 2000 Mar 1;164(5):2674–83.

278. Pugin J, Heumann D, Tomasz A, Kravchenko V V., Akamatsu Y, Nishijima M, et al. CD14 Is a pattern recognition receptor. Immunity. 1994 Sep;1(6):509–16.

279. Rey Nores JE, Bensussan A, Vita N, Stelter F, Arias MA, Jones M, et al. Soluble CD14 acts as a negative regulator of human T cell activation and function. Eur J Immunol. 1999 Jan;29(1):265–76.

280. Gabay C, Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. Epstein FH, editor. N Engl J Med. 1999 Feb 11;340(6):448–54.

281. Ramadori G, Christ B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. Semin Liver Dis. 1999 Mar 17;19(2):141–56.

282. Arias MA, Rey Nores JE, Vita N, Stelter F, Borysiewicz LK, Ferrara P, et al. Cutting Edge: Human B Cell Function Is Regulated by Interaction with Soluble CD14: Opposite Effects on IgG1 and IgE Production. J Immunol. 2000 Apr 1;164(7):3480–6.

283. Hayashi J, Masaka T, Ishikawa I. Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. Infect Immun. 1999 Jan;67(1):417–20.

284. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. Proc R Soc B Biol Sci. 2015 Dec 22;282(1821):30–5.

285. Flink H, Tegelberg Å, Sörensen S. Hyposalivation and iron stores among individuals with and without active dental caries. Acta Odontol Scand. 2000 Jan 2;58(6):265–71.

286. Animireddy D, Bekkem VTR, Vallala P, Kotha SB, Ankireddy S, Mohammad N. Evaluation of pH, buffering capacity, viscosity and flow rate levels of saliva in caries-free, minimal caries and nursing caries children: An *in vivo* study. Contemp Clin Dent. 2014 Jul;5(3):324–8.

287. López R, Smith PC, Göstemeyer G, Schwendicke F. Ageing, dental caries and periodontal diseases. J Clin Periodontol. 2017 Mar;44:145–52.

288. Bernabé E, Sheiham A. Age, period and cohort trends in caries of permanent teeth in four developed countries. Am J Public Health. 2014 Jul;104(7):115–21.

289. De Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MÂN, De Lima AAS, Azevedo LR. Saliva composition and functions: A comprehensive review. J Contemp Dent Pract. 2008 Mar 1;9(3):72–80.

290. Su N, Marek CL, Ching V, Grushka M. Caries prevention for patients with dry mouth. J Can Dent Assoc (Tor). 2011;77:85.

291. Clarke NG, Hirsch RS. Personal risk factors for generalized periodontitis. J Clin Periodontol. 1995 Dec 13;22(2):136–45.

292. Dziarski R, Viriyakosol S, Kirkland TN, Gupta D. Soluble CD14 enhances membrane CD14-mediated responses to peptidoglycan: Structural requirements differ from those for responses to lipopolysaccharide. Infect Immun. 2000 Sep;68(9):5254–60.

293. Kumar S, Tandon S, Nayak R, Saran R, Pentapati KC. Relationship of salivary CD14 concentration with dental caries in young children. J Clin Exp Dent. 2017;9(8):958–61.

294. Petz B, Kolesarić V, Dragutin I. Osnovne statističke metode za nematematičare. VI. izdanj. Matešić K, editor. Jastrebarsko: Naklada SLAP; 1997. 192 p.

295. Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. J Physiol. 1972 Feb 1;220(3):529–45.

8. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA

Nives Protrka rođena je 04. lipnja 1979. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisuje se na Zdravstveno učilište – smjer zubotehničar, gdje sudjeluje na državnim natjecanjima i osvaja prve nagrade. Usporedno pohađa i srednju glazbenu školu s kojom sudjeluje na brojnim državnim i međunarodnim natjecanjima.

Godine 1998. upisuje se na Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci – smjer Stomatologija, a 1999. godine prebacuje se na Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu te 2001. godine prima Državnu stipendiju. Diplomirala je 2004. godine, a 2005. godine položila stručni ispit.

