Utjecaj pušenja na subgingivni mikrobiološki sastav u mladih ljudi

Bašić, Krešimir

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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:127:575202

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

Sveučilište u Zagrebu
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Krešimir Bašić

UTJECAJ PUŠENJA NA SUBGINGIVNI MIKROBIOLOŠKI SASTAV U MLADIH LJUDI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.

University of Zagreb
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Krešimir Bašić

THE EFFECT OF SMOKING ON THE SUBGINGIVAL MICROBIOTA IN YOUNG ADULTS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Krešimir Bašić

UTJECAJ PUŠENJA NA SUBGINGIVNI MIKROBIOLOŠKI SASTAV U MLADIH LJUDI

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Doc. dr. sc. Ivana Šutej
Doc. dr. sc. Zrinka Bošnjak

Zagreb, 2017.

University of Zagreb
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Krešimir Bašić

THE EFFECT OF SMOKING ON THE SUBGINGIVAL MICROBIOTA IN YOUNG ADULTS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Doc. dr. sc. Ivana Šutej
Doc. dr. sc. Zrinka Bošnjak

Zagreb, 2017.

Rad je izrađen na Katedri za farmakologiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i na Kliničkome zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb u Zagrebu.

Istraživanje je provedeno uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta pri znanstvenome projektu *Povezanost pušenja s orodentalnim zdravljem mladih ljudi* (065-0650445-0406) voditeljice prof. dr. sc. Kate Rošin-Grget.

Mentorica: doc. dr. sc. Ivana Šutej, docentica na Katedri za farmakologiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Sumentorica: doc. dr. sc. Zrinka Bošnjak, docentica na Kliničkome zavodu za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskoga jezika: dr. sc. Lana Hudeček, Nodilova 3, Zagreb

Lektor engleskoga jezika: dr. sc. Milica Mihaljević, Vrapčanska 60, Zagreb

Sastav povjerenstva za obranu poslijediplomskog doktorskog rada:

1. Prof. dr. sc. Darije Plančak, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2. Izv. prof. dr. sc. Alenka Boban-Blagaić, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
3. Izv. prof. dr. sc. Vlaho Brailo, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
4. Doc. dr. sc. Kristina Peroš, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
5. Prof. dr. sc. Hrvoje Brkić, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Datum obrane rada: 30. svibnja 2017.

Rad sadržava 101 stranicu, 15 slika i 22 tablice.

Zuji, zveči, zvoni, zvuči,
Šumi, grmi, tutnji, huči –
To je jezik roda moga!

Petar Preradović

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Šutej na poticaju, nesebičnoj pomoći i usmjeravanju pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Zrinki Bošnjak i djelatnicima Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb na velikoj pomoći u provedbi ovoga istraživanja.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Kati Rošin Grget na podršci i na uvođenju u znanstveni rad i doc. dr. sc. Kristini Peroš na savjetima, podršci i beskrajnom razumijevanju.

Zahvaljujem i mojim curama iz ordinacije, teti Vesni, Ivi i posebno sestri Ivani na velikoj pomoći u prikupljanju ispitanika za ovo istraživanje.

Hvala svim prijateljima, kolegama i obitelji na velikoj podršci i pomoći pri izradi ovoga rada.

Veliko hvala mojim roditeljima na podršci tijekom cijeloga moga obrazovanja, onako kako to samo mama i tata mogu i znaju.

I na kraju, veliko hvala Maji, Mari i Viti na odricanju i beskompromisnoj podršci tijekom izrade ovoga rada.

Ovaj rad posvećujem Maji, Mari i Viti.

SAŽETAK

Poznato je da je pušenje jedan od rizičnih čimbenika za razvoj parodontne bolesti. Dosad nije utvrđena jasna povezanost pušenja cigareta i subgingivnoga mikrobiološkog sastava. Neka istraživanja pokazuju da pušači imaju veći broj vrsta bakterija nego nepušači, dok postoje istraživanja koja nisu pronašla razlike u subgingivnome mikrobiološkom sastavu pušača i nepušača. Cilj je ovoga istraživanja utvrditi povezanost pušenja s mikrobiološkim sastavom subgingivnoga prostora i parodontnim zdravljem kod mladih ljudi bez kliničkih znakova parodontne bolesti s hipotezom da je pušenje povezano s mikrobiološkim subgingivnim sastavom mladih ljudi.

U istraživanju je sudjelovalo 64 parodontološki zdravih ispitanika starih od 25 do 35 godina, 32 u skupini pušača i 32 u skupini nepušača. Ispitanici su ispunili upitnik kojim su prikupljeni podatci o dobi i spolu, pušačkim navikama, oralnohigijenskim navikama te o prehrambenim navikama i konzumaciji alkohola. Svim je ispitanicima napravljen parodontološki pregled i uzeti su uzorci papirnatim štapićima iz sulkusa dva prva molara (16 i 46) za mikrobiološku analizu. Mikrobiološka analiza napravljena je metodom MALDI-TOF masena spektrometrija.

Kod ispitanika je identificirano 63 različitih vrsta bakterija podijeljenih u 5 koljena. Na razini roda najzastupljeniji su bili rodovi *Streptococcus*, *Actinomyces* i *Veillonela*, a na razini vrste *S. oralis*, *S. mitis*, *A. oris*, S. *sanguinis* i *V. parvula*. Kod nepušača identificirano je u prosjeku 5 bakterijskih vrsta po ispitaniku, a kod pušača 6 bakterijskih vrsta po ispitaniku. U ukupnoj prevalenciji na razini koljena, iako bez statističke značajnosti, kod pušača je pronađen veći broj bakterija iz koljena *Fusobacterium*. Nije bilo razlike u broju aerobnih bakterija kod pušača i nepušača, dok je broj anaerobnih bakterija kod pušača bio veći nego kod nepušača, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Kod pušača zabilježena je statistički značajno veća prevalencija bakterije *A. odontolyticus* ($p = 0,026$), a kod nepušača statistički značajno veća prevalencija bakterije *S. sanguinis* ($p = 0,049$).

Pušenje utječe na mikrobiološku floru subgingivnoga prostora parodontološki zdravih mladih ljudi te prouzročuje manji broj zaštitinih bakterija i veći broj patogenih bakterija kod pušača. Kako bi se dodatno pojasnio utjecaj pušenja na subgingivni prostor kod zdravih ljudi, potrebna su dodatna istraživanja na većemu uzorku.

Ključne riječi: pušenje; bakterije; subgingivni prostor; oralna mikrobiološka flora; mladi pušači

SUMMARY

Introduction

Smoking is considered a major risk factor for the development and progression of periodontal diseases. The relation of cigarette smoking to the composition of the subgingival microbiota is not clear. Some studies found higher levels of certain species in smokers, while other studies failed to detect differences in the microbiota between subjects with different smoking histories. The aim of this study is to investigate how smoking in young adults without clinical signs of periodontal disease is associated with the prevalence of subgingival bacteria and periodontal health with the hypothesis that smoking increases the prevalence of the bacteria.

Materials and methods

64 periodontally healthy 25 – 35 years old participants were enrolled in this study, 32 in the smokers group and 32 in the non-smokers group. Selection criteria were: age 25 to 35; systemically healthy and periodontally healthy; no periodontal treatment or antimicrobial therapy for at least six months before the examination; at least 20 teeth. Participants filled in a structured questionnaire which recorded their smoking status, general health, socio-economic status and oral health habits. All participants were clinically examined. Four clinical variables were recorded for all participants: aproximal paque index (API), periodontal pocket depth (PPD), bleeding on probing (BoP) and clinical attachment level. The absence of periodontal disease was defined as absence of sites with PPD of >3 mm in any tooth and BoP >0.25. Subgingival plaque samples were collected with sterile paper points from two first molars (16 and 46) for further microbiological analyses. MALDI TOF mass spectrometry was used for bacterial identification.

Results

63 different bacterial species from 5 phyla (*Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteriodetes, Fusobacteria* and *Firmicutes*) were detected in this study. Species from genera *Streptococcus, Actinomyces* and *Veillonela* were dominant in this study. Species *S. oralis, S. mitis, A. oris,* S. *sanguinis* and *V. Parvula* showed the greatest prevalence. In average, non-smokers harbored 5 different species and smokers harbored 6 different species. Smokers showed a higher abundance of *Fusobacterium* phyla compared to non-smokers. No difference in abundance of

aerobic bacteria was recorded between smokers and non-smokers, but smokers showed a higher abundance of anaerobic bacteria compared to non-smokers. None of these differences were statistically significant. Smokers showed a higher prevalence of *A. odontolyticus* (p=0.026) which is acting as a bridging species, enabling co-adhesion between early and late (pathogenic) colonizers. Non-smokers showed a higher prevalence of S. sanguinis (p=0.049) which is beneficial, protective bacteria that showed prominent inhibitory effects on *A. actinomycetemcomitans* colonization.

Conclusion

Smoking affects the subgingival microbiota in periodontally healthy young adults and is responsible for the depletion of beneficial bacteria and the increase in pathogenic bacteria. Further studies with a larger sample are needed to enhance our understanding of the exact effect of smoking on the subgingival microbiota.

Key Words: smoking; oral microbiota; subgingival microbiota; young smokers

POPIS KRATICA BAKTERIJA

A. meyeri	Actinomyces meyeri
A. odontolyticus	Actinomyces odontolyticus
A. oris	Actinomyces oris
A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
A. aphrophilus	Aggregatibacter aphrophilus
A. parvulum	Atopobium parvulum
C. concisus	Campylobacter concisus
C. gracilis	Campylobacter gracilis
C. rectus	Campylobacter rectus
C. showae	Campylobacter showae
C. gingivalis	Capnocytophaga gingivalis
C. granulosa	Capnocytophaga granulosa
C. ochracea	Capnocytophaga ochracea
C. sputigena	Capnocytophaga sputigena
E. corrodens	Eikenella corrodens
E. faecalis	Enterococcus faecalis
E. brachy	Eubacterium brachy
E. nodatum	Eubacterium nodatum
F. canifelinum	Fusobacterium canifelinum
F. naviforme	Fusobacterium naviforme
F. nucleatum	Fusobacterium nucleatum
F. periodonticum	Fusobacterium periodonticum
F. polymorphum	Fusobacterium polymorphum
F. vincentii	Fusobacterium vincentii
G. bergeri	Gemella bergeri
G. haemolysans	Gemella haemolysans
G. morbillorum	Gemella morbillorum
H. parainfluenze	Haemophilus parainfluenze
L. salivarius	Lactobacillus salivarius
L. trevisanii	Leptotrichia trevisanii
L. wadei	Leptotrichia wadei
N. bacilliformis	Neisseria bacilliformis
N. elongata	Neisseria elongata
N. flavens	Neisseria flavens
N. macacae	Neisseria macacae
N. mucosa	Neisseria mucosa
P. micra	Parvimonas micra

P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
P. buccae	Prevotella buccae
P. dentalis	Prevotella dentalis
P. denticola	Prevotella denticola
P. intermedia	Prevotella intermedia
P. loescheii	Prevotella loescheii
P. melaninigenica	Prevotella melaninigenica
P. nigrescens	Prevotella nigrescens
P. acnes	Propionibacterium acnes
R. aeria	Rothia aeria
R. dentocariosa	Rothia dentocariosa
R. mucilaginosa	Rothia mucilaginosa
S. noxia	Selenomonas noxia
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. capitis	Staphylococcus capitis
S. epidermidis	Staphylococcus epidermidis
S. hominis	Staphylococcus hominis
S. lugdunensis	Staphylococcus lugdunensis
S. anginosus	Streptococcus anginosus
S. constellatus	Streptococcus constellatus
S. cristatus	Streptococcus cristatus
S. gordonii	Streptococcus gordonii
S. intermedius	Streptococcus intermedius
S. mitis	Streptococcus mitis
S. mutans	Streptococcus mutans
S. oralis	Streptococcus oralis
S. parasanguinis	Streptococcus parasanguinis
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
S. salivarius	Streptococcus salivarius
S. sanguinis	Streptococcus sanguinis
S. vestibularis	Streptococcus vestibularis
T. forsythia	Tannerella forsythia
T. denticola	Treponema denticola
V. atypica	Veillonella atypica
V. dispar	Veillonella dispar
V. parvula	Veillonella parvula
V. rogosae	Veillonella rogosae

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 Pušenje 2
1.1.1 Nikotin 3
1.1.2 Ostali toksični sastojci dima cigareta 4
1.2 Parodont 5
1.2.1 Parodontna bolest 6
1.2.2 Rizični čimbenici parodontne bolesti 7
1.2.3 Pušenje i parodontna bolest 8
1.3 Mikrobiologija subgingivnoga prostora 10
1.3.1 Pušenje i subgingivna mikrobiološka flora 12
1.4 MALDI-TOF kao proteomska tehnika identifikacije mikroorganizama 14
2. SVRHA ISTRAŽIVANJA 15
3. ISPITANICI I METODE 17
3.1 Ustroj istraživanja 18
3.2 Mjesto i vrijeme provođenja 18
3.3 Etička načela 18
3.4 Ispitanici 18
3.4.1 Ciljna populacija 18
3.4.2 Vrsta uzorka 18
3.5 Anketni upitnik 19
3.6 Parodontološki pregled 19
3.7 Mikrobiološka analiza 20
3.8 Statistička obrada podataka 21
4. REZULTATI 23
4.1 Ispitanici 24
4.1.1 Uključivanje ispitanika 24
4.1.2 Sociodemografske značajke uzorka 25
4.1.3 Parodontni status 26
4.1.4 Navike pušenja 26
4.1.5 Dentalna medicinska zaštita 28
4.1.6 Oralna higijena 28
4.1.7 Prehrambene navike 30
4.2 Oralna mikrobiološka flora kod svih ispitanika 32
4.2.1 Popis svih identificiranih vrsta bakterija 32
4.2.2 Prevalencija bakterija po koljenima 34

4.2.3 Prevalencija bakterija po rodovima ... 35
4.2.4 Prevalencija bakterija po vrstama ... 37
4.3 Broj bakterija kod pušača i nepušača ... 39
4.3.1 Broj bakterija (univarijatna analiza) ... 39
4.3.2 Povezanost broja bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima ... 40
4.3.3 Broj aerobnih bakterija ... 42
4.3.4 Povezanost broja aerobnih bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima ... 43
4.3.5 Broj anaerobnih bakterija ... 45
4.3.6 Povezanost broja anaerobnih bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima ... 45
4.4 Multivarijatna analiza broja bakterija kod pušača i nepušača ... 48
4.4.1 Zbunjujuće varijable ... 48
4.4.2 Broj svih bakterija ... 48
4.4.3 Broj aerobnih bakterija ... 50
4.4.4 Broj anaerobnih bakterija ... 52
4.5 Prevalencije bakterija kod pušača i nepušača ... 54
4.5.1 Prevalencija bakterija po koljenima ... 54
4.5.2 Prevalencija bakterija po kompleksima prema Socransky i sur. ... 55
4.5.3 Prevalencija aerobnih bakterija ... 57
4.5.4 Prevalencija anaerobnih bakterija ... 61
5. RASPRAVA ... 65
5.1 Ispitanici ... 66
5.2 Mikrobiološki profil ispitne populacije ... 67
5.3 Povezanost pušenja s mikrobiološkim sastavom subgingivnoga prostora ... 70
6. ZAKLJUČCI ... 75
7. LITERATURA ... 77
8. ŽIVOTOPIS ... 95
Popis objavljenih radova ... 96

1. UVOD

1.1 Pušenje

Poznata je činjenica da pušenjem cigareta nastaju kemijski spojevi koji imaju vrlo štetan utjecaj na zdravlje pušača i osoba u njihovoj blizini, ali unatoč tomu pušenje duhana veoma je proširena loša navika među ljudima svih dobnih skupina. Prema istraživanju o uporabi duhana u odrasloj populaciji Republike Hrvatske, koje je proveo Hrvatski zavod za javno zdravstvo tijekom 2014. i 2015. godine, broj pušača u Hrvatskoj je visok, iako u posljednjih nekoliko godina pada – u Hrvatskoj puši 35,3 % muškaraca i 27,1 % žena. Udio pušača najveći je u dobnoj skupini 25 – 44 godine (38,9 %), zatim u dobnoj skupini 45 – 64 godine (36,5 %), 15 – 24 godina (30,0 %), a najmanji u dobnoj skupini 65 i više godina (11,5 %) (1).

Još je 1975. godine Svjetska zdravstvena organizacija (2) iznijela stajalište da je pušenje duhana najvažniji pojedinačni čimbenik oštećivanja zdravlja u ljudi u svijetu te da bi se smanjenjem pušenja dao velik, ako ne i najveći, doprinos prevenciji mnogih bolesti.

Pušenje se definira kao uvlačenje nikotinskoga dima koji nastaje pri sagorijevanju duhana u cigareti, luli ili cigari. Iz zapaljenoga osušenog lišća duhana duhanski se dim uvlači u usta stvaranjem negativnoga tlaka u plućima, a zatim kroz dišne putove inhalira do krajnjih alveola.

Dim cigarete sadržava, osim nikotina, više od 5300 drugih sastojaka, od čega je više od 70 kancerogena (3). Od svih sastojaka duhanskoga dima toksikološki su najvažnije ove skupine (3, 4):

- nikotin i srodni alkaloidi (nornikotin, anatabin i anabasin)
- ugljični monoksid
- policiklički aromatski ugljikovodici
- aromatski amini i nitrozamini
- aldehidi
- fenoli
- hlapljivi ugljikovodici
- katran, arsen, nikal, krom, kadmij, polonij i druge kancerogene supstance.

Na temelju opsežnih istraživanja utvrđeno je da pušenje:

- ubrzava razvitak aterosklerotičnih promjena i da pušači, osobito pušači cigareta, mnogo češće obolijevaju od koronarnih bolesti

- može pojačati i izazvati druga oboljenja krvnih žila
- iritira dišne putove, smanjuje ventilaciju pluća, smanjuje pokretljivost cilija u epitelu, ometa izlučivanje bronhalne sluzi iz žljezdanih stanica, što ima za posljedicu emfizem i povećanu osjetljivost na infekcije respiratornoga trakta (kronični bronhitis, faringitis ili laringitis).
- značajno povećava učestalost karcinoma pluća, usne šupljine, grla, jednjaka, želuca, debeloga crijeva, gušterače, jetre, bubrega, mokraćnoga mjehura i drugih organa
- povećava učestalost gastričnoga i duodenalnoga ulkusa
- utječe na metabolizam (povećava razinu glukoze i lipida u krvi)
- prouzročuje promjene na muškim i ženskim gametama i tako povećava rizik od teratogenosti
- prouzročuje oštećenje mrežnice i vidnoga živca (duhanska embolija)
- smanjuje porođajnu masu i povećava smrtnost novorođenčadi, povećava postotak preranoga poroda, uzrokuje hipoksiju fetusa čije posljedice mogu biti intelektualne i/ili tjelesne deficijencije
- slabi prirodni zaštitni mehanizam organizma.

1.1.1 Nikotin

Nikotin je glavni alkaloid duhana (*Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica*), a uz alkohol i kofein spada među najčešće upotrebljavane psihoaktivne droge. Nikotin je selektivni agonist nikotinskih acetilkolinskih receptora, koji se normalno aktiviraju acetilkolinom. On je, kao farmakološki aktivna tvar u dimu duhana, odgovoran za razvoj ovisnosti o pušenju.

Nikotin se može apsorbirati kroz pluća, bukalnu i nazalnu sluznicu, kožu i probavni sustav (5). Pušač može svjesno kontrolirati razinu nikotina u krvi mijenjanjem frekvencije disanja, dubinom inhalacije, vremenom zadržavanja dima i brojem popušenih cigareta na dan. Nikotin se metabolizira u jetri (80 – 90 %) na dva glavna metabolita, kotinin i nikotin-N-oksid, a zatim se izlučuje urinom. Poluvrijeme razgradnje nikotina je oko dva sata, pa se brzo pojavljuje potreba za novom cigaretom (6). Kotinin, metabolički derivat nikotina, deset se puta duže zadržava u tijelu, pa se podatci o njegovoj razini u krvi pušača upotrebljavaju u dijagnostičke i istraživačke svrhe.

Nikotin putem aktivacije kolinergičkih nikotinskih receptora ima snažan učinak na periferni živčani sustav, mozak, moždano deblo, srce i druge organe (7 – 9). Velike doze početno povećavaju krvni tlak, a zatim ga smanjuju zbog blokiranja ganglija i smanjenja koncentracije katekolamina uz istodobni gubitak tonusa gastrointestinalnoga trakta. Nikotin smanjuje aktivnost aferentnih živčanih vlakana, što dovodi do smanjenja mišićnoga tonusa (to bi mogao biti, barem djelomično, uzrok relaksacije koja se osjeti nakon pušenja). Nadalje, on stimulira izlučivanje antidiuretskoga hormona i sprječava povećanje tjelesne težine, vjerojatno smanjenjem apetita te povećanjem intenziteta metabolizma nakon pušenja. U ranome stadiju pušenja prouzročuje mučninu i povraćanje jer stimulira centar za povraćanje u moždanome deblu i senzoričke receptore u abdomenu. Male količine nikotina imaju drukčiji učinak na središnji i periferni živčani sustav. One prouzročuju stimulaciju centralnih ganglija i izlučivanje katekolamina iz nadbubrežne žlijezde, što ima za posljedicu hipertenziju, povećani tonus gastrointestinalnoga trakta i povećanu sekreciju u želucu. Stimulacijom specifičnih acetilkolinskih receptora nikotin u malim dozama povećava psihomotoričku aktivnost i sposobnost pamćenja. Međutim, tolerancija i ovisnost brzo se razvijaju.

Ovisnost o nikotinu nastaje zbog njegova vezanja za nikotinske receptore u središnjemu živčanom sustavu te posljedičnoga otpuštanja dopamina, odgovornoga za osjet ugode i učinak raspoznavanja nagrada. Kad nikotin pobudi projekcijske neurone, dopamin se otpusti u akumbensu i u prefrontalnome korteksu, ispunjavajući tako dopaminergični uvjet za opojnu drogu (10). Tolerancija nastaje zbog specifičnoga svojstva nikotinskoga receptora, koji nakon uzastopne stimulacije postaje neosjetljiv na ligand koji se veže na njega.

1.1.2 Ostali toksični sastojci dima cigareta

Ugljični monoksid (CO) plin je bez boje, okusa i mirisa, a procjenjuje se da je njegova koncentracija u dimu cigareta 2 – 6 % (11). Udisanjem dolazi u pluća odakle ulazi u krv, a u krvi se u eritrocitima veže za hemoglobin i stvara karboksihemoglobin (COHb), sprječavajući tako osnovnu funkciju hemoglobina, a to je transport kisika. Razina COHb-a u pušača iznosi 5 – 15 % (12), u nekim slučajevima i preko 20 % (13), dok je kod nepušača ta koncentracija oko 1 %. Povećana koncentracija COHb-a može dovesti do akutnoga i kroničnoga otrovanja, a pretpostavlja se da ima i značajnu ulogu u razvoju parodontne bolesti (14).

Kao što je već rečeno, dim cigarete sadržava više od 70 kancerogenih tvari, prema kemijskome sastavu podijeljenih u nekoliko skupina. Policiklički aromatični ugljikovodici (PAH) među prvima su prepoznati kao kancerogena tvar u katranu (15). Do danas je identificirano više od 500 različitih različitih PAH-ova, od kojih dva iz dima cigareta imaju posebno izraženo kancerogeno djelovanje – benzopiren i dibezantracen (3).

N-nitrozamini u dimu cigareta nastaju od nikotina i drugih alkaloida te su poznati spojevi s kancerogenim učinkom. Dva nitrozamina koja se dobivaju u dimu cigarete, NNK i NNN, dokazano prouzročuju karcinom u čovjeka (16).

Aromatski amini prepoznati su kao kancerogeni početkom 20. stoljeća kod ljudi koji su bili izloženi industrijskim bojama. U dimu cigarete nalaze se aminobifenil i naftilamin (3).

Aldehidi (formaldehid i acetaldehid) osim u dimu cigareta nalaze se i drugdje u ljudskoj okolini. Iako su poznati kancerogeni, njihov kancerogeni učinak u dimu cigareta nije značajan, ali svako doprinosi mogućemu razvoju bolesti (17).

Od hlapljivih ugljikovodika u dimu cigarete nalaze se 1,3-butadien, poznati multiorganski kancerogen i benzen, kancerogen koji se povezuje s razvojem leukemije (3).

1.2 Parodont

Parodont je funkcijska cjelina pojedinih tkiva koja podupiru zube. Podijeljen je u dva dijela: gingivu, čija je glavna funkcija zaštita podložnih tkiva, i pričvrsni (potporni) aparat, sastavljen od parodontnoga ligamenta, cementa i alveolarne kosti. Glavna je funkcija parodonta pričvršćivanje zuba uz koštano tkivo čeljusti i zadržavanje integriteta površine mastikatorne sluznice usne šupljine. Ukratko, funkcija parodonta kao pričvrsnoga aparata je fizička, formativna, nutritivna i senzorička (18). Parodont čini razvojnu, biološku i funkcionalnu cjelinu koja podliježe morfološkim i funkcionalnim promjenama u usnoj šupljini (19).

Gingiva je prva linija obrane parodontnoga tkiva od mehaničkih i bakterijskih utjecaja. Uz epitel, koji čini mehaničku prepreku prolasku bakterija i ostalih toksina, važnu ulogu u obrambenome mehanizmu gingive ima sulkusna tekućina.

Sulkusna tekućina fiziološka je tekućina koja se nalazi u sulkusu zuba, a dolazi eksudacijom iz gingivnoga spleta krvnih žila. Ako postoje klinički znaci upale, onda je riječ o upalnome

eksudatu, a ne više o fiziološkoj tekućini. Uloga je sulkusne tekućine pročišćivanje sulkusa, poboljšavanje adhezije epitela na zub putem proteina plazme, antimikrobno djelovanje te poticanje djelovanja antitijela kao obrambenoga mehanizma za zaštitu gingive. Sulkusna tekućina sastavljena je od seruma i različitih sastavnica kao što su bakterije iz biofilma, komadići tkiva te upalni medijatori i antitijela koji nastaju kao odgovor na prisutnost mikroorganizama u biofilmu subgingivnoga ili supragingivnoga plaka (20).