Otvorila je 2009. godine privatnu polivalentnu stomatološku ordinaciju u Zagrebu. Radom u ordinaciji stječe iskustvo u praksi u svim granama stomatologije te s pacijentima svih dobnih struktura. Redovito se educira na domaćim i stranim stručnim i znanstvenim kongresima. Stručno se usavršava na raznim radnim tečajevima, a posebice u polju endodoncije, stomatološke protetike, estetske stomatologije i implantologije. Član je Hrvatske stomatološke komore i Hrvatskoga liječničkog zbora.

Magistrirala je 2010. godine pri Stomatološkom fakultetu u Zagrebu. Rad je bio dio projekta MZOŠ broj 065-0650444-0418, „Eksperimentalna i klinička endodoncija“. Od tada se bavi i znanstveno-istraživačkim radom te objavljuje članke. Dalje se upisuje na Poslijediplomski studij za stjecanje akademskoga stupnja doktora znanosti pri Stomatološkome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Rad pod nazivom „Salivary sCD14 as a potential biomarker of dental caries activity in adults“ proistekao je iz istraživanja prikazanog u ovom doktorskom radu.

Objavljeni radovi:

1. Prester LJ, Protrka N, Macan J, Katunarić M. Salivary sCD14 as a potential biomarker of dental caries activity in adults. Arh Hig Rada Toksikol 2017:68:315-321. Q4
2. Protrka N, Katunarić M, Filipović I, Verzak Ž. Caries prevalence in heroin addicts. Acta Clin Croat 2013:52:436-443. Q3

PRILOZI

Prilog 1

ANONIMNI ANKETNI LISTIĆ ZA ISPITANIKE

Molim Vas da odgovorite na sva pitanja.

Odgovarajte tako da zaokružite broj pokraj odgovora koji želite dati ili upišete odgovor na praznu crtu gdje je to potrebno – ČITKO I TISKANIM SLOVIMA**. Povjerljivost Vaših podataka je zaštićena pa Vas molim da odgovarate iskreno.**

1. Koliko imate godina? ____ godina

2. Zaokružite spol:

1. M
2. Ž

3. Koji ste stupanj školovanja posljednji završili? ⇨ JEDAN ODGOVOR

1 – nezavršena osnovna škola

2 – završena osnovna

3 – završena srednja stručna škola ili gimnazija

4 – završena viša škola ili fakultet, akademija, visoka škola

5 – završen magisterij ili doktorat

x – ne znate

4. Označite ili upišite sve bolesti od kojih bolujete?

0 – ne bolujem od kroničnih bolesti

1 – gastroezofagealna refluksna bolest (GERB)

2 – hijatus hernia

3 – poremećaji hranjenja (anorexia nervosa, bulimia nervosa)

4 – alergije (kožne, dišne, hrana...)

5 – kronične upale (sinusa, grla, probavnoga sustava i sl.)

6 – tuberkuloza

7 – urođene mane

x – ne znate

5. Upišite sve lijekove koje povremeno uzimate?

0 – nikada ne uzimam lijekove

1 – uzimam, upišite koje:

_____

x – ne znate

6. Jeste li unazad 2 tjedna bili prehlađeni ili ste bolovali od bilo kakve prehlade:

0 – ne

1 – da, upišite

koje:_____

x- ne znate

7. Jeste li unazad 2 tjedna uzimali antibiotske ili protuupalne lijekove:

0 – ne

1 – da, upišite

koje:_____

x – ne znate

8. Jeste li ikada pušili cigarete?

0 – ne, nikada

1 – da, ali prestali ste pušiti prije barem 6 mjeseci

2 – da, još uvijek pušite

9. Koliko cigareta popušite ili ste pušili dnevno?

0 – nikada niste pušili cigarete

1 – _____cigareta

x – ne znate

10. Koliko često konzumirate sokove s niskim pH i gazirana pića:

0 – ne konzumiram sokove

1 – jednom mjesečno ili rjeđe

2 – 2 – 3 puta tjedno

3 – svaki dan

4 – više puta dnevno

x – ne znate

11. Koliko često konzumirate slatkiše ili slatku hranu:

0 – ne konzumiram slatku hranu niti slatkiše

1 – jednom mjesečno ili rjeđe

2 – 2 – 3 puta tjedno

3 – svaki dan

4 – više puta dnevno

x – ne znate

12. Jeste li unazad 3 mjeseca popravljali ili vadili zub?

0 – ne

1 – da

x – ne znate

Odgovorite koliko često osjećate svaku od navedenih pojava:

	Nikada	Nekoliko puta **godišnje**	1 do 2 puta **mjesečno** ili rjeđe	1 do 2 puta **tjedno**	do 2 puta **dnevno**	**Više puta dnevno**
13. Osjećaj	0	1	2	3		5
14. Osjećaj suhoće	0	1	2	3		5
15. Povraćanje	0	1	2	3		5
16. Krvarenje	0	1	2	3		5

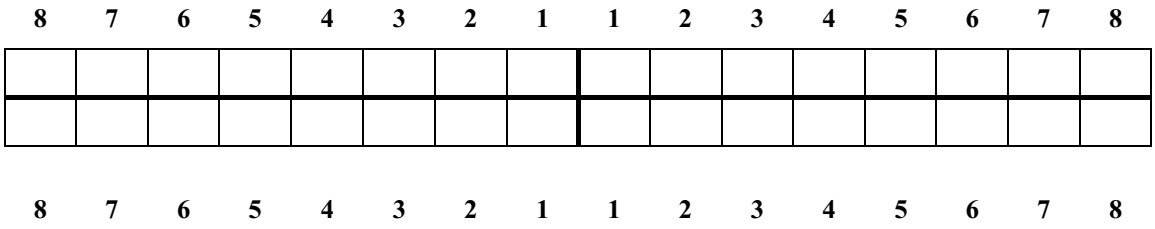
ZAHVALJUJEMO NA SURADNJI!

Datum:_____ Pregledao: _____

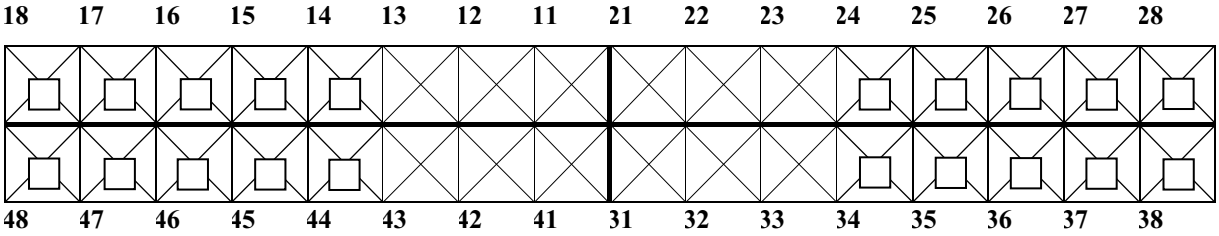
Prilog 2

TESTNA LISTA **Listić br:_____**

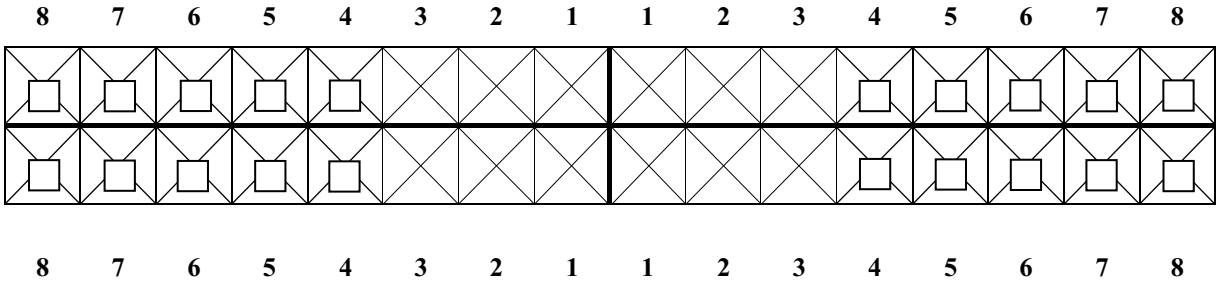
DMFT



DMFS



TWI



Količina nestimulirane sline:

Količina stimulirane sline:

pH nestimulirane sline:

pH stimulirane sline:

Rezultat:_____