Zbog mijenjanja sastava tijekom upalnih procesa i zbog svoje jednostavne dostupnosti niz se godina istražuje postojanje biomarkera parodontne bolesti u sulkusnoj tekućini kako bi se sulkusnom tekućinom moglo koristiti kao dijagnostičkim i prognostičkim sredstvom za parodontnu bolest (21 – 23).

1.2.1 Parodontna bolest

Naziv *parodontna bolest* podrazumijeva široku skupinu patoloških promjena parodontnoga tkiva. Parodontna bolest upalni je odgovor u parodontnome tkivu prouzročen mikroorganizmima zubnoga plaka, koji pridonosi destrukciji tkiva, gubitku kosti i, konačno, gubitku zuba (18). Kod parodontnih bolesti nema oštre i prirodne granice između zdravlja i bolesti kao kod velike većine drugih bolesti (24). Parodontna bolest je individualna, te samo kod maloga broja ljudi dolazi do uznapredovale destrukcije parodontnih struktura. Tijek bolesti je kontinuiran, uz kratke epizode lokalizirane egzarcebacije i remisije (18). Uobičajeni oblici bolesti su gingivitis i parodontitis, koji su međunajproširenijim infektivnim bolestima današnjice u ljudi (25). Gigingivitis je stanje gingive koje ima neka od sljedećih kliničkih obilježja: crvenu i spongioznu gingivu, krvarenje nakon provociranja, promjene u konturi, prisutnost supragingivnoga ili subgingivnoga kamenca, prisutnost plaka bez radiološkoga dokaza gubitka kosti alveolarnoga grebena. Parodontitis je destruktivni oblik parodontne bolesti, čija su obilježja upala parodontnoga tkiva koja vodi apikalnoj migraciji epitela parodontnoga pričvrstka s posljedičnim kliničkim simptomima gubitka parodontnoga pričvrstka i alveolarne kosti, stvaranja džepova i konačno ispadanja zuba.

Prva općepriznata klasifikacija parodontne bolesti nastala je 1966. godine u Ann Arboru (Michigan, SAD), gdje je održana prva radionica na kojoj gotovo da i nije bilo rasprave o klasifikaciji bolesti osim da se parodontna bolest dijeli na gingivitis i parodontitis. Razlog je tomu što se onda nije znalo mnogo o etiologiji i patogenezi, već su se klasifikacije više temeljile

na kliničkoj slici i tijeku bolesti. Autori Page i Schroeder (26) su 1982. godine, zahvaljujući spoznajama o etiologiji i mikrobiologii, izmijenili dotadašnje poglede na klasifikaciju. Na trećoj radionici Američke parodontološke akademije (AAP) prvi je put iznesena detaljna klasifikacija parodontnih bolesti. Tijekom sljedećih godina dolazi do korekcija i pojednostavljenja klasifikacije, pa je 1999. godine na *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* u Oak Brooku (Illinois, SAD, 1999.) izrađena svjetski priznata i znanstveno utemeljena klasifikacija (24), kojom se preporučuje sljedeća klasifikacija bolesti (27):

- gingivne bolesti
- kronični parodontitis
- agresivni parodontitis
- parodontitis kao manifestacija sistemske bolesti
- nekrotizirajuće parodontne bolesti
- parodontni apscesi
- parodontitis uz endodontske lezije
- razvojne i stečene deformacije i stanja.

1.2.2 Rizični čimbenici parodontne bolesti

Kronične bolesti u čovjeka, kao što su rak, šećerna bolest ili kronični parodontitis, bolesti su koje imaju više uzroka i različitih čimbenika koji utječu na njezin početak i razvoj. Katkad je vrlo teško razlučiti što je dovelo do neke bolesti, a najčešće je riječ o kombinaciji različitih čimbenika koji se u određenome trenutku i na određeni način pojave i pokrenu nastanak bolesti. Glavni su uzročnik parodontne bolesti bakterije, ali samo postojanje bakterija u subgingivnome ili supragingivnome plaku nije dovoljno da se razvije bolest – mora istodobno postojati više različitih čimbenika da bi došlo do pojave kliničkih simptoma bolesti. Sistemski rizični čimbenici parodontne bolesti mogu se ugrubo svrstati u dvije skupine. Prvu čine pušenje i *diabetes mellitus*. Utjecaj tih dvaju stanja na razvoj i progresiju parodontne bolesti temelji se na križnim, longitudinalnim i intervencijskim studijama te na studijama mehanizma djelovanja. Stoga je razumno ta dva stanja nazvati pravim čimbenicima rizika, a uzimanje u obzir tih čimbenika nezaobilazno je u liječenju parodontne bolesti (28). U drugu skupinu spadaju

HIV/AIDS, osteoporoza i menopauza, povećana uporaba lijekova, trudnoća i psihosocijalni čimbenici (stres).

1.2.3 Pušenje i parodontna bolest

Dokazi da pušenje ima važnu ulogu u nastanku parodontne bolesti temelje se na rezultatima brojnih istraživanja u kojima je utvrđena veća prevalencija bolesti među pušačima u križnim istraživanjima, veća incidencija parodontitisa među pušačima u longitudinalnim istraživanjima, statistički značajna povezanost i nakon isključenja ostalih rizičnih čimbenika, povećana incidencija i prevalencija bolesti s povećanjem intenziteta pušenja i biološki vjerojatan mehanizam kojim se može objasniti kako je pušenje uključeno u destrukciju parodontnih tkiva (27, 29, 30). Nadalje, dokazano je da nikotin na staničnoj razini može promijeniti pričvršćivanje i proliferaciju parodontnoga ligamenta *in vitro* (31 – 33), stimulirati diferencijaciju osteoklasta te umanjiti angiogenezu (34).

Mnoge su studije pokazale da pušači imaju veći gubitak parodontnoga pričvrstka (35, 36), veći broj dubokih parodontnih džepova (37, 38), veći gubitak kosti (37, 39), povećano stvaranje supragingivnoga i subgingivnoga zubnog kamenca (40–42) te veću prevalenciju izloženosti furkacije korijena (32) od nepušača, ali čini se da u usporedbi s nepušačima naginju jednakoj ili čak smanjenoj prevalenciji gingivne upale (43 – 62). Međutim, u nekoliko istraživanja gingivne upale u pušača rezultati su suprotni (63 – 66). Znakovi i simptomi parodontne bolesti značajno se povećavaju s intenzitetom pušenja i njegovim trajanjem (64, 67).

Ovisno o tome koji se klinički parametri primjenjuju za procjenu parodontne bolesti, vjerojatnost da će pušači razviti neki oblik parodontne bolesti 2,6 do 6 puta veća je od vjerojatnosti da će je razviti nepušači. Nadalje, pušenje se povezuje s od 2 do 8 puta većom vjerojatnošću rizika za gubitak parodontnoga pričvrstka i/ili gubitka kosti (39, 51, 55, 57, 58, 68 – 73).

U mlađih osoba u dobi od 19 do 40 godina parodontitis pogađa 30 – 50 % više osoba koje puše nego nepušača, s 3 do 14 puta većim rizikom nastanka parodontne destrukcije (29). Utjecaj duhana na parodontno zdravlje čini se potpuno neovisnim o količini plaka i oralnoj higijeni pacijenta (51).

Parodontna je bolest rezultat složenoga međudjelovanja bakterija iz subgingivnoga plaka i upalnoga imunološkog odgovora domaćina, koji nastaje kao odgovor na djelovanje bakterija. Bakterije iniciraju aktiviranje imunološkoga odgovora, a upalni procesi koji se nakon toga događaju prouzročuju destrukciju parodontnih tkiva i početak parodontne bolesti. Pušenje narušava mnoge aspekte imunološkoga odgovora, uključujući funkciju neutrofila, proizvodnju antitijela, aktivnost fibroblasta, vaskularne čimbenike kao i proizvodnju medijatora upale (70, 74 – 77).

Pušači imaju povećan ukupan broj bijelih stanica i granulocita u sistemnoj cirkulaciji, međutim, nejasan je utjecaj pušenja na broj polimorfonukleara u sulkusnoj tekućini. Pokretljivost i funkcije polimorfonukleara poput fagocitoze, stvaranje superoksida i hidrogena, ekspresija integrina i proizvodnja inhibitora proteaze mogu biti promijenjeni pušenjem cigareta ili različitim sastojcima duhana (78), čime je oslabljena prva linija obrane protiv subgingivnih bakterija. Imunološki odgovor smanjen je i onesposobljen inhibicijom funkcije granulocitnih leukocita (14, 79). Neutrofili imaju važnu ulogu i u zaštiti domaćina i destrukciji tkiva. Pušenje, čini se, više potiče destruktivnu aktivnost polimorfonukleara (70). Među mogućim mehanizmima utjecaja pušenja čini se da određenu ulogu ima i smanjena saturacija hemoglobina u mikrocirkulaciji gingive (14, 80 – 82) te ometanje revaskularizacije kosti i mekih tkiva (61). Mnoga oštećenja tkiva ovise o prokrvljenosti i funkcionalnosti krvožilnoga sustava, npr. sposobnost da se tkiva opskrbljuju kisikom, hranjivim tvarima, stanicama i čimbenicima rasta. U sulkusnoj tekućini pušača izmjerene su gotovo 300 puta veće koncentracije nikotina od onih u plazmi (20 ng/ml) (70). Iako gingiva pušača može izgledati zdravo, histološkim pregledom uočavaju se promjene gingive kod pušača koje mogu dovesti do razvoja parodontitisa (74). Pretpostavlja se da je smanjena prokrvljenost gingivnoga tkiva posljedica vazokonstriktornoga učinka nikotina. Međutim, rezultati studija oprečni su, pa se čini da postoji razlika između akutnoga i kroničnoga učinka nikotina (83, 84).

Pušenje ometa revaskularizaciju kosti i mekih tkiva, što ima velik utjecaj na uspjeh parodontne terapije. Vrlo negativan utjecaj ima na regenerativnu parodontnu terapiju, uključujući i terapiju koštanim usadcima (graftovima), te na vođenu tkivnu regenerativnu terapiju i kombinaciju tih terapija (70, 85 – 88). Pušenje cigareta, kako je dokazano, utječe na prokrvljenost tkiva, pa čak i najmanja promjena u prokrvljenosti može dovesti do značajnih i teških promjena na tim tkivima te imati ulogu u smanjenome odgovoru na parodontnu terapiju u pušača (89).

Prestanak pušenja ne može poništiti štetan utjecaj pušenja koji se već dogodio, ali brzina gubitka kosti i parodontnoga pričvrstka usporava se nakon što pacijent prestane pušiti. Težina

parodontne bolesti u bivšega pušača negdje je po prilici između one trenutačnoga pušača i one nepušača (45, 55, 90 – 92). Odgovor bivših pušača na parodontnu terapiju sličan je odgovoru nepušača (85, 93 – 95), a isto vrijedi i za uspjeh dentalnih implantata (96). Klinička istraživanja pokazala su da pušači imaju koristi od konzervativne i kirurške parodontne terapije, ali klinički parametri mjereni nakon terapije iznose 50 – 75 % parametara izmjerenih u nepušača. Stoga treba poticati doktore dentalne medicine da budu aktivniji u pružanju pomoći i podrške u prestanku pušenja svojim pacijentima jer će time postići dalekosežnije korisne rezultate za pacijentovo oralno i opće zdravlje. Budući da je pušenje drugi najznačajniji rizični čimbenik nastanka parodontnih bolesti nakon dentalnoga bakterijskog plaka koji je moguće modificirati (70), odvikavanje od pušenja trebalo bi biti prirodna mjera poput oralne higijene u svakoj stomatološkoj ordinaciji (97).

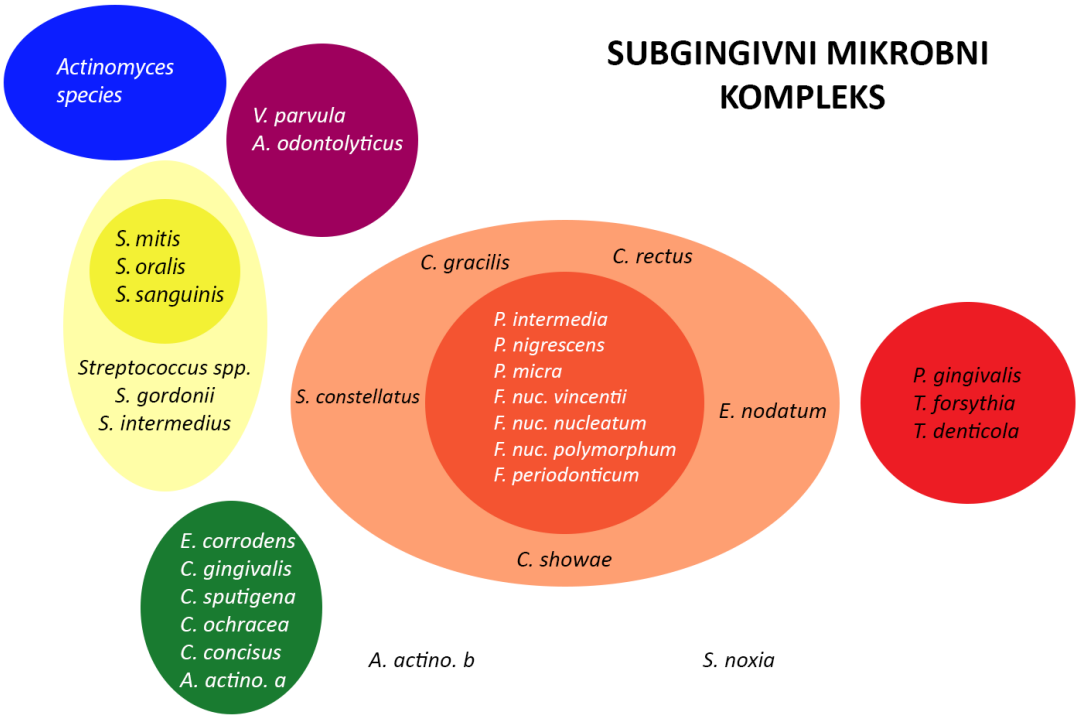
1.3 Mikrobiologija subgingivnoga prostora

Pretpostavlja se da je oko 500 – 700 različitih bakterija sposobno kolonizirati usnu šupljinu, a svaka osoba može ih imati i 150 različitih vrsta – na površinama zuba ili na sluznici usne šupljine (98 – 101). Broj bakterija u subgingivnome području iznosi od 10^3 u zdravome plitkom sulkusu do više od 10^8 u dubokim parodontnim džepovima.

Bakterije u usnoj šupljini najčešće se organiziraju u biofilmove (102). Biofilmovi se sastoje od jedne ili više populacija bakterija uloženih u matriks sastavljen najvećim dijelom od vode i eksopolisaharida. Biofilm kao oblik heterogene organizacije bakterijama omogućuje jednostavnije pričvršćivanje na podlogu te im olakšava međusobnu komunikaciju putem *quorum sensinga*, što na kraju dovodi do boljih mehanizama razvijanja rezistencije na antibiotike (103).

Jedan od najistraženijih i najsloženijih biofilmova u prirodi jest onaj na površini zuba, plak. Plak na caklini zuba nastaje stvaranjem pelikule, glikoproteinskoga filma koji se vrlo brzo stvara na caklini zuba nakon što se mehanički ukloni. Pelikula ima važnu ulogu u selektivnome prianjanju bakterija. Prvi materijal koji se veže uz pelikulu sastoji se od bakterija i velikoga broja epitelnih stanica i polimorfonuklearnih leukocita. U prvih nekoliko sati bakterije koje se opiru odvajanju od pelikule, mogu početi stvarati male kolonije morfološki sličnih mikroorganizama. Tijekom vremena dolazi do proliferacije drugih bakterija koje se vežu na već

postojeće bakterije ili između nastalih kolonija. Između bakterija u plaku nalazi se intermikrobni matriks, koji se sastoji od različitih ugljikohidrata, polisaharida i lipida, koji bakterijama u plaku služi kao skladište energije. Procjenjuje se da u debljim plakovima (300 ili više slojeva stanica) broj bakterija prelazi čak 300 milijuna (19). Složenost zubnoga plaka nastaje dijelom zbog površine zuba koja omogućava neprekidnu kolonizaciju i razvoj veoma složenih ekosustava, a dijelom zbog obilja hrane te sposobnosti oralnih vrsta za koagregaciju. Prema mjestu nastanka razlikuje se supragingivni i subgingivni plak. Razlike između tih dviju vrsta plaka temelje se u prvome redu na mjestu njihova vezanja. Supragingivni plak vezan je samo uz površinu zuba i nastavlja se u subgingivni prostor. Subgingivni plak tako ima biofilm koji je vezan uz površinu zuba i nastavak je supragingivnoga biofilma, pa im je i sastav vjerojatno isti. Subgingivni plak ima i drugi biofilm koji je vezan uz stanice epitela, te prekriva epitelnu površinu džepa, a sadržava primarno spirohete i gram-negativne bakterije (103 – 105). Uz epitel u tom su području pronađene su i *P. gingivalis*, *T. denticola* (106) te *T. forsythia* (107).



Slika 1. Dijagram povezanosti bakterijskih vrsta unutar bakterijskih kompleksa i između bakterijskih kompleksa. Preuzeto i prilagođeno od Socransky i sur. (108).

Socransky i sur. (108) na temelju istraživanja na više od 13 000 uzoraka subgingivnoga plaka uočili su povezanost bakterija unutar biofilmova. Prepoznali su šest blisko povezanih skupina bakterijskih vrsta te su ih podijelili prema bojama (Slika 1.): plavi kompleks uključuje *Actinomyces*, žuti kompleks uključuje članove roda *Streptoccocus*, zeleni kompleks uključuje

vrstu *Capnocytophaga, A. actinomycetemcommitans* tipa A, *E. corrodens* i *Campylobacter concius,* ljubičasti kompleks uključuje *V. parvula* i *Actinomyces odontolyticus*. Te su skupine rani kolonizatori površine zuba, čiji rast prethodi umnažanju pretežno gram-negativnih narančastih i crvenih kompleksa. Narančasti kompleks sastoji se od *Campylobacter gracilis, C. rectus, C. showae, E. nodatum, F. nucleatum* podvrste, *F. periodonticum, P. micra, P. intermedia, P. nigrescens,* i *S. constellatus,* dok se crveni kompleks sastoji od *T. forsythia, P. gingivalis* i *T. denticola*, vrsta za koje se misli da su glavni uzročnici parodontnih bolesti.

Sama prisutnost patogenih bakterija nije dovoljna da bi se razvila klinička slika bolesti. Razvoj parodontne bolesti ovisi o istodobnome tijeku niza događaja. Okolina mora sadržavati bakterije koje pogoduju infekciji ili koje barem ne inhibiraju aktivnost patogena, a također mora pridonositi ekspresiji virulencijskih čimbenika patogena. Patogeni moraju biti prisutni u broju dovoljnome da započnu progresiju infekcije, a pritom domaćin mora biti i sistemski i lokalno osjetljiv. Čimbenici koji značajno utječu na osjetljivost domaćina pri nastanku i progresiji parodontne bolesti su imunosupresija (kod HIV infekcije), *diabetes mellitus* i pušenje.

Parodontnu infekciju pokreću specifični invazivni oralni patogeni nastanjeni u dentalnome plaku na površini zubnoga vrata i korijena (109, 110). Kod kronične parodontne bolesti mogući patogeni su često gram-negativni anaerobi, uključujući *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* i *P. Intermedia*. Lokalizirani agresivni parodontitis obično je povezan s prisutnošću *A. actinomycetemcomitans* (111, 112). Kod podložnih domaćina mikrobni virulentni čimbenici izazivaju otpuštanje enzima i upalnih citokina, koji zatim mogu dovesti do destrukcije parodontnoga tkiva. Kronični podražaj virulentnih mikrooorganizama vodi destrukciji mekih i tvrdih potpornih tkiva parodonta, uključujući i alveolarnu kost, cement korijena zuba i parodontni ligament (113). Jednom kad se parodontni džep formira i ispuni parodontnim patogenima i ostalim mikroorganizmima, proces parodontne bolesti postaje ireverzibilan. Dobra je oralna higijena ne samo od presudne važnosti za parodontno zdravlje nego i ključna za uspjeh parodontne terapije (114).

1.3.1 Pušenje i subgingivna mikrobiološka flora

Vrlo je malo istraživanja koja proučavaju utjecaj pušenja na subgingivnu floru zdravih ispitanika, a rezultati su tih istraživanja kontradiktorni. Postoje istraživanja koja su potvrdila povezanost pušenja i mikrobiološke flore kod parodontološki zdravih ispitanika, bez obzira na

to je li riječ o većemu broju različitih kolonija parodontnih patogena (115) ili smanjenom broju zaštitnih bakterija (116, 117). Iako postoje istraživanja koja nisu potvrdila povezanost pušenja i subgingivne mikrobiološke flore (118–120), rezultati većine istraživanja potvrđuju da pušenje na još nepoznat način utječe na subgingivnu mikrobiološku floru. Glavna zamjerka koja se može uputiti dosadašnjim istraživanjima odnosi se na broj ispitanih bakterijskih vrsta – najveći je broj istraživanja ispitivao 11 najčešćih parodontnih patogena (*A. actinomycetemcomitans, P. gingivialis, P. intermedia, T. forsythia, T. denticola, P. micra, F. nucleatum/periodonticum, C. rectus, E. nodatum, E. corrodens* i *Capnocytophaga spp.*).

Nekoliko je mogućih mehanizama na koji način pušenje može mijenjati uvjete za život bakterija u ustima: povećanje kiselosti sline (121), smanjivanje dostupnosti kisika (122), utjecaj na bakterijsku adherenciju na sluznice (123), antibiotsko djelovanje toksina iz dima cigarete (124) te slabljenje imunološkoga odgovora (125). Većina istraživanja navodi da pušenje pogoduje spektru anaerobnih bakterija (116, 117, 126), koje su u najvećem broju parodontni patogeni, iako postoje istraživanja koja su pokazala suprotno (127).

Mnogo je više istraživanja koja proučavaju utjecaj pušenja na subgingivnu floru ispitanika koji već imaju razvijeni neki oblik parodontitisa. Parodontitis povezan s pušenjem nije samo odraz oralne higijene pojedinca nego doprinosi stvaranju pogodnoga staništa za bakterije poput *P. gingivalis, P. intermedia* i *A. actinomycetemcommitans*, posebno u plitkim džepovima ($\leq$ 5 mm) (48). Nusproizvodi pušenja ometaju mehanizam koji normalno podržava rast zaštitne mikrobiološke flore na površini oralne sluznice (67). U pušača je općenito prisutan veći broj bakterija (128) i oni češće obolijevaju od težega stupnja bolesti nego nepušači, za što postoje tri moguća objašnjenja: 1. veća prisutnost patogene subgingivne mikrobiološke flore, 2. manja prisutnost zaštitne mikrobiološke flore (117) te 3. veća virulentnost njihove mikrobiološke flore. Zna se da pušenje vodi povećanomu riziku od bakterijskih kolonizacija površina sluznica te respiratornih infekcija. Međutim, mnogo se manje zna da pušenje može promijeniti površine sluznica, čineći ih podložnijim za vezivanje bakterija (123). Iako postoji mnoštvo studija u kojima se pokušalo rasvijetliti mogući utjecaj pušenja na bakterijski sastav plaka i parodonta, vrlo se malo zna o razlikama među mikroorganizmima mekih oralnih tkiva u pušača i nepušača (46). Čini se da ni sastav plaka ni njegova akumulacija nisu ovisni o pušačkim navikama pojedinca (46, 129).

1.4 MALDI-TOF kao proteomska tehnika identifikacije mikroorganizama

Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem strukturom i funkcijom proteina u cilju sveobuhvatne kvalitativne i kvantitativne deskripcije proteinske ekspresije, ali i njezinih promjena pod utjecajem bioloških promjena koje se događaju, primjerice, za vrijeme bolesti i liječenja (130).

MALDI-TOF (MALDI (*matrix–assisted laser desorption / ionization*) TOF (*Time of Flight*) – matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom s vremenskim proletom) masena spektrometrija tehnika je kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase i naboja. Spada u skupinu kemotaksonomskih metoda za identifikaciju mikroorganizama koje klasificiraju mikroorganizme na temelju različitosti i sličnosti u kemijskim markerima (lipidi, proteini stanice i sl.). MALDI-TOF masena spektrometrija primjenjuje se za identifikaciju mikrorganizama važnih za humanu medicinu; ona analizira ekspresiju njihovih intrizičnih proteina i uspoređuje ih s referentnom bazom. Svaki organizam ima jedinstvene proteine koji pak proizlaze iz jedinstvenih gena. Aminokiselinskom analizom proteina i točnim utvrđivanjem niza aminokiselina može se ustanoviti fina razlika među vrstama mikroorganizama. Iščitavanjem istih sekvencija upotrebom pozitivnoga i negativnoga naboja dobiva se nedvojbena potvrda iščitanih sekvencija (131). Metoda je vrlo osjetljiva i specifična i vrijeme do identifkacije iznimno je kratko.

Proteomska istraživanja već se nekoliko godina primjenjuju u istraživanjima u dentalnoj medicini. Što se tiče mikroorganizama, rađena je proteomska analiza oralnih patogena (132, 133), funkcionalnoga proteoma *S. mutansa* (134) i proteoma vanjske membrane *P. gingivalisa* (135). MALDI-TOF se pokazao iznimno učinkovit i koristan kod identifikacije anaerobnih bakterija (136 – 138). Od stanica koje su važne za funkcioniranje parodontnih tkiva istraživani su fibroblasti (139), osteoblasti (140), osteoklasti (141), cementoblasti (142) i sastav sulkusne tekućine (75). Također su istraživane bolesti zuba i usne šupljine kao što su karijes (143), Sjögrenov sindrom (144) i oralni karcinomi (145).

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Svrha je ovoga istraživanja bila izraditi mikrobiološki profil subgingivnoga prostora kod parodontološki zdravih ljudi te utvrditi postoji li povezanost pušenja i mikrobiološkoga sastava subgingivnoga prostora kod mladih pušača.

HIPOTEZA: Prevalencija bakterija veća je kod mladih pušača nego kod nepušača bez kliničkih znakova parodontne bolesti.

OPĆI CILJ: Cilj je istraživanja utvrditi povezanost pušenja i mikrobiološkoga sastava subgingivnoga prostora kod mladih pušača.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. izrada mikrobiološkoga profila subgingivnoga prostora mladih parodontološki zdravih ispitanika
2. utvrđivanje razlike u vrsti i broju bakterija kod mladih pušača i nepušača
3. utvrđivanje razlike u vrsti i broju anaerobnih bakterija kod mladih pušača i nepušača
4. utvrđivanje razlike u vrsti i broju aerobnih bakterija kod mladih pušača i nepušača
5. utvrđivanje povezanosti pojedinih bakterijskih vrsta s pušenjem kod mladih pušača

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Ustroj istraživanja

Proveli smo unicentrično, opservacijsko, primijenjeno istraživanje. Prema specifičnom ustroju riječ je o presječnome istraživanju.

3.2 Mjesto i vrijeme provođenja

Istraživanje smo provodili od rujna 2016. do siječnja 2017. godine na Katedri za farmakologiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničkom zavodu za mikrobiologiju KBC-a Zagreb i u privatnoj ordinaciji dentalne medicine.

3.3 Etička načela

Protokol je odobrilo Etičko povjerenstvo Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi ispitanici potpisom su potvrdili informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

3.4 Ispitanici

3.4.1 Ciljna populacija

Ciljnu populaciju činili su pušači oba spola u dobi od 25 do 35 godina, dobroga oralnog i sistemskog zdravlja te bez kliničkih znakova parodontne bolesti. Kontrolnu skupinu činili su nepušači istih značajka kao i pušači u ispitnoj skupini. Kriteriji neuključivanja bili su: prisutnost parodontitisa, postojanje sistemskih bolesti i uzimanje lijekova, trudnoća, manje od 20 zuba u ustima, uzimanje antibiotika u posljednjih 6 mjeseci te parodontološka ili ortodontska terapija.

3.4.2 Vrsta uzorka

Birali smo susljedni (eng. *consecutive*) uzorak prema redoslijedu dolaska u ordinaciju na pregled.

3.5 Anketni upitnik

Anketnim upitnikom za samostalno ispunjavanje prikupili smo podatke o dobi i spolu svakoga ispitanika, o pušačkim navikama – puši li, koliko dugo puši te koliko cigareta dnevno, o postojanju sistemskih bolesti, uzimanju lijekova, posebno antibiotika, koliko puta dnevno pere zube i koju zubnu pastu upotrebljava (s fluorom ili bez njega), o načinu održavanja oralne higijene (služi li se zubnim koncem i tekućinom za ispiranje usta), učestalosti i redovitosti odlaska stomatologu te o osnovnim prehrambenim navikama i konzumaciji alkoholnih pića. Anketni upitnik oblikovali smo za ovo istraživanje, tako da nije prethodno validiran – njegove su metrijske značajke bile nepoznate prije prve primjene.

3.6 Parodontološki pregled

Parodontne indekse odredili smo pomoću standardne parodontne sonde (PCP-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) i stomatološkoga zrcala. Pregled parodonta kod svih je ispitanika proveo isti iskusni doktor dentalne medicine, koji je izmjerio aproksimalni indeks plaka (API), krvarenje pri sondiranju (engl. *bleeding on probing*, BoP) (146), dubinu sondiranja (engl. probing depth, PD), recesiju gingive (RE) i razinu kliničkoga pričvrstka (engl. *clinical attachment level*, CAL). Oralnu higijenu ocijenili smo pomoću indeksa plaka po O'Learyju i sur. (*Plaque Control Record*) (147). Postojanje plaka ispitivali smo na četiri plohe svakoga zuba (vestibularno, oralno, mezijalno, distalno), na temelju čega smo incidenciju plaka izrazili prema formuli:

PI = broj mjesta s plakom / broj svih ispitanih mjesta

Slično indeksu plaka krvarenje pri sondiranju ispitali smo na četiri plohe svakoga zuba te izrazili prema formuli:

BoP = broj krvarećih mjesta / broj svih ispitanih mjesta

Pri sondiranju primijenjena je sila od 0,25 N, a dubina sondiranja definirana je kao udaljenost od slobodnoga ruba gingive do zaustavljanja sonde na dnu džepa. Sondiranje smo proveli na šest mjesta oko svakoga zuba (mezio-vestibularno, vestibularno, disto-vestibularno, mezio-oralno, oralno i disto-oralno). Recesiju gingive definirali smo kao udaljenost od caklinsko-cementnoga spojišta do slobodnoga ruba gingive te određivali vestibularno i oralno na svakome

zubu. Razinu kliničkoga pričvrstka definirali smo kao udaljenost od caklinsko-cementnoga spojišta do dna džepa, a izračunali smo je zbrajanjem vrijednosti dubine sondiranja i recesije gingive pojedine zubne plohe. Za potrebe istraživanja odredili smo su prosječne vrijednosti svih navedenih parodontnih parametara s obzirom na broj pregledanih zubi ili zubnih ploha. Parodontološki zdravim smatrali smo ispitanike koji su imali najmanje 20 zuba i kojima je PD bio manji od 4,0, BoP manji od 0,25 te koji nisu imali nijedno mjerenje dubine džepa veće ili jednako 4 mm.

3.7 Mikrobiološka analiza

Uzorke za mikrobiološku analizu uzimali smo sterilnim papirnatim endodontskim štapićima (Paper Points #40, DiaDent Europe B. V., Nizozemska). Papirnati štapić postavili smo u sulkus mezijalne plohe dvaju prvih molara (16 i 46) te nakon 30 sekundi izvadili i pohranili u transportni medij (tioglikolat bujon za anaerobne bakterije i fiziološka otopina za aerobne bakterije) te transportirali u laboratorij na mikrobiološku analizu. Mikrobiološka analiza obavljena je u laboratoriju Kliničkoga zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb, Kišptatićeva 12, Zagreb.

Uzorke smo nasadili na Columbia agar i krvni agar, koji su napravljeni prema uputama objavljenim u Difco & BBL Manualu (148). Papirante štapiće izvadili smo iz transportne podloge te njima napravili glava na podlozi, a zatim napravili dva sektora narijetko sterilnom ezom kalibriranom na 10 µl. Tako nasađene i označene podloge stavili smo u anaerobni lonac na 35 °C tijekom 48 sati. Inkubaciju podloga za aerobne bakterije radili smo u termostatu tijekom 18 – 24 sati na 36 – 37 °C. Očitavanja smo vršili nakon 24 sata te, u slučaju sterilnosti nakon prvoga očitavanja, nakon 48 sati. Porasle kolonije obradili smo prema općemu algoritmu obrade gram-pozitivnih odnosno gram-negativnih bakterija (149). Konačnu identifikaciju izolirane vrste napravili smo automatiziranim sustavom masene spektrometrije MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Njemačka).

Po jednu koloniju svake izolirane vrste izdvojili smo u kivetu po Eppendorfu i dodali 300 µl ultračiste vode pa pipetiranjem gore-dolje i vorteksiranjem dobili homogenu suspenziju. Dodali smo 900 µl 100 %-tnoga etanola te smo suspenziju vorteksirali tijekom 1 minute. Kako bi se smanjio broj živih stanica nakon dodavanja etanola, uzorke smo inkubirali tijekom 10 minuta. Otopinu etanola centrifugirali smo tijekom 2 minute pri 14 000 rpm. Supernatant iznad peleta

smo uklonili, a pelet uronili u 500 µl deionizirane vode, centifugirali suspenziju tijekom 2 minute pri 14 000 rpm. Supernatant smo uklonili i pelet uronili u 50 µl deionizirane vode te je suspenzija stavljena u peć na 95 °C tijekom 30 minuta kako bi se inaktivirali svi živi organizmi. Nakon grijanja suspenzija se ohladila na sobnu temperaturu pa smo dodali 1200 µl 100 %-tnoga etanola ohlađenog na –18 °C. Suspenziju smo promiješali i centrifugirali tijekom 2 minute pri 14 000 rpm. Supernatant smo uklonili s peleta, suspenziju opet centrifugirali te zaostali etanol pažljivo uklonili pipetiranjem. Nakon što se pelet u potpunosti osušio, dodali smo 25 µl acetonitrila. Uzorak smo vorteksirali tijekom 1 minute. Dodali smo 25 µl 70 %-tne mravlje kiseline, uzorak opet vorteksirali tijekom 5 sekundi te centrifugirali tijekom 2 minute pri 14 000 rpm. 1 µl supernatanta stavlili smo na MALDI pločicu te osušili na sobnoj temperaturi. Na osušeni supernatant na pločici dodali smo 1 µl MALDI matriksa (10 mg/l otopine α-cijano-4-hidroksi-cimetne kiseline u 50% acetonitrilu i 2.5% trifluoroctenoj kiselini).

MALDI pločicu stavili smo u MALDI-TOF maseni spektrometar na mjerenje i interpretaciju podataka. Svi uzorci bili su dvostruki, a u daljnjoj analizi uzimali smo uzorke s boljim vrijednostima rezultata pouzdanosti.

Dobiveni podatci analizirani su s pomoću softvera MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Njemačka). Softver je generirao listu detektiranih proteina koje je usporedio s referentnim molekularnim masama u MALDI Biotyper bazi podataka, koja je u tom trenutku sadržavala 5989 referentnih proteinskih spektara. Za kontrolu kvalitete i validaciju uređaja primijenili smo Brukerov bakterijski test standarda. Producirani su proteinski profili s omjerom masa/naboj (m/z) od 2000 do 20 000 Da (frekvencija lasera 60 Hz, broj snimaka po spektru: 240).

Vrijednosti rezultata pouzdanosti (*Confidence score*) veće od 2,0 smatrali smo sigurnom identifikacijom, vrijednosti rezultata pouzdanosti od 1,7 do 2,0 smatrali smo srednje pouzdanom identifikacijom, a vrijednosti rezultata pouzdanosti ispod 1,7 smatrali smo nepouzdanom identifikacijom te njih nismo uzimali u daljnju analizu.

3.8 Statistička obrada podataka

Razinu statističke značajnosti odredili smo na 5 % ($P < 0,05$) i svi intervali pouzdanosti dani su na 95 %-tnoj razini. Univarijatnu razliku u prevalenciji pojedinih bakterija između mlađih pušača i nepušača analizirali smo testom Hi-kvadrat (χ^2), a razlika u ukupnom broju bakterija

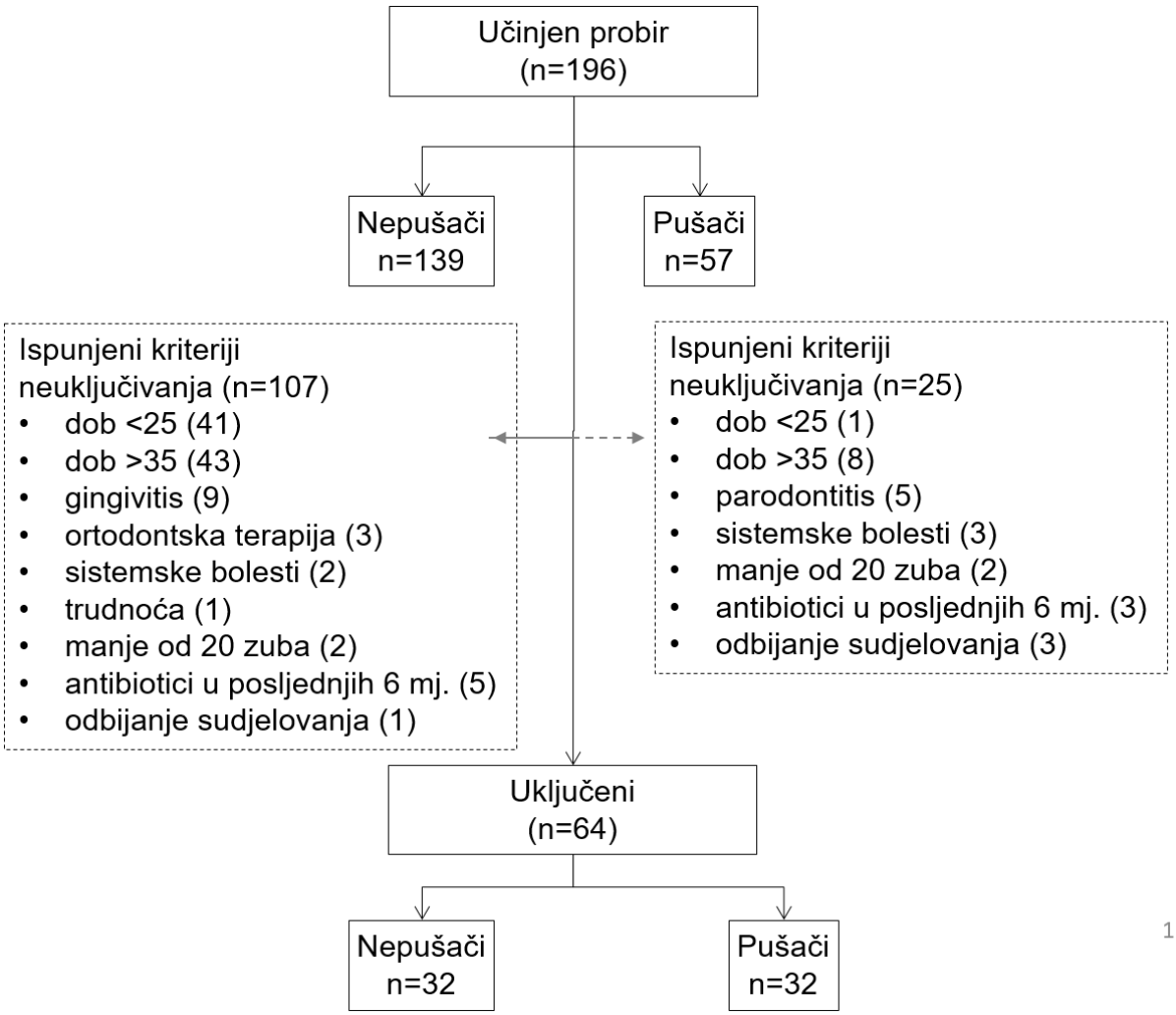
Mann-Whitneyevim U-testom. Kao standardiziranu mjeru veličine učinka za binarne varijable uzeli smo fi (φ) koeficijent povezanosti, za kategorijalne varijable s više kategorija Cramerov V, a za numeričke varijable, uz Mann-Whitney U test izračunan je r prema formuli: Z/(drugi korijen od n), gdje je Z rezultat Mann-Whitney U testa, a n broj ispitanika. Kontrolu mogućih zbunjujućih učinaka varijabli kod kojih su uočene univarijatne razlike na razini standardizirane mjere veličine učinka ≥ 0,15 – neovisno o statističkoj (ne)značajnosti – između skupina pušača i nepušača proveli smo robustnom regresijskom analizom. Normalnost raspodjela reziduala provjerili smo Shapiro Wilkovim i D'Agostinovim Omnibus testom. Postojanje serijalnih korelacija reziduala provjerili smo Durbin-Watsonovim testom, a multikolinearnosti analizom faktora inflacije varijance (> 10) te kondicijskih brojeva (> 30). Ukupnu vrijednost modela izrazili smo koeficijentom determinacije (R^2) i zbrojem kvadrata prediktivnoga modela (PRESS R^2). Statističku analizu podataka napravili smo s pomoću programa NCSS 10 Statistical Software (2015). NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.

4. REZULTATI

4.1 Ispitanici

4.1.1 Uključivanje ispitanika

Probir i provjera kriterija uključivanja i neuključivanja napravili smo na susljednome uzorku od 196 osoba koje su iz bilo kojega razloga došle na pregled u ordinaciju dentalne medicine (Slika 2). Do završetka uključivanja kriterije uključivanja i neuključivanja provjerili smo kod 139 nepušača i 57 pušača. Kriteriji neuključivanja zadovoljeni su kod 107 nepušača i kod 25 pušača. Na koncu su u istraživanje uključena 32 nepušača i 32 pušača.



Slika 2. Tijek uključivanja ispitanika

4.1.2 Sociodemografske značajke uzorka

U skupinu nepušača uključili smo 15 (46,9 %) žena, a u skupinu pušača 13 (40,6 %) žena (Tablica 1). Tih 6,3 % razlike nije bilo statistički značajno (p = 0,614). Medijan (IQR) dobi uključenih nepušača iznosio je 31 (26 – 34) godine, a uključenih pušača 30 (27 – 32) godine. Dobna razlika skupine nepušača i skupine pušača nije bila statistički značajna (p = 0,458). Ni dobne razlike između nepušača i pušača kod žena (p > 0,999) i muškaraca (p = 0,285) nisu bile statistički značajne. Nismo uočili statistički značajnu interakcija dobi i spola nepušača i pušača. Zaključujemo da su uzorci nepušača i pušača bili u dovoljnoj mjeri izjednačeni prema spolu i dobi te da nisu mogli relevantno zbunjujuće (eng. *confounding*) djelovati na rezultate naših glavnih analiza.

Tablica 1. Značajke uzorka ispitanika

	Nepušači (n = 32)	Pušači (n = 32)	p	φ
Spol				
ženski	15 (46,9)	13 (40,6)	0,614	0,06
muški	17 (53,1)	19 (59,4)		
Dob (godine), medijan (IQR)	31 (26 – 34)	30 (27 – 32)	0,458	0,09
Dob (godine) prema spolu, medijan (IQR)				
ženski	31 (26 – 33)	29 (28 – 32)	> 0,999	0,00
muški	32 (26 – 34)	30 (26 – 32)	0,285	0,18

Ako nije drukčije označeno, podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika.

Kratice: p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, test Hi-kvadrat ($\chi 2$) kod kategorijalnih varijabli, Mann-Whitneyev U-test kod numeričkih varijabli; Učinak = fi (φ) koeficijent povezanosti kod binarnih varijabli, Cramerov V koeficijent povezanosti kod nominalnih varijabli s više od dvije kategorije, r kod numeričkih varijabli; IQR = interkvartilni raspon.

4.1.3 Parodontni status

Uzorak nepušača i pušača bio je dobro izjednačen prema parodontnome statusu (Tablica 2).

Tablica 2. Parodontni status

	Nepušači (n = 32)	Pušači (n = 32)	p	φ
API	0,18 (0,13 – 0,22)	0,15 (0,10 – 0,22)	0,519	0,08
BoP	0,21 (0,16 – 0,24)	0,19 (0,08 – 0,24)	0,292	0,13
PPD (mm)	2,42 (2,32 – 2,49)	2,50 (2,26 – 2,65)	0,248	0,15
Re (mm)	0,18 (0,11 – 0,26)	0,14 (0,03 – 0,34)	0,431	0,10
CAL (mm)	2,47 (2,35 – 2,55)	2,56 (2,30 – 2,72)	0,126	0,19

Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).

Kratice: API = aproksimalni indeks plaka; BoP = krvarenje pri sondiranju; PPD = dubina parodontnoga džepa; Re = retrakcija gingive; CAL = razina kliničkoga pričvrstka; p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, test Hi-kvadrat (χ^2) kod kategorijalnih varijabli, Mann-Whitneyev U-test kod numeričkih varijabli; Učinak (φ) – koeficijent povezanosti kod binarnih varijabli, Cramerov V koeficijent povezanosti kod nominalnih varijabli s više od dvije kategorije, r kod numeričkih varijabli; IQR = interkvartilni raspon.

4.1.4 Navike pušenja

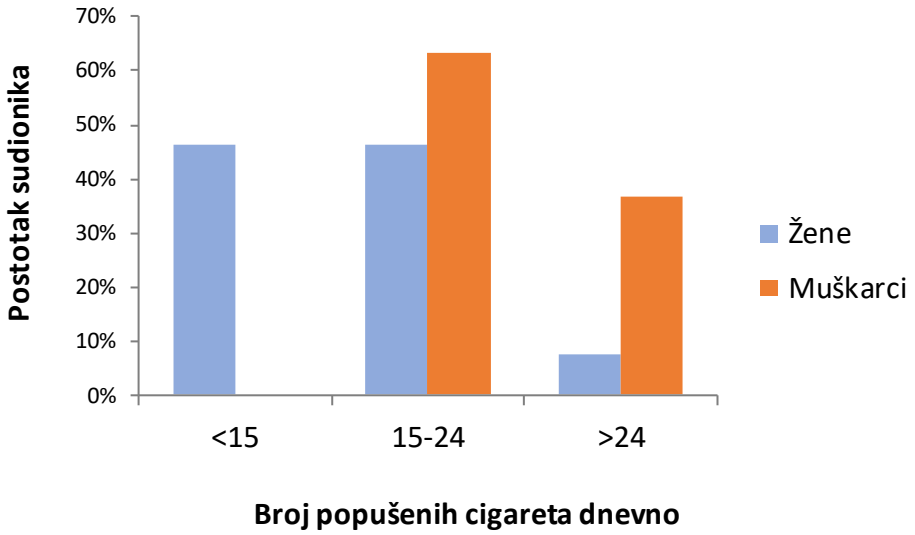
Većina pušača pušila je redovito (Tablica 3). Raspon trajanja pušenja u skupini pušača bio je od 2 do 20 godina, a medijan (IQR) je bio 12 (8 – 15) godina. Iako razlika u medijanu trajanja pušenja između muškaraca i žena nije bila statistički značajna (Mann-Whitneyev test, U = 86,5; Z = –1,43; p = 0,154; r = 0,25) njezin apsolutni iznos na razini ovoga konkretnoga uzorka mogao je zbunjujuće djelovati na naše glavne rezultate. Trajanje pušenja kod žena iznosilo je 8 (7 – 14) (medijan (IQR)) godina, a kod muškaraca 12 (10 – 15) godina (Tablica 3, Slika 3). S obzirom na to da su žene i muškarci bili usporedive dobi, ovaj nalaz vjerojatno upućuje na raniju dob početka pušenja kod muškaraca. S obzirom na to da trajanje pušenja može biti povezano sa subgingivalnim mikrobiološkim sastavom kod mladih ljudi, odlučili smo u glavnim analizama statistički kontrolirati eventualni zbunjujući utjecaj interakcije spola i trajanja pušenja.

Tablica 3. Navike pušenja u uzorku pušača (n = 32)

	n (%)	(95% CI)
Redovitost pušenja		
povremeno	1 (3,1)	(0,0 – 11,4)
redovito	31 (96,9)	(88,6 – 100,0)
Trajanje pušenja (godine), medijan (IQR)	12 (8 – 15)	(10 – 13)
Trajanje pušenja (godine) prema spolu, medijan (IQR)		
ženski	8 (7 – 14)	(7 – 13)
muški	12 (10 – 15)	(10 – 14)
Broj popušenih cigareta dnevno		
< 5	1 (3,1)	(0,0 – 10,0)
5 – 14	5 (15,6)	(3,3 – 28,6)
15 – 25	18 (56,3)	(37,5 – 73,3)
25 – 34	6 (18,8)	(6,1 – 33,3)
≥ 35	2 (6,3)	(0,0 – 15,6)

Ako nije drukčije označeno, podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika.

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; 95 % CI = 95 %-tni interval pouzdanosti medijana.



Slika 3. Broj popušenih cigareta dnevno prema spolu; samo pušači (n = 32)

4.1.5 Dentalna medicinska zaštita

Između nepušača i pušača nije uočena razlika koja bi mogla zbunjujuće djelovati na rezultate naših glavnih analiza (Tablica 4).

Tablica 1. Učestalost stomatoloških pregleda

	Nepušači (n=32)	Pušači (n=32)	p	Učinak
Učestalost stomatoloških pregleda				
barem jednom godišnje	20 (62,5)	21 (65,6)	0,906	0,09
barem jednom svake dvije godine	6 (18,8)	5 (15,6)		
barem jednom svake tri godine	5 (15,6)	4 (12,5)		
rjeđe od jednom svake tri godine	1 (3,1)	2 (6,3)		

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika.

Kratice: p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, test Hi-kvadrat (χ^2); Učinak = Cramerov V koeficijent povezanosti.

4.1.6 Oralna higijena

Učestalost pranja zuba bila je usporediva između nepušača i pušača (Tablica 5). Razlika nije bila statistički značajna (p = 0,545; φ = 0,08) niti je svojim apsolutnim iznosom bila dovoljna da bi na razini ovoga konkretnog uzorka zbunjujuće djelovala na rezultate povezanosti pušenja sa subgingivalnim mikrobiološkim sastavom kod mladih ljudi. Učestalost tvrdih četkica za zube nije bila statistički značajno različita u naše dvije istraživane skupine (p = 0,231), ali je prevalencija srednje tvrdih i tvrdih četkica bila nezanemarivo veća u uzorku pušača, 19 (59,4 %), nego u uzorku nepušača 13 (40,6 %). Ako je tvrdoća četkice za zube povezana sa subgingivalnim mikrobiološkim sastavom, odnosno brojem bakterija, mogući zbunjujući utjecaj te varijable bit će potrebno statistički kontrolirati. Način pranja zuba nije se relevantno razlikovao kod nepušača i pušača, kao ni vrsta paste za zube. Uporaba paste za zube s fluoridima bila je jednako učestala u obje skupine. Postojala je statistički neznačajna (p = 0,276) razlika između nepušača i pušača u znanju o tome upotrebljavaju li pastu za zube s fluoridima ili bez njih. Zbog te razlike u znanju razlikovala se i iskazana učestalost uporabe paste za zube bez fluorida. Takav rezultat posredno upućuje i na slabiju valjanost odgovora na pitanje upotrebljavaju li ispitanici pastu za zube s fluoridima. Čini se, naime, kako dio ispitanika koji ne znaju pouzdano odgovoriti na ovo pitanje, pretpostavlja da njihova pasta za zube sadržava

fluoride. U suprotnome bi se razlika u broju ispitanika koji ne znaju sadržava li njihova pasta za zube fluoride, podjednako odrazila i na obje vrste pasti za zube. Zbog nedovoljnih razlika između dvije skupine te zbog indicirane slabije valjanosti odgovora ovom se varijablom nećemo koristiti u daljnjim analizama. Nepušači iz našega uzorka češće su, barem katkad, upotrebljavali zubni konac i/ili interdentalne četkice – 23 (71,9 %), nego pušači – 17 (53,1 %). Iako ta razlika nije bila statistički značajna (test Hi-kvadrat, $\chi^2 = 2{,}40$; ss = 1; p = 0,121; $\varphi = 0{,}19$), ona je dovoljno velika da bi na razini ovoga konkretnog uzorka mogla zbunjujuće djelovati na naše glavne rezultate ako postoji povezanost upotrebe zubnoga konca i/ili interdentalnih četkica s brojem i vrstom bakterija. Nismo uočili relevantnih razlika u učestalosti uporabe tekućih sredstava za ispiranje i higijenu usta (antiseptika) kod nepušača i pušača u našem uzorku.

Tablica 5. Oralna higijena

	Nepušači (n = 32)	Pušači (n = 32)	p	Učinak
Učestalost pranja zuba				
do jednom dnevno	6 (18,8)	8 (25,0)	0,545	0,08
dvaput dnevno ili češće	26 (81,3)	24 (75,0)		
Vrsta četkice za zube				
mekana	19 (59,4)	13 (40,6)	0,231	0,21
srednje tvrda	13 (40,6)	18 (56,3)		
tvrda	0 (0,0)	1 (3,1)		
Način pranja zuba				
horizontalno	8 (25,0)	6 (18,8)	0,831	0,15
vertikalno	1 (3,1)	0 (0,0)		
uvijek i horizontalno i vertikalno	9 (28,1)	10 (31,3)		
nekada horizontalno, nekada vertikalno	6 (18,8)	7 (21,9)		
kružno	8 (25,0)	9 (28,1)		
Vrsta paste za zube				
s fluoridima	14 (43,8)	14 (43,8)	0,276	0,20
bez fluorida	6 (18,8)	2 (6,3)		
ne znaju	12 (37,5)	16 (50,0)		
Učestalost uporabe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice				
nikada	9 (28,1)	15 (46,9)	0,121	0,19
barem povremeno	23 (71,9)	17 (53,1)		
Učestalost uporabe tekućih sredstava za ispiranje i higijenu usta (antiseptika)				
nikada	15 (46,9)	17 (53,1)	0,617	0,06
barem povremeno	17 (53,1)	15 (46,9)		

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika.

Kratice: p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, test Hi-kvadrat (χ^2); Učinak = fi (φ) koeficijent povezanosti kod binarnih varijabli, Cramerov V koeficijent povezanosti kod nominalnih varijabli s više od dvije kategorije.

4.1.7 Prehrambene navike

Uočili smo nekoliko relevantnih razlika u prehrambenim navikama nepušača i pušača (Tablica 6). Prije svega to je bila razlika u učestalosti konzumacije crne kave. U skupini pušača njih 27 (84,4 %) konzumiralo je crnu kavu svakodnevno ili više puta dnevno, dok je u skupini nepušača tako učestalih konzumenata crne kave bilo upola manje, 14 (43,8 %). Ta je razlika bila statistički značajna ($p = 0,009$; Cramerov $V = 0,43$). Pušači su u mjeri relevantnoj za naš predmet istraživanja češće nego nepušači konzumirali i zaslađena gazirana pića, pivo, žestoka alkoholna pića i negazirane voćne sokove.

Tablica 6. Učestalost konzumacije

	Nepušači (n = 32)	Pušači (n = 32)	p	Učinak
Crna kava				
nikada	9 (28,1)	3 (9,4)	0,009	0,43
rjeđe od jednom tjedno	5 (15,6)	1 (3,1)		
nekoliko puta tjedno	4 (12,5)	1 (3,1)		
jednom dnevno ili češće	14 (43,8)	27 (84,4)		
Crni ili zeleni čaj				
nikada	9 (28,1)	10 (31,3)	0,679	0,15
rjeđe od jednom tjedno	15 (46,9)	16 (50,0)		
nekoliko puta tjedno	3 (9,4)	4 (12,5)		
jednom dnevno ili češće	5 (15,6)	2 (6,3)		
Vino				
nikada	7 (21,9)	6 (18,8)	0,552	0,18
rjeđe od jednom tjedno	21 (65,6)	20 (62,5)		
nekoliko puta tjedno	4 (12,5)	4 (12,5)		
jednom dnevno ili češće	0 (0,0)	2 (6,3)		
Pivo				
nikada	9 (28,1)	7 (21,9)	0,142	0,29
rjeđe od jednom tjedno	17 (53,1)	12 (37,5)		
nekoliko puta tjedno	4 (12,5)	12 (37,5)		
jednom dnevno ili češće	2 (6,3)	1 (3,1)		
Žestoka alkoholna pića				
nikada	10 (31,3)	4 (12,5)	0,187	0,23
rjeđe od jednom tjedno	20 (62,5)	26 (81,3)		
nekoliko puta tjedno	2 (6,3)	2 (6,3)		
jednom dnevno ili češće	0 (0,0)	0 (0,0)		
Slatkiši (čokolada, kolači, bomboni i sl.)				
nikada	1 (3,1)	1 (3,1)	0,993	0,04
rjeđe od jednom tjedno	8 (25,0)	9 (28,1)		
nekoliko puta tjedno	17 (53,1)	16 (50,0)		
jednom dnevno ili češće	6 (18,8)	6 (18,8)		
Zaslađena, gazirana pića				
nikada	10 (31,3)	2 (6,3)	0,075	0,33
rjeđe od jednom tjedno	8 (25,0)	13 (40,6)		
nekoliko puta tjedno	10 (31,3)	13 (40,6)		
jednom dnevno ili češće	4 (12,5)	4 (12,5)		
Negazirani voćni sokovi				
nikada	2 (6,3)	1 (3,1)	0,489	0,20
rjeđe od jednom tjedno	19 (59,4)	14 (43,8)		
nekoliko puta tjedno	8 (25,0)	13 (40,6)		
jednom dnevno ili češće	3 (9,4)	4 (12,5)		

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika.

Kratice: p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, test Hi-kvadrat (χ^2); Učinak = Cramerov V koeficijent povezanosti.

4.2 Oralna mikrobiološka flora kod svih ispitanika

4.2.1 Popis svih identificiranih vrsta bakterija

U cjelokupnome smo istraživanju pronašli 63 različite bakterijske vrste. U Tablici 7 nabrojane su sve pronađene vrste, klasificirane prema koljenu, razredu, redu, porodici, rodu i vrsti.

Tablica 7. Popis svih pronađenih vrsta bakterija

Koljeno	**Actinobacteria**			
Razred	Actinobacteria			Coriobacteria
Red	Actinmycetales			Coriobacteriales
Porodica	Actinomycetaceae	Propionibacteriaceae	Micrococcaceae	Atopobiaceae
Rod	Actinomyces	Propionibacterium	Rothia	Atopobium
Vrste	A. meyeri A. odontolyticus A. oris	P. acnes	R. aeria R. dentocariosa R. mucilaginosa	A. parvulum
Koljeno	**Proteobacteria**			
Razred	Betaproteobacteria	Gammaproteobacteria		Epsilonproteobacteria
Red	Neisseriales	Pasteurellales		Campylobacterales
Porodica	Neisseriaceae	Pasteurellaceae		Campylobacteraceae
Rod	Neisseria	Aggregatibacter	Haemophilus	Campylobacter
Vrste	N. bacilliformis N. elongata N. flavens N. macacae N. mucosa	A. aphrophilus	H. parainfluenzae	C. concisus C. showae
Koljeno	**Bacteroidetes**		**Fusobacteria**	
Razred	Flavobacteriia	Bacteroidia	Fusobacteria	
Red	Flavobacteriales	Bacteroidales	*Fusobacteriales*	
Porodica	Flavobacteriaceae	Prevotellaceae	Fusobacteriaceae	Leptotrichiaceae
Rod	Capnocytophaga	Prevotella	Fusobacterium	Leptotrichia
Vrste	C. gingivalis C. granulosa C. ochracea C. sputigena	P. buccae P. dentalis P. denticola P. intermedia P. loescheii P. melaninogenica P. nigrescens Prevotella spp.	F. canifelinum F. naviforme F. nucleatum F. periodonticum	L. trevisanii L. wadei

Koljeno	**Firmicutes**				
Razred	Bacilli				
Red	Lactobacillales			Bacillales	
Porodica	Enterococcaceae	Lactobacillaceae	Streptococcaceae	Bacillales Family XI. Incertae Sedis	Staphylococcaceae
Rod	Enterococcus	Lactobacillus	Streptococcus	Gemella	Staphylococcus
Vrsta	E. faecalis	L. salivarius	S. anginosus S. cristatus S. gordonii S. intermedius S. mitis S. mutans S. oralis S. parasanguinis S. pneumoniae S. salivarius S. sanguinis S. vestibularis	G. bergeri G. haemolysans G. morbillorum	S. aureus S. capitis S. epidermidis S. hominis S. lugdunensis
Razred	Clostridia	Tissierellia	Negativicutes		
Red	Clostridiales	Tissierellales	Vellionellales		
Porodica	Clostridiales Family XIII. Incertae Sedis	Peptoniphilaceae	Veillonellaceae		
Rod	Eubacterium	Parvimonas	Veillonella		
Vrsta	E. brachy	P. micra	V. atypica V. dispar V. parvula V. rogosae		

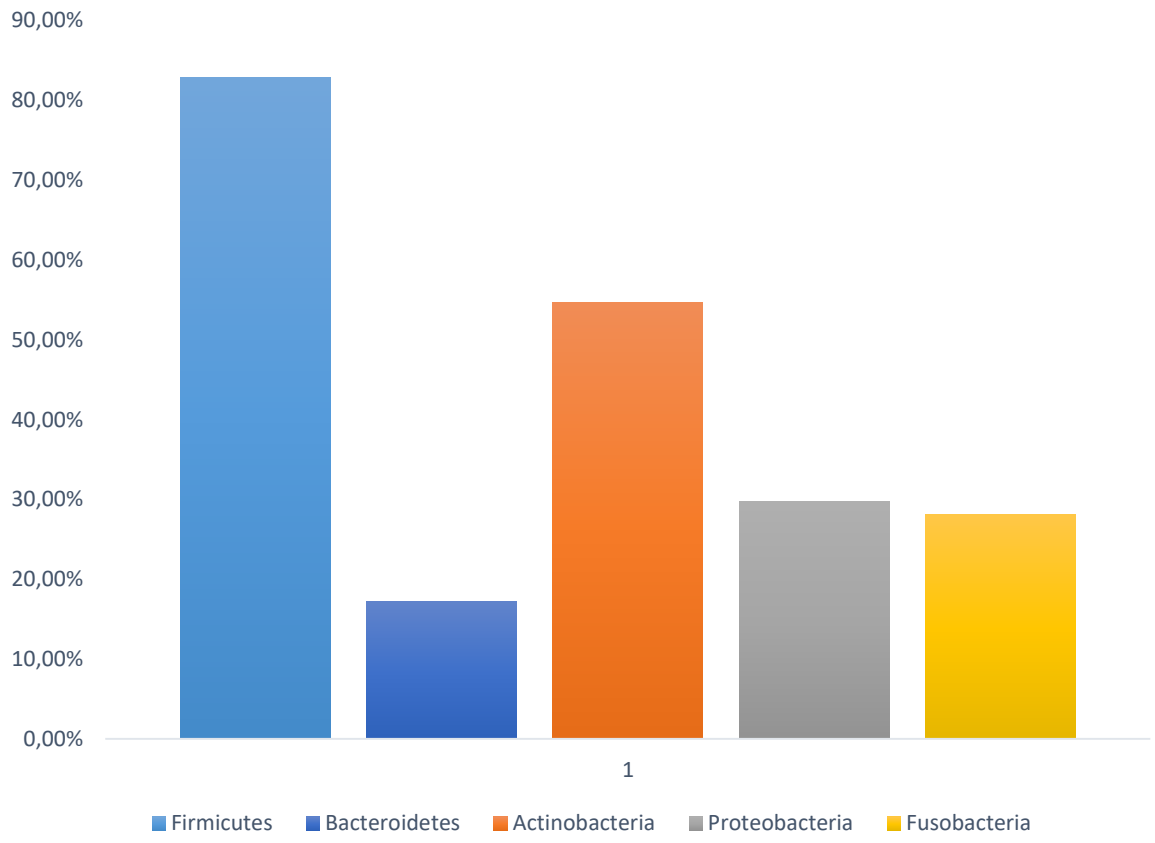
4.2.2 Prevalencija bakterija po koljenima

Prevalencija identificiranih bakterija po koljenima kod svih ispitanika te njihov udio prikazani su u Tablici 8 i na Slici 4.

Tablica 8. Prevalencija bakterija po koljenima kod svih ispitanika

Koljeno	**n**	**(%)**
Firmicutes	53	(82,8)
Actinobacteria	35	(54,6)
Proteobacteria	19	(29,6)
Fusobacteria	18	(28,1)
Bacteroidetes	11	(17,1)

n – broj ispitanika kod kojih je pronađena bakterija



Slika 4. Prevalencija bakterija po koljenima kod svih ispitanika

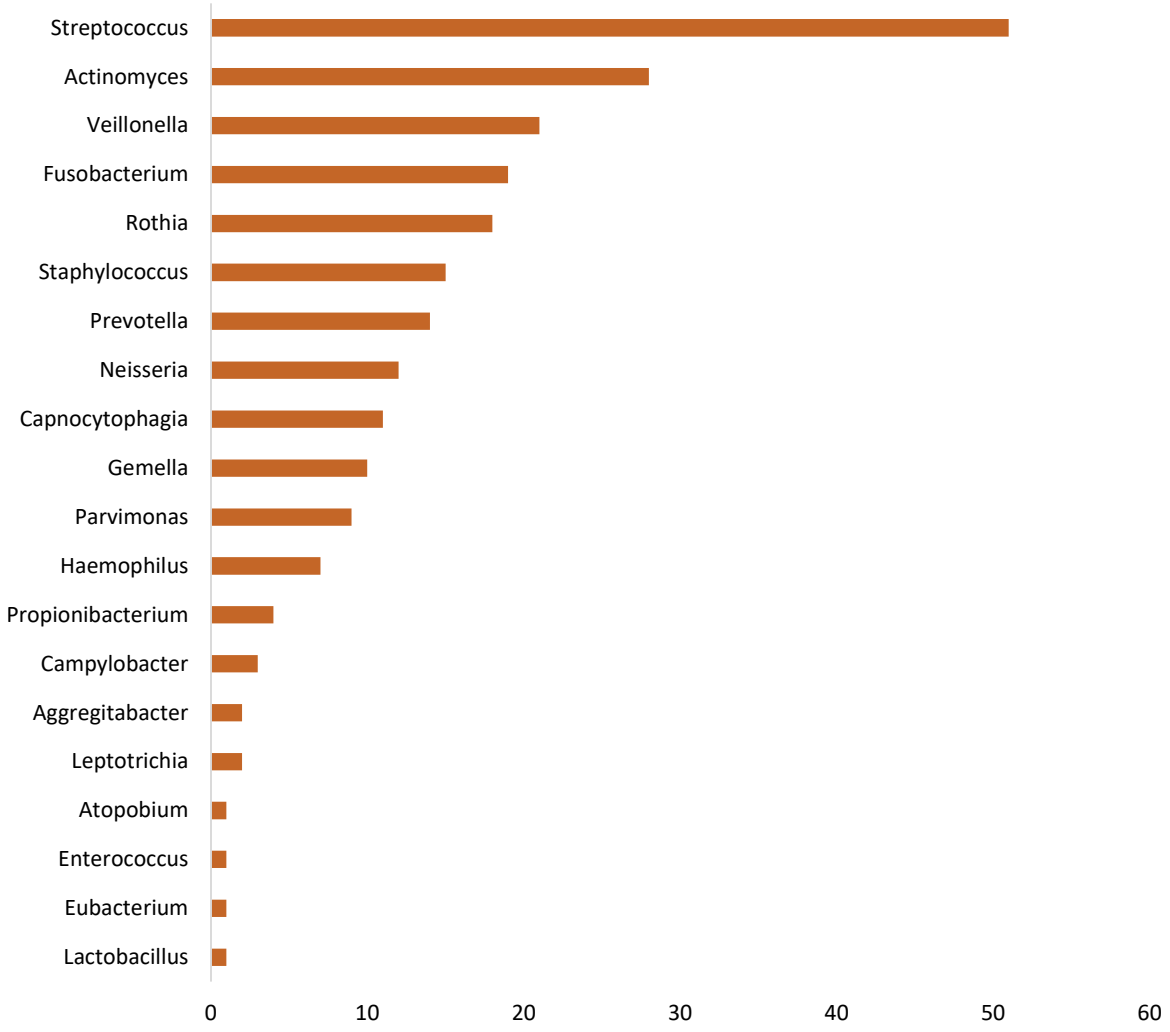
4.2.3 Prevalencija bakterija po rodovima

Prevalencija identificiranih bakterija po rodovima kod svih ispitanika te njihov udio prikazani su u Tablici 9 i na Slici 5.

Tablica 9. Prevalencija bakterija po rodovima kod svih ispitanika

Rod	n	(%)
Streptococcus	51	(79,6)
Actinomyces	28	(43,7)
Veillonella	21	(32,8)
Fusobacterium	19	(29,6)
Rothia	18	(28,1)
Staphylococcus	15	(23,4)
Prevotella	14	(21,8)
Neisseria	12	(18,7)
Capnocytophagia	11	(17,1)
Gemella	10	(15,6)
Parvimonas	9	(14,0)
Haemophilus	7	(10,9)
Propionibacterium	4	(6,2)
Campylobacter	3	(4,6)
Aggregitabacter	2	(3,1)
Leptotrichia	2	(3,1)
Atopobium	1	(1,5)
Enterococcus	1	(1,5)
Eubacterium	1	(1,5)
Lactobacillus	1	(1,5)

n – broj ispitanika kod kojih je pronađena bakterija



Slika 5. Prevalencija bakterija po rodovima kod svih ispitanika

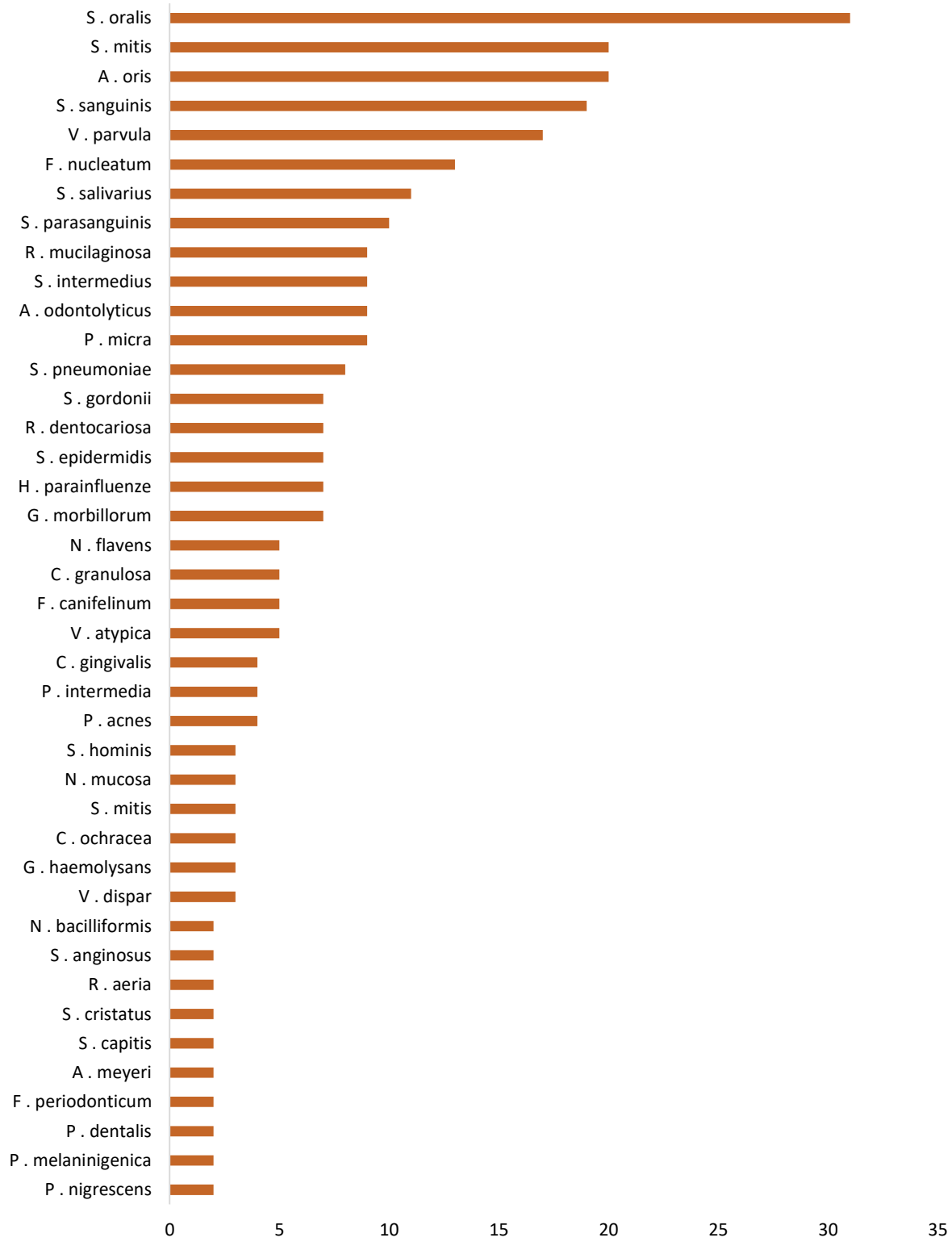
4.2.4 Prevalencija bakterija po vrstama

Prevalencija bakterija kod svih ispitanika prikazana je u Tablici 10 i na Slici 6.

Tablica 10. Prevalencija bakterija po vrstama kod svih ispitanika

Bakterijska vrsta	**n**	**(%)**	**Bakterijska vrsta**	**n**	**(%)**
S. oralis	31	(48,44)	S. cristatus	2	(3,13)
S. mitis	20	(31,25)	S. capitis	2	(3,13)
A. oris	20	(31,25)	A. meyeri	2	(3,13)
S. sanguinis	19	(29,69)	F. periodonticum	2	(3,13)
V. parvula	17	(26,56)	P. dentalis	2	(3,13)
F. nucleatum	13	(20,31)	P. melaninigenica	2	(3,13)
S. salivarius	11	(17,19)	P. nigrescens	2	(3,13)
S. parasanguinis	10	(15,63)	P. spp	2	(3,13)
R. mucilaginosa	9	(14,06)	A. aphrophilus	1	(1,56)
S. intermedius	9	(14,06)	S. vestibularis	1	(1,56)
A. odontolyticus	9	(14,06)	C. showae	1	(1,56)
P. micra	9	(14,06)	E. faecalis	1	(1,56)
S. pneumoniae	8	(12,5)	N. elongata	1	(1,56)
S. gordonii	7	(10,94)	N. macacae	1	(1,56)
R. dentocariosa	7	(10,94)	S. aureus	1	(1,56)
S. epidermidis	7	(10,94)	S. lugdunensis	1	(1,56)
H. parainfluenze	7	(10,94)	S. cristatus	1	(1,56)
G. morbillorum	7	(10,94)	S. mutans	1	(1,56)
N. flavens	5	(7,81)	A. aphrophilus	1	(1,56)
C. granulosa	5	(7,81)	A. parvulum	1	(1,56)
F. canifelinum	5	(7,81)	C. concisus	1	(1,56)
V. atypica	5	(7,81)	C. showae	1	(1,56)
C. gingivalis	4	(6,25)	C. sputigena	1	(1,56)
P. intermedia	4	(6,25)	E. brachy	1	(1,56)
P. acnes	4	(6,25)	F. naviforme	1	(1,56)
S. hominis	3	(4,69)	G. bergeri	1	(1,56)
N. mucosa	3	(4,69)	L. salivarius	1	(1,56)
S. mitis	3	(4,69)	L. trevisanii	1	(1,56)
C. ochracea	3	(4,69)	L. wadei	1	(1,56)
G. haemolysans	3	(4,69)	P. buccae	1	(1,56)
V. dispar	3	(4,69)	P. denticola	1	(1,56)
N. bacilliformis	2	(3,13)	P. loescheii	1	(1,56)
S. anginosus	2	(3,13)	V. rogosae	1	(1,56)
R. aeria	2	(3,13)			

n – broj ispitanika kod kojih je pronađena bakterija.

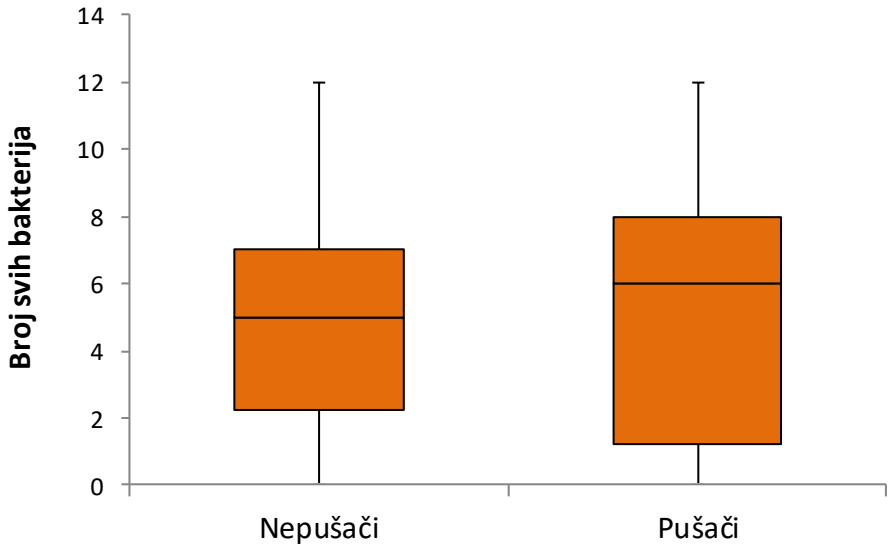


Slika 6. Prevalencija bakterija po vrstama kod svih ispitanika.

4.3 Broj bakterija kod pušača i nepušača

4.3.1 Broj bakterija (univarijatna analiza)

U uzorku nepušača medijan (IQR) ukupnoga broja bakterija iznosio je 5 (2 – 7), a u uzorku pušača 6 (1 – 8) (Slika 7). Mann-Whitney U test nije pokazao statistički značajnu razliku u broju bakterija između nepušača i pušača (Mann-Whitneyev test, U = 454,5; Z = –0,78; p = 0,437; r = 0,10).



Slika 7. Ukupan broj svih bakterija (anaerobnih i aerobnih) kod nepušača i pušača; crta u sredini pravokutnika predstavlja medijan, granice pravokutnika interkvartilni raspon, a krajevi crta najniži i najviši rezultat.

4.3.2 Povezanost broja bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima

Ukupan broj svih bakterija bio je statistički značajno univarijatno povezan s vrstom četkice za zube (Tablica 11). Ispitanici koji upotrebljavaju mekanu četkicu za zube imali su više bakterija od ispitanika koji upotrebljavaju srednje tvrdu ili tvrdu četkicu. Iako način pranja zuba nije bio statistički značajno povezan s ukupnim brojem svih bakterija, na razini ovoga uzorka ta je povezanost bila dovoljno visoka da je mogla imati nezanemariv zbunjujući učinak. Ispitanici koji zube peru vertikalno ili uvijek i vertikalno i horizontalno ili pak kružno, imali su manje bakterija od onih koji zube peru uvijek ili barem povremeno samo horizontalno. Mogući relevantan zbunjujući učinak uočili smo još samo u slučajevima konzumacije crne kave i vina. U oba slučaja povezanost je bila pozitivna: učestalija konzumacija tih dvaju napitka bila je povezana s većim brojem svih bakterija.

Tablica 11. Povezanost broja bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima

	n	Medijan (IQR)	p	Učinak
Spol				
ženski	28	5 (2 – 8)	0,822	0,03
muški	36	5 (2 – 7)		
Dob (godine)	64	-0,16	0,209	
Trajanje pušenja (godine)*	64	0,13	0,291	
Broj popušenih cigareta dnevno				
nepušači (0 cigareta)	32	5 (2 – 7)	0,247	0,05
< 15	6	6 (1 – 8)		
15-24	18	6 (1 – 7)		
≥ 24	8	8 (5 – 9)		
Učestalost stomatoloških pregleda				
rjeđe od jednom godišnje	23	6 (0 – 8)	0,767	0,04
barem jednom godišnje	41	5 (3 – 7)		
Učestalost pranja zuba				
do jednom dnevno	14	5 (2 – 8)	0,630	0,06
dvaput dnevno ili češće	50	6 (2 – 7)		
Vrsta četkice za zube				
mekana	32	6 (4 – 8)	0,043	0,25
srednje tvrda ili tvrda	32	5 (0 – 7)		
Način pranja zuba				
uvijek ili povremeno samo horizontalno	27	6 (3 – 8)	0,092	0,21
vertikalno; uvijek i vertikalno i horizontalno; kružno	37	5 (2 – 7)		

Nastavak tablice	n	Medijan (IQR)	p	Učinak
Učestalost uporabe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice				
nikada	24	6 (3 – 7)	0,955	0,01
barem povremeno	40	5 (2 – 8)		
Učestalost uporabe tekućih sredstava za ispiranje i higijenu usta				
nikada	32	6 (1 – 7)	0,651	0,06
barem povremeno	32	5 (3 – 8)		
Crna kava				
rjeđe od jednom dnevno	23	5 (1 – 6)	0,123	0,19
jednom dnevno ili češće	41	6 (4 – 8)		
Crni ili zeleni čaj				
rjeđe od jednom tjedno	50	6 (2 – 7)	0,433	0,10
jednom tjedno ili češće	14	4 (2 – 8)		
Vino				
rjeđe od jednom tjedno	54	5 (2 – 7)	0,166	0,17
jednom tjedno ili češće	10	7 (4 – 9)		
Pivo				
rjeđe od jednom tjedno	45	5 (2 – 8)	0,569	0,07
jednom tjedno ili češće	19	6 (2 – 7)		
Žestoka alkoholna pića				
nikada	14	5 (1 – 7)	0,343	0,12
barem povremeno	45	6 (2 – 7)		
Slatkiši				
rjeđe od jednom tjedno	19	5 (2 – 7)	0,819	0,03
jednom tjedno ili češće	45	5 (3 – 8)		
Zaslađena, gazirana pića				
rjeđe od jednom tjedno	33	6 (3 – 8)	0,670	0,05
jednom tjedno ili češće	31	5 (2 – 7)		
Negazirani voćni sokovi				
rjeđe od jednom tjedno	36	5 (2 – 7)	0,337	0,12
jednom tjedno ili češće	28	6 (2 – 8)		

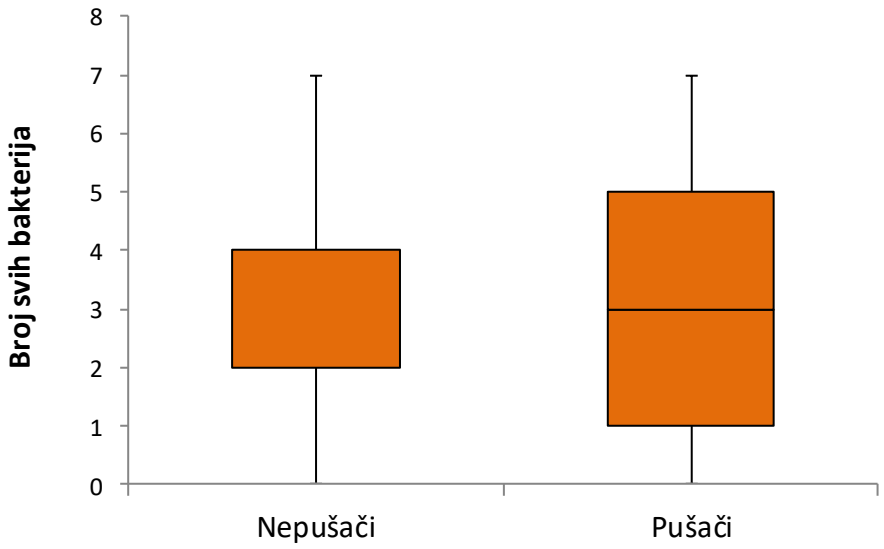
Podatci su prikazani kao medijan (IQR) kod kategorijalnih varijabli te kao Spearmanov koeficijent korelacije ranga (ρ) kod numeričih varijabli.

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Mann-Whitneyev U-test kod binarnih varijabli; Jonckheere-Terpstrin test kod ordinalnih varijabli; Učinak = r kod binarnih varijabli; η^2 kod ordinalnih varijabli.

* Nepušačima je trajanje pušenja = 0 godina

4.3.3 Broj aerobnih bakterija

U uzorku nepušača medijan (IQR) ukupnoga broja aerobnih bakterija iznosio je 2 (2 – 4), a u uzorku pušača 3 (1 – 5) (**Slika** Slika 8). Mann-Whitneyev U-test nije pokazao statistički značajnu razliku u broju aerobnih bakterija između nepušača i pušača (Mann-Whitney test, U = 483,5; Z = -0,39; p = 0,698; r = 0,05).



Slika 8. Ukupan broj aerobnih bakterija kod nepušača i pušača; crta u sredini pravokutnika predstavlja medijan, granice pravokutnika interkvartilni raspon, a krajevi crta najniži i najviši rezultat.

4.3.4 Povezanost broja aerobnih bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima

Broj aerobnih bakterija bio je statistički značajno povezan s načinom pranja zuba (Tablica 12). Ispitanici koji su zube prali vertikalno ili uvijek i vertikalno i horizontalno, odnosno kružno, imali su manje bakterija od ispitanika koji su zube prali uvijek ili povremeno samo horizontalno. Češća konzumacija crne kave bila je statistički značajno povezana s brojem aerobnih bakterija. Povezanosti s brojem aerobnih bakterija koje nisu bile statistički značajne, ali ih je bilo nužno statistički kontrolirati zbog mogućega zbunjujućeg utjecaja na rezultate naše glavne analize, bile su učestalost uporabe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice i konzumacija vina.

Tablica 12. Povezanost broja aerobnih bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima

	n	Medijan (IQR)	p	Učinak
Spol				
ženski	28	3 (1 – 4)	0,387	0,11
muški	36	3 (2 – 5)		
Dob (godine)	64	-0,11	0,400	
Trajanje pušenja (godine)*	64	0,10	0,447	
Broj popušenih cigareta dnevno				
nepušači (0 cigareta)	32	2 (2 – 4)	0,376	0,05
< 15	6	2 (1 – 4)		
15-24	18	3 (1 – 4)		
≥ 24	8	4 (3 – 6)		
Učestalost stomatoloških pregleda				
rjeđe od jednom godišnje	23	3 (0 – 5)	0,755	0,04
barem jednom godišnje	41	3 (2 – 4)		
Učestalost pranja zuba				
do jednom dnevno	14	3 (1 – 5)	0,604	0,07
dvaput dnevno ili češće	50	3 (1 – 4)		
Vrsta četkice za zube				
mekana	32	3 (2 – 4)	0,369	0,11
srednje tvrda ili tvrda	32	3 (0 – 5)		
Način pranja zuba				
uvijek ili povremeno samo horizontalno	27	4 (2 – 5)	0,019	0,29
vertikalno; uvijek i vertikalno i horizontalno; kružno	37	2 (1 – 3)		
Učestalost uporabe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice				
nikada	24	3 (2 – 5)	0,119	0,20
barem povremeno	40	2 (1 – 4)		

Nastavak tablice	n	Medijan (IQR)	p	Učinak
Učestalost uporabe tekućih sredstava za ispiranje i higijenu usta				
nikada	32	3 (1 – 4)	0,605	0,07
barem povremeno	32	3 (2 – 5)		
Crna kava				
rjeđe od jednom dnevno	23	2 (1 – 3)	0,025	0,28
jednom dnevno ili češće	41	3 (2 – 5)		
Crni ili zeleni čaj				
rjeđe od jednom tjedno	50	3 (1 – 5)	0,344	0,12
jednom tjedno ili češće	14	2 (2 – 3)		
Vino				
rjeđe od jednom tjedno	54	3 (1 – 4)	0,060	0,24
jednom tjedno ili češće	10	5 (2 – 5)		
Pivo				
rjeđe od jednom tjedno	45	3 (1 – 4)	0,507	0,08
jednom tjedno ili češće	19	3 (1 – 5)		
Žestoka alkoholna pića				
nikada	14	3 (1 – 4)	0,754	0,04
barem povremeno	45	3 (1 – 4)		
Slatkiši				
rjeđe od jednom tjedno	19	3 (1 – 4)	0,639	0,06
jednom tjedno ili češće	45	3 (2 – 5)		
Zaslađena, gazirana pića				
rjeđe od jednom tjedno	33	3 (2 – 4)	0,946	0,01
jednom tjedno ili češće	31	3 (1 – 5)		
Negazirani voćni sokovi				
rjeđe od jednom tjedno	36	3 (1 – 4)	0,602	0,07
jednom tjedno ili češće	28	3 (1 – 5)		

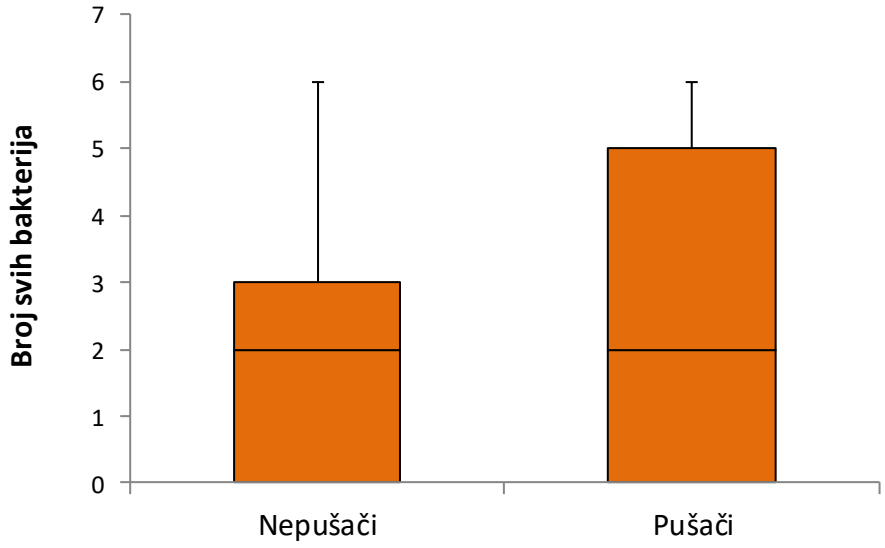
Podatci su prikazani kao medijan (IQR) kod kategorijalnih varijabli te kao Spearmanov koeficijent korelacije ranga (ρ) kod numeričih varijabli.

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Mann-Whitneyev U-test kod binarnih varijabli; Jonckheere-Terpstrin test kod ordinalnih varijabli; Učinak = r kod binarnih varijabli; η^2 kod ordinalnih varijabli.

* Nepušačima je trajanje pušenja = 0 godina

4.3.5 Broj anaerobnih bakterija

U uzorku nepušača medijan (IQR) ukupnoga broja aerobnih bakterija iznosio je 2 (0 – 3), a u uzorku pušača 2 (0 – 5) (Slika 9). Mann-Whitneyev U-test nije pokazao statistički značajnu razliku u broju anaerobnih bakterija između nepušača i pušača (Mann-Whitneyev test, U = 471,0; Z = –0,56; p = 0,574; r = 0,07).



Slika 9. Ukupan broj anaerobnih bakterija kod nepušača i pušača; crta u sredini pravokutnika predstavlja medijan, granice pravokutnika interkvartilni raspon, a krajevi crta najniži i najviši rezultat.

4.3.6 Povezanost broja anaerobnih bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima

Ispitanici koji su zube prali srednje tvrdom ili tvrdom četkicom, imali su statistički značajno manje anaerobnih bakterija od ispitanika koji su zube prali mekanom četkicom (Tablica 13). Niti jedna druga varijabla nije bila statistički značajno povezana s brojem anaerobnih bakterija, no mogući zbunjujući utjecaj ovih varijabli bilo je nužno statistički kontrolirati: spola, učestalosti stomatoloških pregleda, učestalosti pranja zuba, učestalosti upotrebe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice i konzumacije žestokih alkoholnih pića.

Tablica 13. Povezanost broja anaerobnih bakterija s mogućim zbunjujućim čimbenicima

	n	Medijan (IQR)	p	Učinak
Spol				
ženski	28	2 (0 – 5)	0,204	0,16
muški	36	2 (0 – 3)		
Dob (godine)	64	-0,11	0,409	
Trajanje pušenja (godine)*	64	0,05	0,690	
Broj popušenih cigareta dnevno				
nepušači (0 cigareta)	32	2 (0 – 3)	0,459	0,03
< 15	6	3 (0 – 5)		
15-24	18	2 (0 – 3)		
≥ 24	8	3 (2 – 5)		
Učestalost stomatoloških pregleda				
rjeđe od jednom godišnje	23	1 (0 – 3)	0,119	0,20
barem jednom godišnje	41	2 (1 – 5)		
Učestalost pranja zuba				
do jednom dnevno	14	2 (0 – 3)	0,236	0,15
dvaput dnevno ili češće	50	2 (0 – 4)		
Vrsta četkice za zube				
mekana	32	2 (1 – 5)	0,007	0,34
srednje tvrda ili tvrda	32	1 (0 – 3)		
Način pranja zuba				
uvijek ili povremeno samo horizontalno	27	2 (0 – 4)	0,797	0,03
vertikalno; uvijek i vertikalno i horizontalno; kružno	37	2 (0 – 4)		
Učestalost uporabe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice				
nikada	24	2 (0 – 3)	0,170	0,17
barem povremeno	40	2 (0 – 5)		
Učestalost uporabe tekućih sredstava za ispiranje i higijenu usta				
nikada	32	2 (0 – 3)	0,588	0,07
barem povremeno	32	2 (0 – 5)		
Crna kava				
rjeđe od jednom dnevno	23	2 (0 – 4)	0,558	0,07
jednom dnevno ili češće	41	2 (1 – 4)		
Crni ili zeleni čaj				
rjeđe od jednom tjedno	50	2 (0 – 4)	0,722	0,05
jednom tjedno ili češće	14	2 (0 – 4)		
Vino				
rjeđe od jednom tjedno	54	2 (0 – 3)	0,748	0,04
jednom tjedno ili češće	10	2 (0 – 5)		

Nastavak tablice	n	Medijan (IQR)	p	Učinak
Pivo				
rjeđe od jednom tjedno	45	2 (0 – 4)	0,674	0,05
jednom tjedno ili češće	19	2 (1 – 3)		
Žestoka alkoholna pića				
nikada	14	2 (0 – 2)	0,188	0,17
barem povremeno	45	2 (0 – 4)		
Slatkiši				
rjeđe od jednom tjedno	19	2 (0 – 4)	0,685	0,05
jednom tjedno ili češće	45	2 (0 – 3)		
Zaslađena, gazirana pića				
rjeđe od jednom tjedno	33	2 (0 – 4)	0,537	0,08
jednom tjedno ili češće	31	2 (0 – 3)		
Negazirani voćni sokovi				
rjeđe od jednom tjedno	36	2 (0 – 3)	0,530	0,08
jednom tjedno ili češće	28	2 (0 – 5)		

Podatci su prikazani kao medijan (IQR) kod kategorijalnih varijabli te kao Spearmanov koeficijent korelacije ranga (ρ) kod numeričih varijabli.

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Mann-Whitneyev U-test kod binarnih varijabli; Jonckheere-Terpstrin test kod ordinalnih varijabli; Učinak = r kod binarnih varijabli; η^2 kod ordinalnih varijabli.

***** Nepušačima je trajanje pušenja = 0 godina

4.4 Multivarijatna analiza broja bakterija kod pušača i nepušača

4.4.1 Zbunjujuće varijable

O varijablama za koje ćemo kontrolirati zbunjujući utjecaj odlučili smo na temelju standardiziranih mjera učinka $\geq$ 0,15 kod razlike između nepušača i pušača te kod barem jedne od tri skupine bakterija: svih, aerobnih ili anaerobnih. Varijable koje su tako probrane bile su: vrsta četkice za zube, način pranja zuba, upotreba zubnoga konca i/ili interdentalnih četkica, konzumacija crne kave, konzumacija vina i žestokih alkoholnih pića, spol i učestalost stomatoloških pregleda.

U multivarijatne analize uključili smo i dob, neovisno o tome što dob nije zadovoljavala spomenuti kriterij.

4.4.2 Broj svih bakterija

Shapiro Wilkov i D'Agostinov Omnibus-test indicirali su normalnost raspodjela reziduala kao preduvjeta regresijske analize ($p = 0,972$, $p = 0,948$ prema redoslijedu navođenja). Durbin-Watsonov test nije upućivao na korelacije reziduala (statistik = 1,60). Multikolinearnost nije bila problem; najveći čimbenik inflacije varijance iznosio je 1,82 za konzumaciju kave, a najveći kondicijski broj 7,17.

Cijeli model bio je statistički značajan ($p < 0,001$). Ukupni koeficijent determincije iznosio je $R^2 = 0,42$, ali je zbroj kvadrata prediktivnoga modela upućivao na vrlo lošu prediktivnu vrijednost odnosno mogućnost reprodukcije modela, PRESS R^2=0,00.

Nakon prilagodbe za planirane moguće zbunjujuće učinke pušenje nije bilo neovisni, statistički značajni prediktor broja svih bakterija ($\beta = –0,03$; $p = 0,872$) (Tablica 14). Statistički značajni neovisan prediktor manjega broja svih bakterija bila je dob ($\beta = –0,49$; $p = 0,003$). Statistički značajno neovisno je pozitivno s brojem svih bakterija bila povezana češća konzumacija vina ($\beta = 0,34$; $p = 0,017$).

Tablica 14. Robustna regresija na broj svih bakterija

	B	β	t	p
Ispitivana skupina				
nepušači	referenca			
pušači	-0,16	-0,03	-0,16	0,872
Spol				
ženski	referenca			
muški	0,52	0,08	0,59	0,557
Dob (godine)	-0,40	-0,49	-3,14	0,003
Učestalost stomatoloških pregleda				
rjeđe od jednom godišnje	referenca			
barem jednom godišnje	1,42	0,22	1,42	0,163
Vrsta četkice za zube				
mekana	referenca			
srednje tvrda ili tvrda	-3,18	-0,52	-3,15	0,003
Način pranja zuba				
uvijek ili povremeno samo horizontalno	referenca			
vertikalno; uvijek i vertikalno i horizontalno; kružno	-1,63	-0,26	-1,83	0,070
Učestalost uporabe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice				
nikada	referenca			
barem povremeno	-0,52	-0,08	-0,54	0,591
Crna kava				
rjeđe od jednom dnevno	referenca			
jednom dnevno ili češće	1,98	0,31	1,76	0,080
Vino				
rjeđe od jednom tjedno	referenca			
jednom tjedno ili češće	2,93	0,34	2,46	0,017
Žestoka alkoholna pića				
nikada	referenca			
barem povremeno	-0,23	-0,03	-0,21	0,838

Kratice: B = nestandardizirani regresijski koeficijent; β = standardizirani regresijski koeficijent; t = t-test statistik s n-p-1 stupnjem slobode, gdje je p ukupan broj parametara u modelu; p = statistička značajnost regresijskoga koeficijenta.

4.4.3 Broj aerobnih bakterija

Shapiro Wilkov i D'Agostinov Omnibus-test indicirali su normalnost raspodjela reziduala kao preduvjeta regresijske analize ($p = 0,992$, $p = 0,901$ prema redoslijedu navođenja). Durbin-Watsonov test nije upućivao na korelacije reziduala (statistik = 1,56). Multikolinearnost nije bila problem; najveći čimbenik inflacije varijance iznosio je 1,62, a najveći kondicioni broj 6,72.

Cijeli model bio je statistički značajan ($p < 0,001$). Ukupni koeficijent determincije iznosio je $R^2 = 0,43$. Zbroj kvadrata prediktivna modela upućivao je na lošu prediktivnu vrijednost, PRESS $R^2 = 0,05$.

Nakon prilagodbe za planirane moguće zbunjujuće učinke pušenje nije bilo neovisni, statistički značajni prediktor broja aerobnih bakterija ($\beta = –0,10$; $p = 0,529$) (Tablica 15). Statistički značajni neovisni prediktori manjeg broja aerobnih bakterija bile su dob ($\beta = –0,38$; $p = 0,015$), srednje tvrda ili tvrda četkica za zube ($\beta = –0,46$; $p = 0,005$), vertikalno, uvijek i vertikalno i horizontalno ili kružno pranje zuba ($\beta = –0,28$; $p = 0,047$). Statistički značajno, neovisno je pozitivno s brojem aerobnih bakterija bila povezana češća konzumacija vina ($\beta = 0,33$; $p = 0,017$). Rezultat za češću konzumaciju crne kave nije bio konkluzivan ($\beta = 0,33$; $p = 0,055$).

Tablica 15. Robustna regresija na broj aerobnih bakterija

	B	β	t	p
Ispitivana skupina				
nepušači	referenca			
pušači	-0,36	-0,10	-0,63	0,529
Spol				
ženski	referenca			
muški	0,83	0,33	1,60	0,115
Dob (godine)	-0,19	-0,38	-2,52	0,015
Učestalost stomatoloških pregleda				
rjeđe od jednom godišnje	referenca			
barem jednom godišnje	0,40	0,10	0,67	0,505
Vrsta četkice za zube				
mekana	referenca			
srednje tvrda ili tvrda	-1,74	-0,46	-0,292	0,005
Način pranja zuba				
uvijek ili povremeno samo horizontalno	referenca			
vertikalno; uvijek i vertikalno i horizontalno; kružno	-1,06	-0,28	-2,03	0,047
Učestalost uporabe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice				
nikada	referenca			
barem povremeno	-0,89	-0,23	-1,56	0,125
Crna kava				
rjeđe od jednom dnevno	referenca			
jednom dnevno ili češće	1,29	0,33	1,96	0,055
Vino				
rjeđe od jednom tjedno	referenca			
jednom tjedno ili češće	1,72	0,33	2,47	0,017
Žestoka alkoholna pića				
nikada	referenca			
barem povremeno	-0,27	-0,06	-0,40	0,691

Kratice: B = nestandardizirani regresijski koeficijent; β = standardizirani regresijski koeficijent; t = t-test statistik s n-p-1 stupnjem slobode gdje je p ukupan broj parametara u modelu; p = statistička značajnost regresijskoga koeficijenta.

4.4.4 Broj anaerobnih bakterija

Shapiro Wilkov i D'Agostinov Omnibus-test pokazali su odstupanje raspodjele reziduala od normalne raspodjele. Shapiro Wilkov test statistik iznosio je 0,97; p = 0,1992, a D'Agostinov Omnibus-test 6,32; p = 0,042. Za to je bila odgovorna asimetričnost raspodjele reziduala udesno. Durbin-Watson test nije upućivao na serijalne korelacije reziduala (statistik = 2,02). Multikolinearnost nije bila problem; najveći čimbenik inflacije varijance iznosio je 1,83, a najveći kondicijski broj 7,24.

Cijeli model bio je statistički značajan (p = 0,001). Ukupni koeficijent determinacije iznosio je R^2 = 0,34. Zbroj kvadrata prediktivnoga modela upućivao je na izrazito lošu prediktivnu vrijednost, PRESS R^2 = 0,00.

Nakon prilagodbe za planirane moguće zbunjujuće čimbenike, pušenje nije bilo neovisni, statistički značajni prediktor broja anaerobnih bakterija (β = 0,09; p = 0,563) (Tablica 16). Statistički značajni prediktori manjeg broja anaerobnih bakterija bile su dob (β = –0,45; p = 0,006) i srednje tvrda ili tvrda četkica za zube (β = –0,43; p = 0,013).

Tablica 16. Robustna regresija na broj anaerobnih bakterija

	B	β	t	p
Ispitivana skupina				
nepušači	referenca			
pušači	0,35	0,09	0,58	0,563
Spol				
ženski	referenca			
muški	-0,22	-0,06	-0,41	0,685
Dob (godine)	-0,23	-0,45	-2,85	0,006
Učestalost stomatoloških pregleda				
rjeđe od jednom godišnje	referenca			
barem jednom godišnje	0,95	0,24	1,52	0,135
Vrsta četkice za zube				
mekana	referenca			
srednje tvrda ili tvrda	-1,62	-0,43	-2,58	0,013
Način pranja zuba				
uvijek ili povremeno samo horizontalno	referenca			
vertikalno; uvijek i vertikalno i horizontalno; kružno	-0,50	-0,13	-0,91	0,368
Učestalost uporabe zubnoga konca i/ili interdentalne četkice				
nikada	referenca			
barem povremeno	0,39	0,10	0,65	0,521
Crna kava				
rjeđe od jednom dnevno	referenca			
jednom dnevno ili češće	0,73	0,18	1,05	0,299
Vino				
rjeđe od jednom tjedno	referenca			
jednom tjedno ili češće	0,77	0,15	1,05	0,299
Žestoka alkoholna pića				
nikada	referenca			
barem povremeno	0,06	0,01	0,07	0,948

Kratice: B = nestandardizirani regresijski koeficijent; β = standardizirani regresijski koeficijent; t = t-test statistik s n-p-1 stupnjem slobode, gdje je p ukupan broj parametara u modelu; p = statistička značajnost regresijskoga koeficijenta.

4.5 Prevalencije bakterija kod pušača i nepušača

4.5.1 Prevalencija bakterija po koljenima

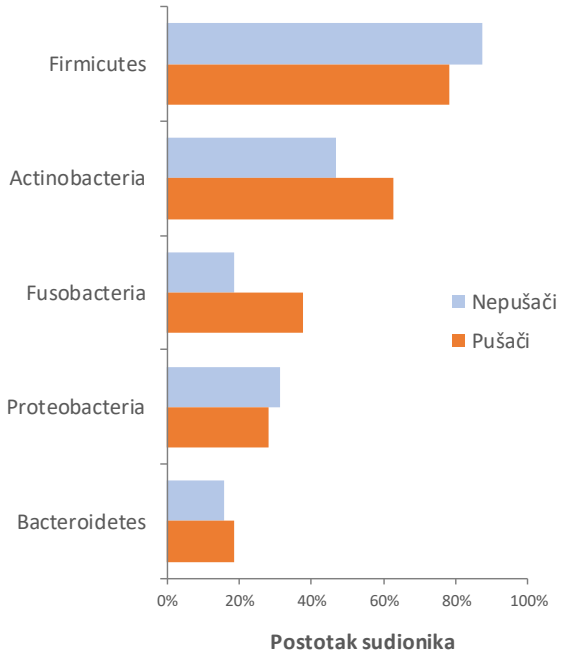
Nismo uočili statistički značajnu razliku u prevalenciji bakterija različitih koljena između nepušača i pušača (Tablica 17, Slika 10).

Tablica 17. Prevalencija skupina koljena bakterija

	Nepušači (n = 32)		Pušači (n = 32)		p	φ
Actinobacteria	15	(46,9)	20	(62,5)	0,315	0,16
Proteobacteria	10	(31,3)	9	(28,1)	> 0,999	0,03
Bacteroidetes	5	(15,6)	6	(18,8)	> 0,999	0,04
Firmicutes	28	(87,5)	25	(78,1)	0,509	0,12
Fusobacteria	6	(18,8)	12	(37,5)	0,164	0,21

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika.

p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Fisherov egzaktni test; φ = fi koeficijent povezanosti; test statističke značajnosti razlika izračunan je samo za bakterije koje u bilo kojoj skupini ima barem troje ispitanika.



Slika 10. Prevalencija bakterija po koljenima

4.5.2 Prevalencija bakterija po kompleksima prema Socransky i sur.

Prema Socransky i sur. (108) bakterije subgingivnoga prostora klasificirane su u komplekse prema bojama. Narančasti i crveni kompleks čine bakterije koje subgingivni prostor koloniziraju kasnije, a čine je uglavnom parodontopatogeni.

U našemu uzorku nije pronađena nijedna vrsta iz crvenoga kompleksa.

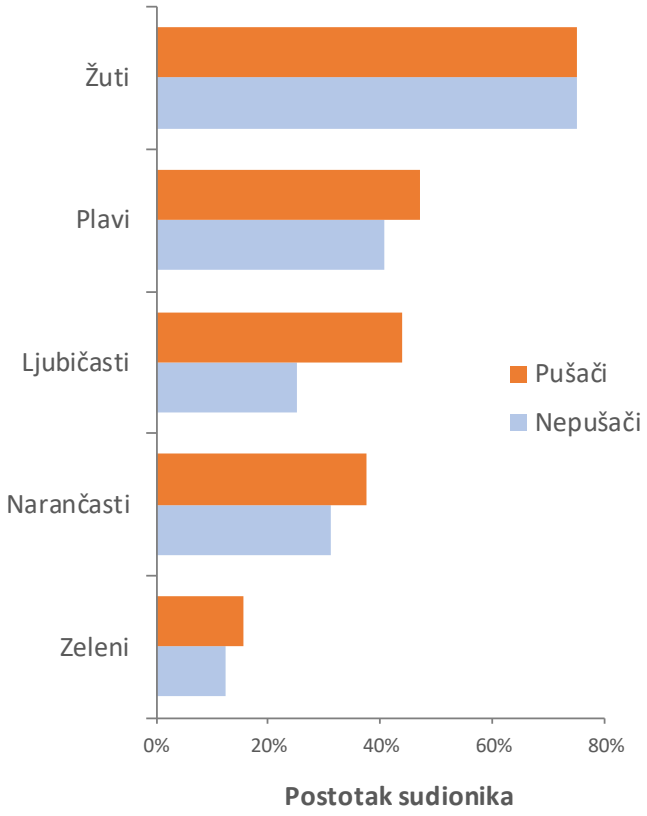
Nismo uočili statistički značajnu razliku u prevalenciji bakterija iz pojedinih kompleksa između nepušača i pušača (Tablica 18, Slika 11).

Tablica 18. Prevalencija kompleksa bakterija prema Socransky i sur. (108)

Kompleks	Nepušači (n = 32)	Pušači (n = 32)	p	φ
Zeleni	4 (12,5)	5 (15,6)	> 0,999	0,05
Plavi	13 (40,6)	15 (46,9)	0,801	0,06
Ljubičasti	8 (25,0)	14 (43,8)	0,188	0,20
Žuti	24 (75,0)	24 (75,0)	> 0,999	0,00
Narančasti	10 (31,3)	12 (37,5)	0,793	0,07

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika.

p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Fisherov egzaktni test; φ = fi koeficijent povezanosti; test statističke značajnosti razlika izračunan je samo za bakterije koje je u bilo kojoj skupini imalo barem troje ispitanika.



Slika 11. Prevalencija kompleksa bakterija prema Socransky i sur. (108)

4.5.3 Prevalencija aerobnih bakterija

Ni kod jednoga roda aerobnih bakterija nismo uočili statistički značajne razlike u prevalenciji između nepušača i pušača (Tablica 19, Slika 12).

Dobivena je statistički značajna razlika u prevalenciji vrste *Streptococcus sanguinis* između nepušača i pušača (Tablica 20, Slika 13). Nakon sekvencijalne Holm-Bonferronijeve korekcije za učinak višestrukih testiranja na inflaciju lažno pozitivnih nalaza, ni ta razlika nije bila statistički značajna.

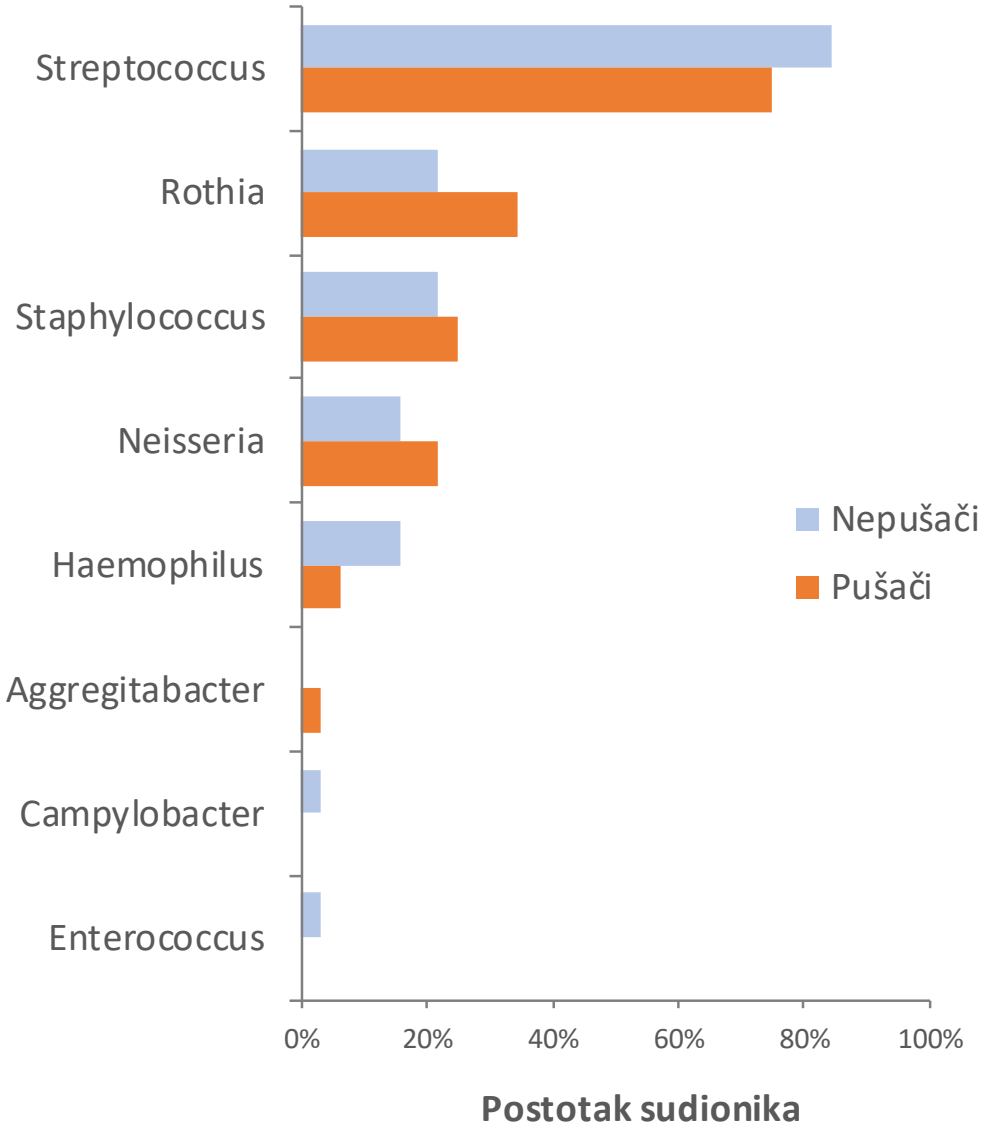
Na razini ovoga konkretnog uzorka rodovi S*treptoccocus* i H*aemophilus* bili su prevalentniji kod nepušača, a rodovi *Rothia*, S*taphylococcus* i N*eisseria* kod pušača.

Tablica 19. Prevalencija rodova aerobnih bakterija

	Nepušači (n = 32)	Pušači (n = 32)	p	φ
Streptococcus	27 (84,4)	24 (75,0)	0,536	0,12
Rothia	7 (21,9)	11 (34,4)	0,405	0,14
Staphylococcus	7 (21,9)	8 (25,0)	> 0,999	0,04
Neisseria	5 (15,6)	7 (21,9)	0,750	0,08
Haemophilus	5 (15,6)	2 (6,3)	0,426	0,15
Aggregitabacter	0 (0,0)	1 (3,1)	> 0,999	0,13
Campylobacter	1 (3,1)	0 (0,0)	> 0,999	0,13
Enterococcus	1 (3,1)	0 (0,0)	> 0,999	0,13

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika. Bakterije su poredane prema prevalenciji kod pušača.

Kratice: p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Fisherov egzaktni test; φ = fi koeficijent povezanosti.



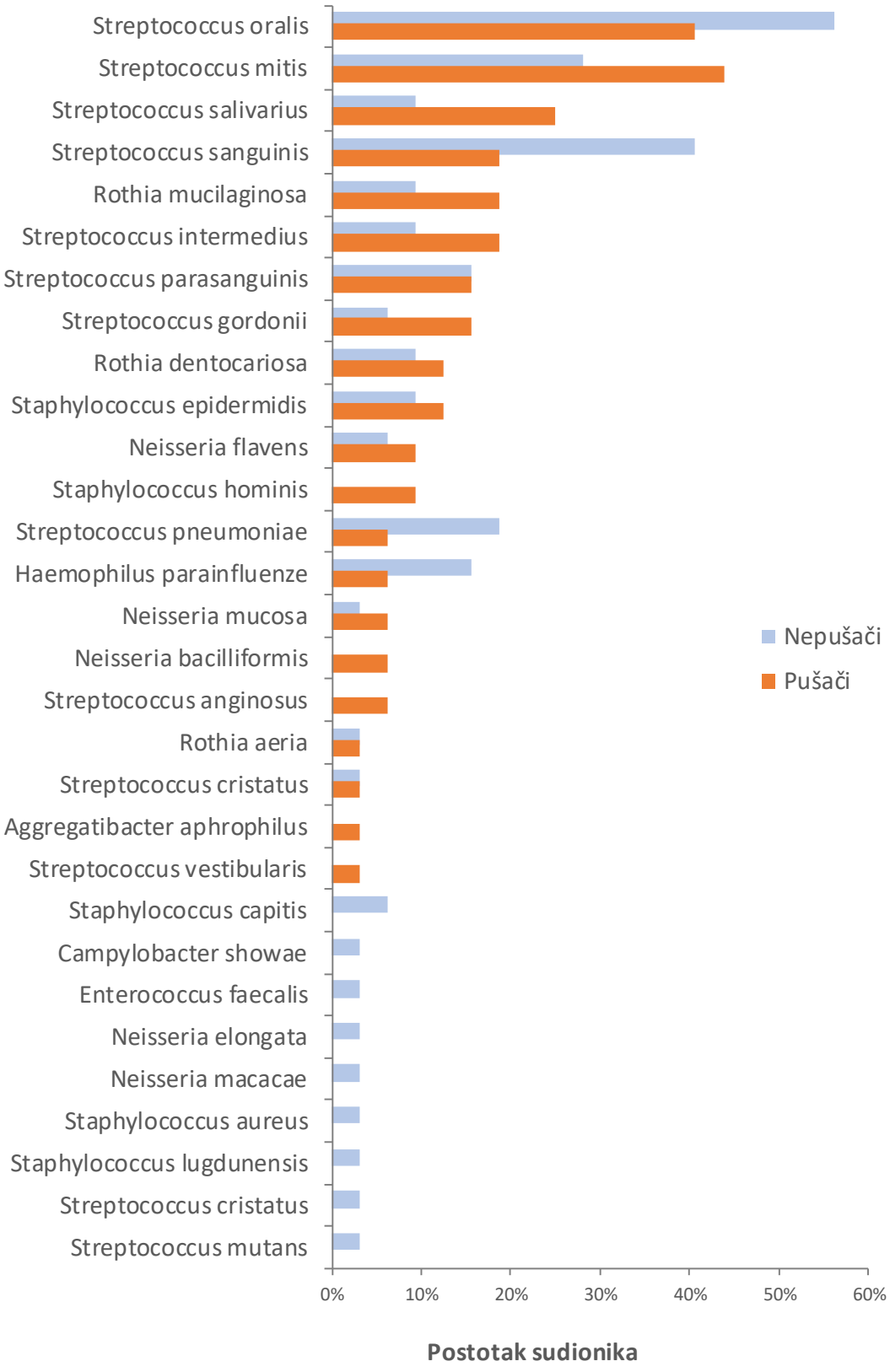
Slika 12. Prevalencija rodova aerobnih bakterija

Tablica 20. Prevalencija aerobnih bakterija

	Nepušači (n = 32)		Pušači (n = 32)		p	φ
Streptococcus oralis	18	(56,3)	13	(40,6)	0,317	0,16
Streptococcus mitis	9	(28,1)	14	(43,8)	> 0,999	0,07
Streptococcus salivarius	3	(9,4)	8	(25,0)	0,184	0,21
Streptococcus sanguinis	13	(40,6)	6	(18,8)	0,049	0,24
Rothia mucilaginosa	3	(9,4)	6	(18,8)	0,474	0,14
Streptococcus intermedius	3	(9,4)	6	(18,8)	0,474	0,14
Streptococcus parasanguinis	5	(15,6)	5	(15,6)	> 0,999	0,00
Streptococcus gordonii	2	(6,3)	5	(15,6)	0,426	0,15
Rothia dentocariosa	3	(9,4)	4	(12,5)	> 0,999	0,05
Staphylococcus epidermidis	3	(9,4)	4	(12,5)	> 0,999	0,16
Neisseria flavens	2	(6,3)	3	(9,4)	> 0,999	0,06
Staphylococcus hominis			3	(9,4)	0,238	0,22
Streptococcus pneumoniae	6	(18,8)	2	(6,3)	0,257	0,19
Haemophilus parainfluenze	5	(15,6)	2	(6,3)	0,426	0,15
Neisseria mucosa	1	(3,1)	2	(6,3)		
Neisseria bacilliformis			2	(6,3)		
Streptococcus anginosus			2	(6,3)		
Rothia aeria	1	(3,1)	1	(3,1)		
Streptococcus cristatus	1	(3,1)	1	(3,1)		
Aggregatibacter aphrophilus			1	(3,1)		
Streptococcus vestibularis			1	(3,1)		
Staphylococcus capitis	2	(6,3)				
Campylobacter showae	1	(3,1)				
Enterococcus faecalis	1	(3,1)				
Neisseria elongata	1	(3,1)				
Neisseria macacae	1	(3,1)				
Staphylococcus aureus	1	(3,1)				
Staphylococcus lugdunensis	1	(3,1)				
Streptococcus cristatus	1	(3,1)				
Streptococcus mutans	1	(3,1)				

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika. Bakterije su poredane prema prevalenciji kod pušača.

Kratice: p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Fisherov egzaktni test; φ = fi koeficijent povezanosti; test statističke značajnosti razlika izračunan je samo za bakterije koje je u bilo kojoj skupini imalo barem troje ispitanika.



Slika 13. Prevalencija aerobnih bakterija kod pušača i nepušača

4.5.4 Prevalencija anaerobnih bakterija

Ni kod jednoga roda anaerobnih bakterija nismo uočili statistički značajne razlike u prevalenciji između nepušača i pušača (Tablica 21, Slika 14). Na razini ovoga konkretnog uzorka, rod *Prevotella* bio je prevalentniji kod nepušača, a rod *Fusobacterium* kod pušača.

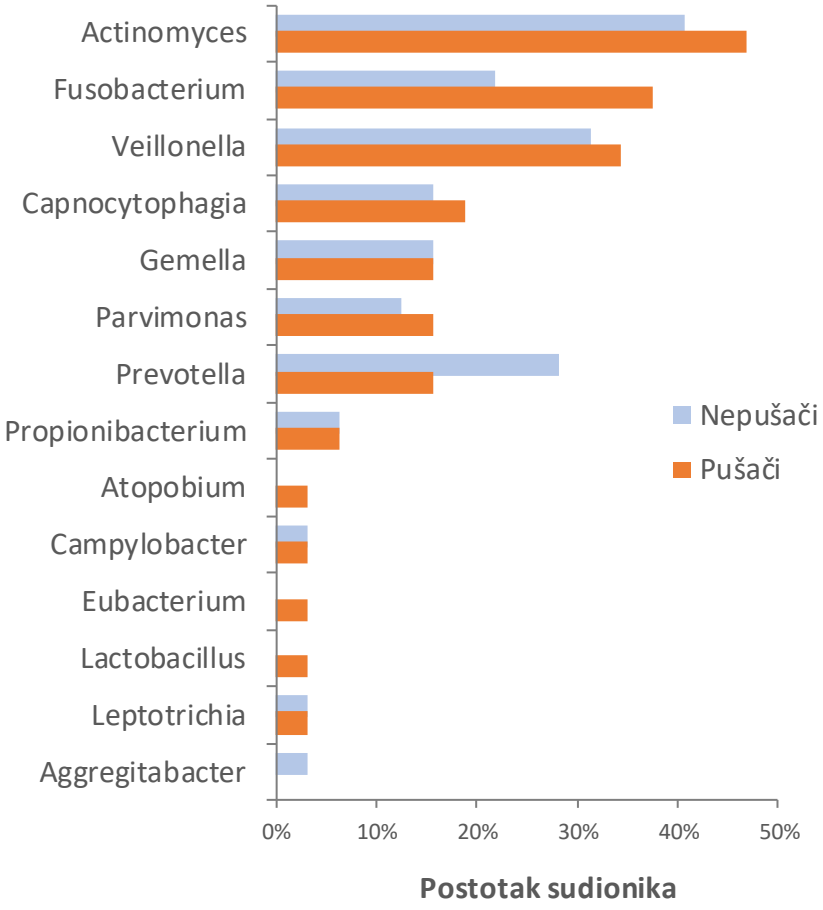
Jedina anaerobna bakterija kod koje smo uočili statistički značajnu razliku između nepušača i pušača bila je *Actinomyces odontolyticus* (Tablica 22, Slika 15). Nakon sekvencijalne Holm-Bonferronijeve korekcije za učinak višestrukih testiranja na inflaciju lažno pozitivnih nalaza ni ta razlika nije bila statistički značajna.

Tablica 21. Prevalencija rodova anaerobnih bakterija

	Nepušači (n = 32)	Pušači (n = 32)	p	φ
Actinomyces	13 (40,6)	15 (46,9)	0,801	0,06
Fusobacterium	7 (21,9)	12 (37,5)	0,274	0,17
Veillonella	10 (31,3)	11 (34,4)	> 0,999	0,03
Capnocytophagia	5 (15,6)	6 (18,8)	> 0,999	0,04
Gemella	5 (15,6)	5 (15,6)	> 0,999	0,00
Parvimonas	4 (12,5)	5 (15,6)	> 0,999	0,05
Prevotella	9 (28,1)	5 (15,6)	0,365	0,15
Propionibacterium	2 (6,3)	2 (6,3)	> 0,999	0,00
Atopobium	0 (0,0)	1 (3,1)	> 0,999	0,13
Campylobacter	1 (3,1)	1 (3,1)	> 0,999	0,00
Eubacterium	0 (0,0)	1 (3,1)	> 0,999	0,13
Lactobacillus	0 (0,0)	1 (3,1)	> 0,999	0,13
Leptotrichia	1 (3,1)	1 (3,1)	> 0,999	0,00
Aggregitabacter	1 (3,1)	0 (0,0)	> 0,999	0,13

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika. Bakterije su poredane prema prevalenciji kod pušača.

Kratice: p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Fisherov egzaktni test; φ = fi koeficijent povezanosti.



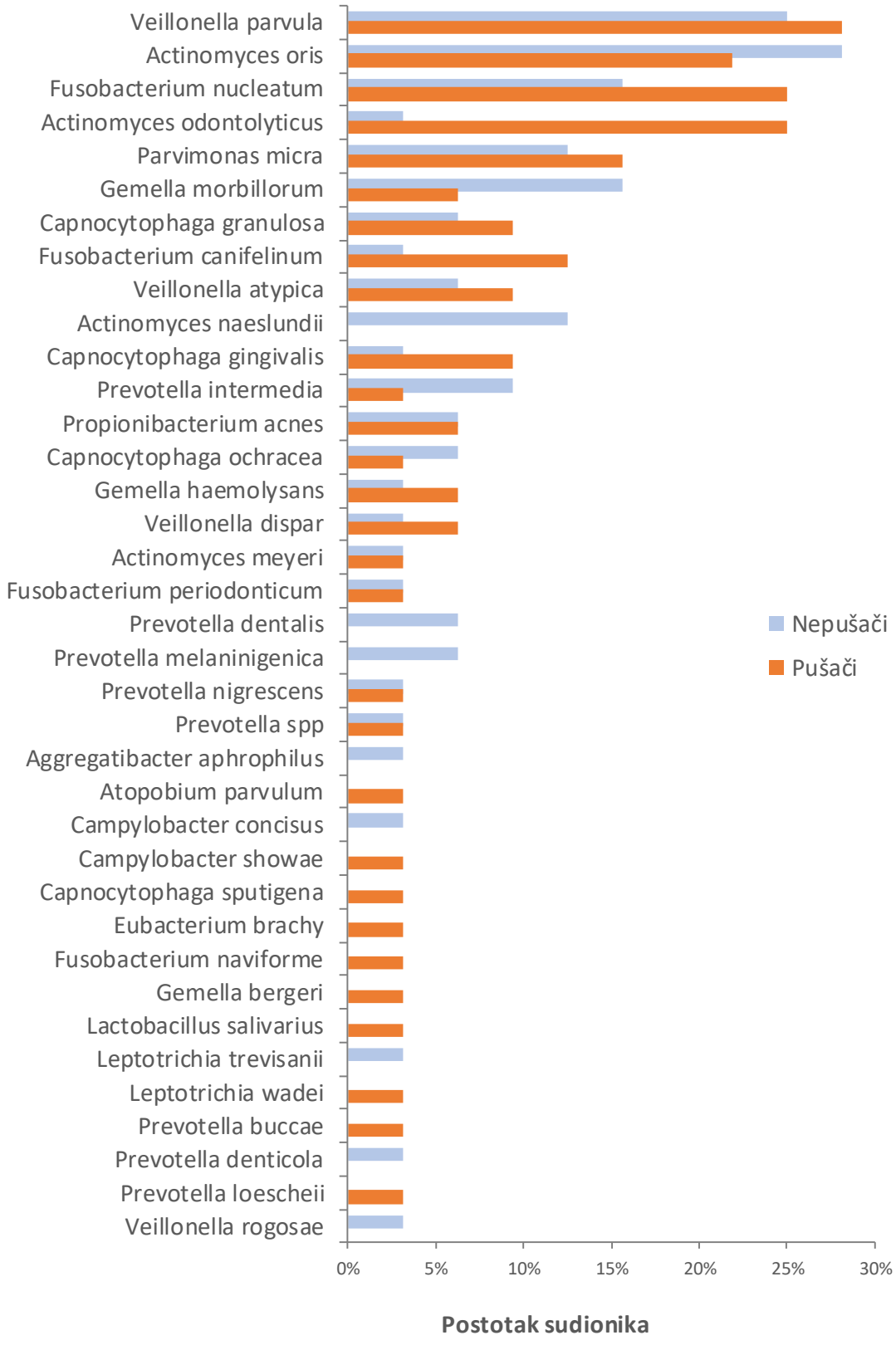
Slika 14. Prevalencija rodova anaerobnih bakterija

Tablica 22. Prevalencija anaerobnih bakterija

	Nepušači (n = 32)	Pušači (n = 32)	p	φ
V. parvula	8 (25,0)	9 (28,1)	> 0,999	0,08
A. oris	13 (40,6)	7 (21,9)	0,774	0,07
F. nucleatum	5 (15,6)	8 (25,0)	0,536	0,12
A. odontolyticus	1 (3,1)	8 (25,0)	0,026	0,32
P. micra	4 (12,5)	5 (15,6)	> 0,999	0,00
G. morbillorum	5 (15,6)	2 (6,3)	0,672	0,11
C. granulosa	2 (6,3)	3 (9,4)	> 0,999	0,06
F. canifelinum	1 (3,1)	4 (12,5)	0,355	0,18
V. atypica	2 (6,3)	3 (9,4)	> 0,999	0,06
C. gingivalis	1 (3,1)	3 (9,4)	0,613	0,13
P. intermedia	3 (9,4)	1 (3,1)	0,613	0,13
P. acnes	2 (6,3)	2 (6,3)		
C. ochracea	2 (6,3)	1 (3,1)		
G. haemolysans	1 (3,1)	2 (6,3)		
V. dispar	1 (3,1)	2 (6,3)		
A. meyeri	1 (3,1)	1 (3,1)		
F. periodonticum	1 (3,1)	1 (3,1)		
P. dentalis	2 (6,3)			
P. melaninigenica	2 (6,3)			
P. nigrescens	1 (3,1)	1 (3,1)		
P. spp	1 (3,1)	1 (3,1)		
A. aphrophilus	1 (3,1)			
A. parvulum		1 (3,1)		
C. concisus	1 (3,1)			
C. showae		1 (3,1)		
C. sputigena		1 (3,1)		
E. brachy		1 (3,1)		
F. naviforme		1 (3,1)		
G. bergeri		1 (3,1)		
L. salivarius		1 (3,1)		
L. trevisanii	1 (3,1)			
L. wadei		1 (3,1)		
P. buccae		1 (3,1)		
P. denticola	1 (3,1)			
P. loescheii		1 (3,1)		
V. rogosae	1 (3,1)			

Podatci su prikazani kao broj (postotak) ispitanika. Bakterije su poredane prema prevalenciji kod pušača.

Kratice: p = statistička značajnost razlike između nepušača i pušača, Fisherov egzaktni test; φ = fi koeficijent povezanosti; test statističke značajnosti razlika izračunan je samo za bakterije koje je u bilo kojoj skupini imalo barem troje ispitanika.



Slika 15. Prevalencija anaerobnih bakterija

5. RASPRAVA

Mikrobiološki sastav usne šupljine dugi je niz godina predmet istraživanja u dentalnoj medicini, posebno u području istraživanja parodontnih bolesti. Razvijanjem novih metoda i tehnologija rezultati su se tih istraživanja mijenjali, tako da se danas bakterije identificiraju vrlo sofisticiranim metodama na razini pojedinih gena.

Zlatni standard u istraživanju mikrobiološke flore, a posebno anaerobnih bakterija, jest sekvenciranje 16s ribosomske RNA. Ta metoda omogućuje sekvenciranje čitavih genoma pojedinih bakterija te otkrivanje i sekvenciranje potpuno nepoznatih rodova ili vrsta te proučavanje genoma i metaboličke aktivnosti čitave mikrobne zajednice. S obzirom na cijenu, dostupnost i vrijeme potrebno za analizu ta se metoda primjenjuje gotovo isključivo u znanstvenim istraživanjima u dobro opremljenim laboratorijima te se nije našla u kliničkoj upotrebi.

U ovome istraživanju za identifikaciju mikroorganizama primijenjena je metoda MALDI-TOF masena spektrometrija, kojom se bakterije identificiraju na razini proteoma. Vrijeme potrebno za identifikaciju najveća je prednost te metode u usporedbi s drugim metodama, a cijena postupka znatno je niža od cijene postupaka drugih metoda, pa je ta metoda zaživjela i u kliničkoj upotrebi i u znanstvenim istraživanjima. Napravljene su brojne studije usporedbe u kvaliteti identifikacije između MALDI-TOF-a i sekvenciranja 16s rRNA (75, 131, 133, 136 – 139, 145), kojima je pokazano da MADI-TOF masena spektrometrija veoma dobro identificira bakterije do razine vrste te da nema značajne razlike između tih dviju metoda. Kao preduvjet za kvalitetnu identifikaciju potrebno je imati dobru bazu podataka koja se redovito ažurira, a iz koje se identificirani proteomi povezuju s poznatim bakterijama.

5.1 Ispitanici

U naše je istraživanje nakon inicijalnoga probira od 196 ispitanika uključeno 64 ispitanika, 32 pušača i 32 nepušača, podijeljenih u ispitnu i kontrolnu skupinu. Ispitanici iz obje skupine bili su dobro izjednačeni prema spolu i dobi te nije bilo statistički značajne razlike među ispitanicima. U ispitnoj skupini ispitanici su bili dobro ujednačeni po količini cigareta koje puše. Kriterij za uključivanje u studiju bio je da svi ispitanici moraju biti parodontološki zdravi te je taj kriterij bio jedan od bitnijih kod isključivanja ispitanika iz studije. U Tablici 2 vidljivo je da su obje skupine bile parodontološki zdrave – dubina džepova (PPD) bila je ispod 3 mm, a

krvarenje pri sondiranju (BoP) bilo je ispod 25 %. Uočava se da su pušači imali manje vrijednosti BoP-a i aproksimalnoga indeksa plaka, a veće vrijednosti PPD-a i razine kliničkoga pričvrstka (CAL), što je u suglasju s mnogim dosad provedenim istraživanjima. Peruzzo i sur. (62) na modelu eksperimentalnoga gingivitisa dobili su statistički značajno manji BoP kod pušača. To je objašnjeno vaokonstriktornim učinkom nikotina iz cigareta na male krvne žile u gingivi, koji dovodi do manjega krvarenja iz gingive, pa gingiva klinički izgleda zdravo, ali je histološkom analizom pokazano da je zapravo riječ o maskiranju kliničke slike upale (74, 150). S druge strane, Muller i sur. (65) dobili su statistički značajno veći BoP kod pušača, ali je u tom istraživanju i indeks plaka bio značajno veći kod pušača, pa se taj rezultat objašnjava prevladavanjem utjecaja plaka na pojavu gingivitisa u odnosu na utjecaj nikotina.

Većina je pušača koji su sudjelovali u ovom istraživanju pušila redovito. Iako nije bilo razlike u trajanju pušenja između muškaraca i žena, muškarci su prosjeku pušili više cigareta dnevno od žena.

Uočeno je nekoliko relevantnih razlika u prehrambenim navikama između nepušača i pušača. Prije svega to je bila razlika u učestalosti konzumacije crne kave. Među pušačima njih 27 (84,4%) konzumiralo je crnu kavu svakodnevno ili više puta dnevno, dok je kod nepušača tako učestalih konzumenata crne kave bilo upola manje, 14 (43,8 %). Iako se dugo vjerovalo da konzumiranje kave pogoduje razvoju parodontne bolesti u prvome redu utjecajem na osteoblastičnu aktivnost (151), novija istraživanja to opovrgavaju. Pokazano je da kava ne utječe na ubrzani gubitak kosti kod osteoporoze i kod razvoja parodontne bolesti (152), dapače, ističe se protektivni učinak kave – kava ima antimikrobni učinak (153) i može smanjiti adherenciju određenih bakterija na površinu zuba (154). Ta je razlika između pušača i nepušača uzeta u obzir u statističkoj obradi podataka.

5.2 Mikrobiološki profil ispitne populacije

Ukupno gledajući, u ovome istraživanju identificirane su ukupno 63 različite vrste bakterija podijeljenih u 5 koljena: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteriodetes*, *Fusobacteria* i *Firmicutes*. Velikim projektom identifikacije ljudskoga oralnog mikrobioma identificirano je oko 700 različitih vrsta bakterija podijeljenih u 13 koljena, od toga 11 poznatih i 2 nepoznata koljena (koljena *TM7* i *SR11*) (101). Od 11 poznatih koljena njih 6 sadržava više od 96 %

bakterijskih vrsta koje se nalaze u usnoj šupljini (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteriodetes*, *Fusobacteria*, *Firmicutes* i *Spirochaetes*), dok se prostalih 4 % bakterijskih vrsta raspodijelilo u ostala koljena (*Euryarchaeota*, *Chlamydia*, *Chloroflexi*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *SR1* i *TM7*). Naš nalaz odgovara istraživanjima oralne mikrobiološke flore kod zdravih ispitanika. Aas i sur. (155) u istraživanju na 5 parodontološki zdravih ispitanika istraživali su bakterije s 9 mjesta u usnoj šupljini (jezik, obrazna sluznica, tvrdo i meko nepce, supragingivni i subgingivni plak, vestibulum gornje čeljusti i tonzile) te su identificirali bakterije iz istih 5 koljena kao i u našem istraživanju iako smo mi promatrali samo bakterije iz subgingivnoga plaka. Slične rezultate dobili su Bik i sur. (156) u istraživanju na 10 zdravih ispitanika metodom sekvenciranja 16S podjedinice bakterijske rRNA. Bakterije iz drugih koljena vjerojatno pripadaju u bakterije koje se pojavljuju u parodontnim bolestima, što kod nas nije bio slučaj, ili je riječ o rijetkim vrstama što mi, zbog veličine uzorka, nismo detektirali. Moon i sur. (157) identificirali su bakterije iz 11 koljena kod ispitanika s kroničnim parodontitisom – osim dosad spomenutih 5 koljena oni su pronašli i vrste iz koljena *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *Chloroflexi*, *SR1* i *TM7*, s tim da je najveći broj izoliranih vrsta pripadao u 6 najčešćih koljena. Kumar i sur. (115) u istraživanju na 43 parodontološki zdrava ispitanika metodom sekvencioniranja 16S podjedinice bakterijske rRNA pronašli su bakterije iz 6 najčešćih koljena. Oni su uzorke subgingivnoga plaka prikupljali kiretom s više zuba, dok smo mi upotrebljavali papirnate štapiće. Razlika u metodi prikupljanja plaka i u metodi bakterijske identifikacije može biti uzrokom nešto drukčijih rezultata, iako se rezultati uglavnom podudaraju.

U našem istraživanju najzastupljenije su bile bakterije iz koljena *Firmicutes* (83 % ispitanika imalo je bakterije iz ovoga koljena) i iz koljena *Actinobacteria* (55 % ispitanika). Ovaj je nalaz logičan s obzirom na to da se u koljenu *Firmicutes* nalaze rodovi *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Gemella* i *Veillonela*, a u koljenu *Actinobacteria* rod *Actynomices*, što su sve rani kolonizatori usne šupljine, posebno zubnoga plaka (98, 108, 155, 156). S druge strane, koljena *Fusobacteria* (28 % ispitanika) i *Bacteriodetes* (17 % ispitanika) u našemu su istraživanju bila najmanje zastupljena. S obzirom na to da se u tim koljenima nalaze bakterijske vrste iz narančastoga kompleksa (108) koje mogu biti parodontni patogeni, a da su u našemu istraživanju ispitanici bili parodontološki zdravi, i ovaj je nalaz očekivan.

Od 20 rodova identificiranih u ispitnoj populaciji najzastupljeniji su bili rodovi *Streptococcus* (80 % ispitanika), *Actinomyces* (44 % ispitanika) i *Veillonela* (33 % ispitanika). Rodovi koji su bili zastupljeni kod više od 20 % ispitanika su još i *Fusobacterium*, *Rothia*, *Staphylococcus* i

Prevotella. Ti rezultati, iako nisu identični rezultatima sličnih istraživanja, uglavnom se s njima podudaraju. Haffajee i sur. (158) u istraživanju koje su proveli na 3 skupine ispitanika (parodontološki zdravi ispitanici, ispitanici stariji od 65 godina i ispitanici s parodontitisom) u skupini zdravih ispitanika dobili su ista 3 roda kao najzastupljenije. Darveau i sur. (159) također navode rodove *Streptococcus* i *Actynomices* kao dominantne u subgingivnome plaku kod zdravih ispitanika. S druge strane, Aas i sur. (155) u istraživanju na 5 parodontološki zdravih ispitanika promatrali su prevalenciju bakterija na različitim mjestima u usnoj šupljini koristeći se metodom sekvencioniranja 16s podjedinice bakterijske rRNA. U subgingivnome prostoru najzastupljeniji rodovi bili su *Streptococcus, Gemella, Abiotrophia, Rothia, Neisseria* i *Prevotella*. Slične rezultate dobili su i Bik i sur. (156) u svojemu istraživanju na 10 ispitanika primjenjujući istu metodu kao Aaas i sur. (155), kojima potvrđuju dominaciju roda *Streptococcus,* a spektar najzastupljenijih rodova isti je kao i kod Aasa i sur., uz dodatni nalaz većega broja rodova *Haemophilus* i *Lautropia* iz koljena *Proteobacteria*. Razlike u ovome nalazu mogu se objasniti malim uzorkom kod ovih istraživača, neujednačenosti u dobi (27 – 61 godina kod Bik, 23 – 55 godina kod Aasa) i korištenjem preciznije metode identifikacije.

Na razini vrste bakterija u našemu su istraživanju najzastupljenije bile *S. oralis* (48 % ispitanika), *S. mitis* (31 % ispitanika), *A. oris* (31 % ispitanika) i *S. sanguinis* (30 % ispitanika). Vrste koje su bile zastupljene kod više od 15 % ispitanika bile su *V. Parvula*, *F. nucleatum*, *S. salivarius* i *S. parasaguinis.* S obzirom na to da je riječ o bakterijama iz žutoga, plavoga i ljubičastoga kompleksa (108), koji prvi koloniziraju površinu subgingivnoga prostora, ovakav je nalaz očekivan i potvrđen i u drugim istraživanjima (160). Bitno je istaknuti da u svojemu istraživanju nismo identificirali nijednu bakteriju iz crvenoga kompleksa (*P. gingivalis*, *T. forsythia* i *T. denticola*), koje su poznati parodontni patogeni. S obzirom na parodontološko zdravlje ispitanika koji su sudjelovali u ovome istraživanju te brigu o oralnome zdravlju ovakav je rezultat bio očekivan. Taj je rezultat potvrđen i u istraživanju koje su proveli Aas i sur. (155), koji također nisu našli bakterije iz crvenoga spektra kod zdravih ispitanika. Postoji nekoliko istraživanja u kojima su pronađene bakterije iz crvenoga spektra kod parodontološki zdravih ispitanika, ali u vrlo maloj prevalenciji (156, 161, 162). U ovome istraživanju kod 20 % ispitanika pronađena je bakterija *F. nucleatum*, bakterija iz narančastoga spektra, koja sudjeluje u razvoju parodontne bolesti djelujujući kao pomagač pri adherenciji parodontnih patogena na već stvoreni biofilm koloniziran ranim bakterijskim kolonijama.

5.3 Povezanost pušenja s mikrobiološkim sastavom subgingivnoga prostora

Postoje brojna istraživanja koja proučavaju utjecaj pušenja na mikrobiološki sastav usne šupljine, posebno subgingivnoga prostora kao mjesta odakle kreće razvoj parodontne bolesti. Velika ih je većina usmjerena otkrivanju utjecaja ili povezanosti pušenja s mikrobiološkim sastavom usne šupljine kod ispitanika s razvijenim nekim od oblika parodontitisa. Većina istraživanja potvrđuje značajan utjecaj pušenja na mikrobiološku floru usne šupljine u razvijenoj parodontnoj bolesti (49, 50, 117, 119, 126, 128) bez obzira na to je li riječ o povećanome broju vrsta patogenih bakterija, većoj prevalenciji pojedinih patogena ili o tome da je mikrobiološka flora pušača i nepušača jednostavno različita po vrstama ili skupinama bakterija. U istraživanju koje su proveli na 50 ispitanika s kroničnim parodontitisom Gomes i sur. (163) proučavali su utjecaj pušenja na parodontni status i mikrobiološku floru subgingivnoga prostora te pokazali kako je kod pušača veća prevalencija poznatih parodontnih patogena, a samim tim i parodontološki status kod pušača znatno lošiji nego kod nepušača. Slične nalaze dobili su i Shchipkova i sur. (164) u istraživanju na 30 ispitanika s kroničnim parodontitisom. Haffajee i sur. (126) u svojemu istraživanju ističu razliku u prevalenciji različitih bakterijskih vrsta između pušača i nepušača nasuprot količini pojedinih bakterija. Bostrom i sur. (119) nisu dobili razlike između pušača i nepušača u prevalenciji parodontnih patogena kod ispitanika s uznapredovalim parodontitisom, što je objašnjeno kliničkim stadijem bolesti, ali dobili su razlike u pojedinim bakterijskim vrstama.

S druge strane, istraživanja o utjecaju pušenja na subgingivni mikrobiološki sastav kod parodontološki zdravih ispitanika znatno je manje, a i rezultati tih istraživanja veoma su različiti i često proturječni. Razlozi tako neujednačenih rezultata mogu biti mnogi: primjena različitih metoda identifikacije bakterija, različite ciljne populacije, drukčije tehnike prikupljanja uzoraka, nedovoljno kvalitetno isključivanje različitih zbunjujućih čimbenika.

U ovome istraživanju posebna je pažnja bila usmjerena ujednačenosti uzorka. Svi ispitanici bili su izjednačeni po dobi, spolu i parodontnome statusu, što su bili i uključni kriteriji kod probira ispitanika. Upitnikom o pušačkome statusu, brizi za oralno zdravlje te o prehrambenim navikama i konzumaciji alkoholnih pića pokušali smo detektirati mnoge potencijane zbunjujuće čimbenike kod ispitanika koji su uključeni u istraživanje. Rezultati upitnika pokazali su da ispitanici imaju dobru oralnu higijenu te da redovito odlaze doktoru dentalne medicine. Sve pronađene razlike uzete su u obzir u kasnijoj statističkoj analizi kako ne bi utjecale na rezultate.

Prema našim spoznajama nema istraživanja koje je obuhvatilo ovoliki broj mogućih zbunjujućih čimbenika te koje je imalo ovako ujednačeni uzorak.

Kod nepušača je u ovome istraživanju identificirano u prosjeku 5 vrsta bakterija po ispitaniku (interkvartilni raspon: 2 – 7), dok je kod pušača identificirano 6 vrsta bakterija po ispitaniku (interkvartilni raspon: 1 – 8). Iako nije bilo statističke značajnosti u ovoj razlici, uočava se da je raspršenost rezultata kod pušača znatno veća od one kod nepušača. S obzirom na ujednačenost ispitnih skupina po svim drugim kriterijima osim po pušenju, može se zaključiti da je veća raznolikost bakterija kod pušača povezana s pušenjem. Slične rezultate dobili smo i kod analize aerobnih i anaerobnih bakterija. Kod nepušača su u prosjeku identificirane 2 vrste aerobnih bakterija (interkvartilni raspon: 2 – 4) i 2 vrste anaerobnih bakterija (interkvartilni raspon: 0 – 3), dok su kod pušača u prosjeku identificirane 3 vrste aerobnih bakterija (interkvartilni raspon: 1 – 5) i 2 vrste anaerobnih bakterija (interkvartilni raspon: 0 – 5).

Statistički značajno, neovisno je pozitivno s brojem svih bakterija i s brojem aerobnih bakterija bila povezana češća konzumacija vina. Statistički značajni prediktori manjega broja anaerobnih bakterija bile su dob i srednje tvrda ili tvrda četkica za zube.

Promatrajući prevalencije koljena bakterija u skupini nepušača i pušača, iako nije bilo statističke značajne razlike, uočava se veća prevalencija koljena *Fusobacteria* kod pušača (38 % kod pušača, 18 % kod nepušača). Vrste iz koljena *Fusobacteria*, često povezivane s parodontitisom (108), u mnogim istraživanjima kod pušača s razvijenim parodontitisom pokazuju veću prevalenciju (157, 164, 165). Vrste iz ovoga roda nisu najvažniji parodontni patogeni, ali imaju vrlo važnu ulogu u stvaranju subgingivnoga biofilma u kojemu djeluju kao premosnik između ranih kolonizatora i parodontnih patogena, a imaju i lokalno imunosupresivno djelovanje (166). Nedostatak statističke značajnosti kod našega rezultata može se objasniti činjenicom da su naši ispitanici bili parodontološki zdravi, dok su u svim drugim istraživanjima ispitanici već imali razvijenu parodontnu bolest.

Kada smo identificirane bakterijske vrste grupirali po bojama prema Socransky i sur. (108), nismo pronašli statistički značajne razlike između pušača i nepušača. Žuti kompleks bio je najdominantniji i kod jednih i kod drugih, dok je narančasti kompleks bio najslabije zastupljen, s prevalencijom nešto većom kod pušača nego kod nepušača. Slične rezultate dobili su i Mason i sur. (116) u istraživanju na 200 parodontološki zdravih ispitanika u dobi od 21 do 40 godina. Kod ljubičastoga kompleksa, koji čine *V. parvula* i *A. odontolyticus*, razlika je bila nešto veća

u korist pušača, u prvome redu zahvaljujući bakteriji *A. odontolyticus*, što će kasnije biti objašnjeno.

Ni na razini prevalencije rodova aerobnih bakterija nije bilo statistički značajne razlike između pušača i nepušača, što je, s obzirom na zdravlje ispitanika, i očekivano. Kod prevalencije rodova anaerobnih bakterija, iako nije bilo statistički značajne razlike, uočavaju se određene razlike u količini anaerobnih bakterija u korist pušača. I ukupni broj identificiranih anaerobnih bakterija bio je kod pušača veći nego kod nepušača, pogotovo u odnosu na aerobne bakterije, gdje je podjela bila ujednačena. Od rodova se ističu rod *Fusobacterium* i rod *Actinomyces* s nešto većom prevalencijom kod pušača. Pretpostavlja se da pušenje utječe na dostupnost kisika u ustima i da smanjuje oksidacijski redukcijski potencijal te na taj način pogoduje anaerobnim bakterijama (167).

Na razini prevalencije vrsta bakterija kod pušača i nepušača pronađene su dvije bakterijske vrste sa statistički značajnom razlikom između pušača i nepušača.

U ovom istraživanju prevalencija bakterije *S. sanguinis* bila je statistički značajno veća kod nepušača nego kod pušača. Iako nema puno istraživanja koja prate ovu bakteriju, jer je većina istraživanja usredotočena na prevalenciju poznatih parodontnih patogena ili analizira bakterije samo do razine roda, postoji ipak nekoliko istraživanja sa sličnim rezultatima. Shchipkova i sur. (164) su u istraživanju na 15 pušača i 15 nepušača s kroničnim parodontitisom dobili statistički značajno manju prevalenciju bakterije *S. sanguinis* kod pušača. Mason i sur. (116) su u istraživanju na 200 parodontološki zdravih pušača i nepušača također dobili manju prevalenciju vrste *S. sanguinis* kod pušača. Tanner i sur. (168) uspoređivali su zdrave ispitanike s ispitanicima s gingivitisom i inicijalnim parodontitisom te su dobili najveću prevalenciju *S. sanguinisa* kod zdravih ispitanika, dok ih kod ispitanika s inicijalnim parodontitisom nije uopće bilo. Mager i sur. (46) navode veću prevalenciju roda *Streptococcus* kod nepušača u usporedbi s pušačima i s ispitanicima s parodontnom bolešću; slične rezultate dobili su i Thomas i sur. (169) i Lie i sur. (129). U istraživanjima Wua i sur. (127) i Kumara i sur. (115) pronađeni su suprotni rezultati na razini rodova – rod *Streptococcus* bio je prevalentniji kod pušača. U tim istraživanja doduše nema podataka za vrste iz roda *Streptococcus,* tako da se ne zna kakvu ulogu u toj raspodjeli ima *S. sanguinis*.

S. sanguinis je bakterija koja prema Socransky i sur. (108) spada u žuti spektar te uz *S. mitis* i *S. oralis* spada u najranije kolonizatore površine zuba i subgingivnoga prostora. Prema mnogim autorima *S. sanguinis* spada u dobroćudne, zaštitne bakterije (133, 170–173). Stingu i sur. (133)

su u istraživanju na 33 ispitanika s agresivnim parodontitisom i 20 zdravih ispitanika u kontrolnoj skupini utvrdili povezanost ispitanika koji imaju agresivni parodontitis s manjom prevalencijom bakterije *S. sanguinis.* Teughels i sur. (173) su u *in vitro* istraživanju dokazali utjecaj bakterije *S. sanguinis* na smanjenu sposobnost adherencije bakterije *A. actinomycetemcommitans. S. sanguinis* proizvodi vodikov peroksid koji inhibira adherenciju i rast parodontoloških patogena *A. actinomycetemcommitans* (171, 173) *i P. gingivalis* (174). Sličan učinak bakterije *S. sanguinis* proučavan je u odnosu s poznatim kariogenim patogenom *S. mitis* (170, 175). *A. actinomycetemcommitans*, s druge strane, ima sposobnost proizvodnje bakteriocina koji može ubiti *S. sanguinis* (176), što potvrđuje iznimnu složenost ekosistema kakav je biofilm na površini zuba, a odnos koji prevlada određuje konačno hoće li doći do razvoja bolesti. Rezultat našega istraživanja pokazuje da pušači, iako zdravi i bez parodontnih patogena, imaju veći rizik od razvoja parodontne bolesti.

U ovome je istraživanju pronađena i statistički značajna prevalencija bakterije *A. odontolyticus* kod pušača. Ta je bakterija najpoznatija po svojoj ulozi u razvoju karijesa korijena zuba i u razvoju pulpitisa (177). Glavna značajka te bakterije velika je sposobnost adherencije na površinu zuba i koagregacija s drugim bakterijama (178, 179). Ta bakterija, zajedno s bakterijom *V. parvula*, čini ljubičasti kompleks prema Socransky i sur. (108) te spada u rane kolonizatore površine zuba i subgingivnoga prostora. Kako su autori objasnili, ljubičasti kompleks služi kao most prema narančastomu te na nekim mjestima i crvenomu kompleksu, te se na taj način ova bakterija povezuje i s parodontnom bolesti. U istraživanjima u kojima se uspoređuje mikrobiološki profil zdravih ispitanika s profilima onih koji boluju od nekoga oblika parodontne bolesti uglavnom se nalazi veća prevalencija bakterije *A. odontolyticus* kod parodontoloških bolesnika (162, 180, 181), iako postoje istraživanja koji nisu pronašli takvu povezanost (161).

Iako nije bilo statističke značajnosti, uočava se veća prevalencija bakterije *F. nucleatum* kod pušača. *F. nucleatum* anaerobna je bakterija koja pripada koljenu *Fusobacterium*. Prema raspodjeli kompleksa po Socransky i sur. (108) ta bakterija pripada u narančasti kompleks, skupinu mogućih parodontnih patogena koji čine premosnicu između ranih kolonizatora zubnoga biofilma i crvenoga kompleksa, koji čine dokazani parodontni patogeni. *F. nucleatum* sudjeluje u mnogim interakcijama unutar biofilma koje su važne kod inicijalne faze parodontne bolesti (182). Ima veliku sposobnost adherencije na rane kolonizatore zubnoga i subgingivnoga biofilma te poslije i koagregaciju s parodontnim patogenima iz crvenoga kompleksa (*P. gingivalis, T. denticola* i *T. forsythia*) (183 – 185). Osim koagregacije, *F. nucleatum* ima

sposobnost modulacije imunološkoga odgovora domaćina (166, 186), a njezini produkti služe kao izvor energije za druge parodontne patogene (187), pri čemu veliku ulogu ima i bakterija *S. gordonii*, još jedna bakterija koja je u našemu istraživanju imala veću prevalenciju kod pušača. Često se ističe uloga kompleksa ovih dviju bakterija u vezanju bakterije *P. gingivalis* (188, 189), a utvrđena je i povezanost toga kompleksa s nikotinom iz cigareta (190).

6. ZAKLJUČCI

1. Izrađen je mikrobiološki profil subgingivnoga prostora u mladih parodontološki zdravih ljudi kojim su identificirane 63 različite bakterijske vrste podijeljene u 5 koljena: *Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteriodetes, Fusobacteria* i *Firmicutes.* Na razini roda najzastupljeniji su bili rodovi *Streptococcus, Actinomyces* i *Veillonela,* a na razini vrste *S. oralis, S. mitis, A. oris,* S. *sanguinis* i *V. Parvula.*

2. Pušenje je povezano s većom prevalencijom koljena *Fusobacterium* i s većom prevalencijom anaerobnih bakterija.

3. Pušenje je povezano s većom prevalencijom bakterije *A. odontolyticus,* koja sudjeluje u početnoj fazi razvoja parodontne bolesti.

4. Pušenje je povezano s manjom prevalencijom bakterije *S. sanguinis,* koja ima zaštitnu ulogu u razvoju parodontne bolesti.

5. Potrebna su dodatna istraživanja na većemu uzorku kako bi se dodatno pojasnio utjecaj pušenja na subgingivni prostor.

7. LITERATURA

1. Dečković Vukres V, Ivičević Uhernik A, Mihel S. Istraživanje o uporabi duhana u odrasloj populaciji Republike Hrvatske. Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015.

2. Organization WH, others. Smoking and its effects on health. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva, Switzerland.; 1975.

3. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. vol. 100 E. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2009.

4. M P Eriksen, C A LeMaistre, Newell and GR. Health Hazards of Passive Smoking. Annu Rev Public Health 1988;9:47–70.

5. Jarvik ME, Schneider NG. Nicotine. Subst Abuse Compr Textb 2nd Ed Baltim Williams Wilkins 1992:334–56.

6. Zorc B, Iličić Ž. Nicotine and smoking. Farm Glas 1998;54:327–34.

7. Julien RM. A primer of drug action: A concise nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs, revised and updated. Holt Paperbacks; 2013.

8. Derendorf H, others. Drug Actions: Basic Principles and Theraputic Aspects. CRC press; 1995.

9. Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, et al. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. Science 2004;306:1029–32.

10. Katzung B, Trevor A. Basic and Clinical Pharmacology 13 E. 13 edition. New York: McGraw-Hill Education / Medical; 2014.

11. Ernst A, Zibrak JD. Carbon monoxide poisoning. N Engl J Med 1998;339:1603–8.

12. Hart CL. Carboxyhaemoglobin concentration, smoking habit, and mortality in 25 years in the Renfrew/Paisley prospective cohort study. Heart 2005;92:321–4.

13. Sen S, Peltz C, Beard J, Zeno B. Recurrent carbon monoxide poisoning from cigarette smoking. Am J Med Sci 2010;340:427–8.

14. Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S. Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. J Periodontol 2000;71:1846–51.

15. Phillips DH. Fifty years of benzo(a)pyrene. Nature 1983;303:468–72.

16. Hecht SS, Hoffmann D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. Carcinogenesis 1988;9:875–84.

17. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nat Rev Cancer 2003;3:733–44.

18. Carranza FA, Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR. Carranza's clinical periodontology. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier; 2006.

19. Lindhe J, Karring T, Lang N. Klinička parodontologija i dentalna implantologija - Prema 4. engleskom izdanju. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2002.

20. Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. Periodontol 2000 2016;70:53–64.

21. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? Periodontol 2000 2005;39:53–72.

22. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. J Clin Periodontol 2007;34:370–6.

23. Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godboley D, et al. Macrophage Inflammatory Protein-1α Shows Predictive Value as a Risk Marker for Subjects and Sites Vulnerable to Bone Loss in a Longitudinal Model of Aggressive Periodontitis. PLoS ONE 2014;9.

24. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Ann Periodontol 1999;4:1–6.

25. Williams R. Periodontal disease: the emergence of a new paradigm. Compend Contin Educ Dent Jamesburg NJ 1995 2001;22:3–6.

26. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in man and other animals: a comparative review. Basel: Karger; 1982.

27. Plancak D, Jorgic–Srdjak K, Curilovic Z. Nova klasifikacija parodontnih bolesti. Acta Stomatol Croat 2001;35:89–93.

28. Bosnjak A, Plancak D, Curilovic Z. Advances in the relationship between periodontitis and systemic diseases. Acta Stomatol Croat 2001;35:267-71.

29. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. J Periodontol 1993;64:16–23.

30. Position paper: tobacco use and the periodontal patient. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. J Periodontol 1999;70:1419–27.

31. Axelsson P, Paulartder J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. J Clin Periodontol 1998;25:297–305.

32. Linden GJ, Mullally BH. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. J Periodontol 1994;65:718–23.

33. van der Weijden GA, de Slegte C, Timmerman MF, van der Velden U. Periodontitis in smokers and non-smokers: intra-oral distribution of pockets. J Clin Periodontol 2001;28:955–60.

34. Holm G. Smoking as an additional risk for tooth loss. J Periodontol 1994;65:996–1001.

35. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol 1994;65:260–7.

36. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. J Clin Periodontol 2001;28:283–95.

37. Bergström J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. J Periodontol 2000;71:1338–47.

38. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL. Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. J Periodontol 1983;54:481–7.

39. Bahrami G, Væth M, Kirkevang L-L, Wenzel A, Isidor F. The impact of smoking on marginal bone loss in a 10-year prospective longitudinal study. Community Dent Oral Epidemiol 2017;45:59–65.

40. Bergström J. Tobacco smoking and subgingival dental calculus. J Clin Periodontol 2005;32:81–8.

41. Bergström J. Tobacco smoking and supragingival dental calculus. J Clin Periodontol 1999;26:541–7.

42. Acharya A, Kharadi MDU, Dhavale R, Deshmukh VL, Sontakke AN. High salivary calcium level associated with periodontal disease in Indian subjects--a pilot study. Oral Health Prev Dent 2011;9:195–200.

43. Amarasena N, Ekanayaka ANI, Herath L, Miyazaki H. Tobacco use and oral hygiene as risk indicators for periodontitis. Community Dent Oral Epidemiol 2002;30:115–23.

44. Bergström J. Influence of tobacco smoking on periodontal bone height. Long-term observations and a hypothesis. J Clin Periodontol 2004;31:260–6.

45. Jansson L, Lavstedt S. Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss--a prospective study over 20 years. J Clin Periodontol 2002;29:750–6.

46. Mager DL, Haffajee AD, Socransky SS. Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. J Clin Periodontol 2003;30:1031–7.

47. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. J Clin Periodontol 2000;27:417–24.

48. Eggert F-M, McLeod MH, Flowerdew G. Effects of Smoking and Treatment Status on Periodontal Bacteria: Evidence That Smoking Influences Control of Periodontal Bacteria at the Mucosal Surface of the Gingival Crevice. J Periodontol 2001;72:1210–20.

49. van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, van der Reijden WA. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. J Periodontol 2001;72:666–71.

50. Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. J Clin Periodontol 2005;32:973–83.

51. Calsina G, Ramón J-M, Echeverría J-J. Effects of smoking on periodontal tissues. J Clin Periodontol 2002;29:771–6.

52. Dietrich T, Bernimoulin J-P, Glynn RJ. The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. J Periodontol 2004;75:16–22.

53. Boström L, Linder LE, Bergström J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. J Clin Periodontol 1998;25:767–73.

54. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. J Periodontol 2004;75:1033–41.

55. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. J Periodontol 2000;71:743–51.

56. Al-Wahadni A, Linden GJ. The effects of cigarette smoking on the periodontal condition of young Jordanian adults. J Clin Periodontol 2003;30:132–7.

57. Torrungruang K, Nisapakultorn K, Sutdhibhisal S, Tamsailom S, Rojanasomsith K, Vanichjakvong O, et al. The Effect of Cigarette Smoking on the Severity of Periodontal Disease Among Older Thai Adults. J Periodontol 2005;76:566–72.

58. Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. J Clin Periodontol 2004;31:951–8.

59. Ylöstalo P, Sakki T, Laitinen J, Järvelin M-R, Knuuttila M. The relation of tobacco smoking to tooth loss among young adults. Eur J Oral Sci 2004;112:121–6.

60. Al-Bayaty FH, Baharuddin N, Abdulla MA, Ali HM, Arkilla MB, ALBayaty MF. The Influence of Cigarette Smoking on Gingival Bleeding and Serum Concentrations of Haptoglobin and Alpha 1-Antitrypsin. BioMed Res Int 2013;2013.

61. Kumar V, Faizuddin M. Effect of smoking on gingival microvasculature: A histological study. J Indian Soc Periodontol 2011;15:344–8.

62. Peruzzo DC, Gimenes JH, Taiete T, Casarin RCV, Feres M, Sallum EA, et al. Impact of smoking on experimental gingivitis. A clinical, microbiological and immunological prospective study. J Periodontal Res 2016;51:800–11.

63. Gunsolley JC, Quinn SM, Tew J, Gooss CM, Brooks CN, Schenkein HA. The effect of smoking on individuals with minimal periodontal destruction. J Periodontol 1998;69:165–70.

64. Shiloah J, Patters MR, Waring MB. The Prevalence of Pathogenic Periodontal Microflora in Healthy Young Adult Smokers. J Periodontol 2000;71:562–7.

65. Müller H-P, Stadermann S, Heinecke A. Longitudinal association between plaque and gingival bleeding in smokers and non-smokers. J Clin Periodontol 2002;29:287–94.

66. Müller HP, Heinecke A, Eger T. Site-specific association between supragingival plaque and bleeding upon probing in young adults. Clin Oral Investig 2000;4:212–8.

67. Bergström J, Preber H. Tobacco Use as a Risk Factor. J Periodontol 1994;65:545–50.

68. Hyman JJ, Reid BC. Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. J Clin Periodontol 2003;30:230–7.

69. Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aeppli DM, Wolff LF, et al. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. J Periodontol 1993;64:1225–30.

70. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. Periodontol 2000 2007;44:178–94.

71. Bergström J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. J Clin Periodontol 2000;27:61–8.

72. Kubota M, Yanagita M, Mori K, Hasegawa S, Yamashita M, Yamada S, et al. The Effects of Cigarette Smoke Condensate and Nicotine on Periodontal Tissue in a Periodontitis Model Mouse. PLOS ONE 2016.

73. Won YS, Kim JH. Association between cigarette smoking status and periodontal disease in adults: results from the 2012 Korea national health and nutrition examination survey. J Korean Acad Oral Health 2016;40:133–9.

74. Jalayer Naderi N, Semyari H, Elahinia Z. The Impact of Smoking on Gingiva: a Histopathological Study. Iran J Pathol 2015;10:214–20.

75. Preianò M, Falcone D, Maggisano G, Montalcini T, Navarra M, Paduano S, et al. Assessment of pre-analytical and analytical variables affecting peptidome profiling of gingival crevicular fluid by MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Chim Acta 2014;437:120–8.

76. Iho S, Tanaka Y, Takauji R, Kobayashi C, Muramatsu I, Iwasaki H, et al. Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-kappaB. J Leukoc Biol 2003;74:942–51.

77. Sørensen LT, Nielsen HB, Kharazmi A, Gottrup F. Effect of smoking and abstention on oxidative burst and reactivity of neutrophils and monocytes. Surgery 2004;136:1047–53.

78. Güntsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. J Periodontal Res 2006;41:184–8.

79. Friedman H, Newton C, Klein TW. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse. Clin Microbiol Rev 2003;16:209–19.

80. Sönmez S, Canda T, Ozkara E, Ak D. Quantitative evaluation of the vasculature and fibronectin localization in gingival connective tissue of smokers and non-smokers. J Periodontol 2003;74:822–30.

81. Sreedevi M, Ramesh A, Dwarakanath C. Periodontal Status in Smokers and Nonsmokers: A Clinical, Microbiological, and Histopathological Study. Int J Dent 2012.

82. de Oliveira Semenzati G, de Souza Salgado B, Rocha NS, Michelin Matheus SM, de Carvalho LR, Garcia Martins RH. Histological and immunohistochemical study of the expression of p53 and ki-67 proteins in the mucosa of the tongue, pharynx and larynx of rats exposed to cigarette smoke. Inhal Toxicol 2012;24:723–31.

83. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. J Clin Periodontol 2004;31:267–72.

84. Meekin TN, Wilson RF, Scott DA, Ide M, Palmer RM. Laser Doppler flowmeter measurement of relative gingival and forehead skin blood flow in light and heavy smokers during and after smoking. J Clin Periodontol 2000;27:236–42.

85. Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. J Periodontol 1996;67:675–81.

86. Miller PD. Root coverage with the free gingival graft. Factors associated with incomplete coverage. J Periodontol 1987;58:674–81.

87. Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study. J Clin Periodontol 1995;22:229–34.

88. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Zambon JJ, Cummins D, Genco RJ. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. J Periodontol 1996;67:1094–102.

89. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. J Dent Educ 2001;65:313–21.

90. Fiorini T, Musskopf ML, Oppermann RV, Susin C. Is There a Positive Effect of Smoking Cessation on Periodontal Health? A Systematic Review. J Periodontol 2013;85:83–91.

91. Chambrone L, Preshaw PM, Rosa EF, Heasman PA, Romito GA, Pannuti CM, et al. Effects of smoking cessation on the outcomes of non-surgical periodontal therapy: a systematic review and individual patient data meta-analysis. J Clin Periodontol 2013;40:607–15.

92. Rosa EF, Corraini P, Inoue G, Gomes EF, Guglielmetti MR, Sanda SR, et al. Effect of smoking cessation on non-surgical periodontal therapy: results after 24 months. J Clin Periodontol 2014;41:1145–53.

93. Grossi SG, Zambon J, Machtei EE, Schifferle R, Andreana S, Genco RJ, et al. Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. J Am Dent Assoc 1939 1997;128:599–607.

94. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. J Clin Periodontol 1997;24:324–34.

95. Baumert Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwart KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. J Clin Periodontol 1994;21:91–7.

96. Bain CA. Smoking and implant failure--benefits of a smoking cessation protocol. Int J Oral Maxillofac Implants 1996;11:756–9.

97. Reibel J. Tobacco or oral health. Bull World Health Organ 2005;83:643.

98. Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:14547–52.

99. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. J Bacteriol 2001;183:3770–83.

100. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, et al. Diversity of Bacterial Populations on the Tongue Dorsa of Patients with Halitosis and Healthy Patients. J Clin Microbiol 2003;41:558–63.

101. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, et al. The Human Oral Microbiome. J Bacteriol 2010;192:5002–17.

102. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. Sci Am 1978;238:86–95.

103. Newman HN, Wilson M. Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease ; Proceedings of a Conference Held at the Royal College of Physicians, London 3-5 November, 1999. BioLine; 1999.

104. Listgarten MA. Structure of the Microbial Flora Associated with Periodontal Health and Disease in Man: A Light and Electron Microscopic Study. J Periodontol 1976;47:1–18.

105. Listgarten MA, Lai C-H, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. J Periodontol 1993;64:155–61.

106. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. J Periodontal Res 1995;30:332–41.

107. Dibart S, Skobe Z, Snapp KR, Socransky SS, Smith CM, Kent R. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. Mol Oral Microbiol 1998;13:30–5.

108. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998;25:134–44.

109. Drannik AG, Pouladi MA, Robbins CS, Goncharova SI, Kianpour S, Stämpfli MR. Impact of Cigarette Smoke on Clearance and Inflammation after Pseudomonas aeruginosa Infection. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:1164–71.

110. Andreou V, D'Addario M, Zohar R, Sukhu B, Casper R f., Ellen R p., et al. Inhibition of Osteogenesis In Vitro by a Cigarette Smoke-Associated Hydrocarbon Combined With Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide: Reversal by Resveratrol. J Periodontol 2004;75:939–48.

111. Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, et al. Persistent Colonization with Tannerella forsythensis and Loss of Attachment in Adolescents. J Dent Res 2004;83:232–5.

112. Nonnenmacher C, Mutters R, Jacoby LF de. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. Clin Microbiol Infect 2001;7:213–7.

113. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. Oral Microbiology and Immunology, Second Edition. American Society of Microbiology; 2014.

114. Albandar JM, Buischi YA, Oliveira LB, Axelsson P. Lack of effect of oral hygiene training on periodontal disease progression over 3 years in adolescents. J Periodontol 1995;66:255–60.

115. Kumar PS, Matthews CR, Joshi V, Jager M de, Aspiras M. Tobacco Smoking Affects Bacterial Acquisition and Colonization in Oral Biofilms. Infect Immun 2011;79:4730–8.

116. Mason MR, Preshaw PM, Nagaraja HN, Dabdoub SM, Rahman A, Kumar PS. The subgingival microbiome of clinically healthy current and never smokers. ISME J 2015;9:268–72.

117. Karasneh JA, Al Habashneh RA, Marzouka NAS, Thornhill MH. Effect of cigarette smoking on subgingival bacteria in healthy subjects and patients with chronic periodontitis. BMC Oral Health 2017;17.

118. Yu G, Phillips S, Gail MH, Goedert JJ, Humphrys MS, Ravel J, et al. The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota. Microbiome 2017;5:3.

119. Boström L, Bergström J, Dahlén G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. J Clin Periodontol 2001;28:212–9.

120. Gomes SC, Nonnenmacher C, Susin C, Oppermann RV, Mutters R, Marcantonio RAC. The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers

and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. J Periodontol 2008;79:2297–304.

121. Kanwar A, Sah K, Grover N, Chandra S, Singh RR. Long-term effect of tobacco on resting whole mouth salivary flow rate and pH: An institutional based comparative study. Eur J Gen Dent 2013;2:296.

122. Kenney EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. J Periodontal Res 1977;12:227–34.

123. Brook I. The impact of smoking on oral and nasopharyngeal bacterial flora. J Dent Res 2011;90:704–10.

124. Macgregor ID. Effects of smoking on oral ecology. A review of the literature. Clin Prev Dent 1989;11:3–7.

125. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. Nat Rev Immunol 2002;2:372–7.

126. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. J Clin Periodontol 2001;28:377–88.

127. Wu J, Peters BA, Dominianni C, Zhang Y, Pei Z, Yang L, et al. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. ISME J 2016;10:2435–46.

128. Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. J Periodontal Res 1999;34:25–33.

129. Lie MA, Weijden GA, Timmerman MF, Loos BG, Steenbergen TJM, Velden U. Oral microbiota in smokers and non-smokers in natural and experimentally-induced gingivitis. J Clin Periodontol 2005;25:677–86.

130. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis 1998;19:1853–61.

131. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J-L, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clin Biochem 2011;44:104–9.

132. Macarthur DJ, Jacques NA. Proteome analysis of oral pathogens. J Dent Res 2003;82:870–6.

133. Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schaumann R, Eschrich K. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. Mol Oral Microbiol 2008;23:372–6.

134. Len ACL, Cordwell SJ, Harty DWS, Jacques NA. Cellular and extracellular proteome analysis of Streptococcus mutans grown in a chemostat. Proteomics 2003;3:627–46.

135. Veith PD, Talbo GH, Slakeski N, Reynolds EC. Identification of a novel heterodimeric outer membrane protein of Porphyromonas gingivalis by two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. Eur J Biochem 2001;268:4748–57.

136. Nagy E, Becker S, Kostrzewa M, Barta N, Urban E. The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. J Med Microbiol 2012;61:1393–400.

137. Veloo ACM, Welling GW, Degener JE. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. Anaerobe 2011;17:211–2.

138. Veloo ACM, Erhard M, Welker M, Welling GW, Degener JE. Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. Syst Appl Microbiol 2011;34:58–62.

139. Boraldi F, Bini L, Liberatori S, Armini A, Pallini V, Tiozzo R, et al. Normal human dermal fibroblasts: proteomic analysis of cell layer and culture medium. Electrophoresis 2003;24:1292–310.

140. Conrads KA, Yu L-R, Lucas DA, Zhou M, Chan KC, Simpson KA, et al. Quantitative proteomic analysis of inorganic phosphate-induced murine MC3T3-E1 osteoblast cells. Electrophoresis 2004;25:1342–52.

141. Chang E-J, Kwak HB, Kim H, Park J-C, Lee ZH, Kim H-H. Elucidation of CPX-1 involvement in RANKL-induced osteoclastogenesis by a proteomics approach. FEBS Lett 2004;564:166–70.

142. Bozic D, Grgurevic L, Erjavec I, Brkljacic J, Orlic I, Razdorov G, et al. The proteome and gene expression profile of cementoblastic cells treated by bone morphogenetic protein-7 in vitro. J Clin Periodontol 2012;39:80–90.

143. Vitorino R, de Morais Guedes S, Ferreira R, Lobo MJC, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, et al. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. Eur J Oral Sci 2006;114:147–53.

144. Peluso G, De Santis M, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Messana I, et al. Proteomic study of salivary peptides and proteins in patients with Sjögren's syndrome before and after pilocarpine treatment. Arthritis Rheum 2007;56:2216–22.

145. Hu S, Yu T, Xie Y, Yang Y, Li Y, Zhou X, et al. Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. Cancer Genomics Proteomics 2007;4:55–64.

146. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int Dent J 1975;25:229–35.

147. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The Plaque Control Record. Journal of Periodontology. 1972;43(1): 38.

148. Zimbro MJ, editor. Difco & BBL Manual: manual of microbiological culture media. 2. ed. Sparks, MD: Becton, Dickinson; 2009.

149. Garcia LS, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition. American Society of Microbiology; 2010.

150. Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. J Clin Periodontol 2006;33:241–53.

151. Kamagata-Kiyoura Y, Ohta M, Cheuk G, Yazdani M, Saltzman MJ, Nakamoto T. Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells (UMR106-01). J Periodontol 1999;70:283–8.

152. Ng N, Kaye EK, Garcia RI. Coffee consumption and periodontal disease in males. J Periodontol 2014;85:1042–9.

153. Signoretto C, Bianchi F, Burlacchini G, Sivieri F, Spratt D, Canepari P. Drinking Habits Are Associated with Changes in the Dental Plaque Microbial Community. J Clin Microbiol 2010;48:347–56.

154. Sharma R, Reddy VKL, Prashant G, Ojha V, Kumar NP. Antimicrobial and anti-adherence activity of various combinations of coffee-chicory solutions on Streptococcus mutans: An in-vitro study. J Oral Maxillofac Pathol JOMFP 2014;18:201–6.

155. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. J Clin Microbiol 2005;43:5721–32.

156. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. ISME J 2010;4:962–74.

157. Moon J-H, Lee J-H, Lee J-Y. Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in Korean chronic periodontitis patients. Mol Oral Microbiol 2015;30:227–41.

158. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, et al. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. J Clin Periodontol 1998;25:346–53.

159. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000 1997;14:12–32.

160. Maestre JR, Bascones A, Sánchez P, Matesanz P, Aguilar L, Giménez MJ, et al. Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. Rev Esp Quimioter 2007;20:61–7.

161. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra-and subgingival plaque in health and periodontitis. J Clin Periodontol 2000;27:648–57.

162. Teles RP, Sakellari D, Teles FRF, Konstantinidis A, Kent R, Socransky SS, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. J Periodontol 2010;81:89–98.

163. Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, et al. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. J Periodontol 2006;77:1483–90.

164. Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival Microbial Profiles of Smokers with Periodontitis. J Dent Res 2010;89:1247–53.

165. Bizzarro S, Loos BG, Laine ML, Crielaard W, Zaura E. Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in periodontitis: an exploratory study using traditional targeted techniques and a next-generation sequencing. J Clin Periodontol 2013;40:483–92.

166. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. Fusobacterium nucleatum in periodontal health and disease. Curr Issues Mol Biol 2011;13:25–36.

167. Kenney EB, Saxe SR, Bowles RD. The Effect of Cigarette Smoking on Anaerobiosis in the Oral Cavity. J Periodontol 1975;46:82–5.

168. Tanner A, Maiden MFJ, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. J Clin Periodontol 1998;25:85–98.

169. Thomas AM, Gleber-Netto FO, Fernandes GR, Amorim M, Barbosa LF, Francisco AL, et al. Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa biofilms. BMC Microbiol 2014;14:250.

170. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and Coexistence between Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis in the Dental Biofilm. J Bacteriol 2005;187:7193–203.

171. Hillman JD, Socransky SS. Bacterial interference in the oral ecology of Actinobacillus actinomycetemcomitans and its relationship to human periodontosis. Arch Oral Biol 1982;27:75–7.

172. Hillman JD, Socransky SS, Shivers M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. Arch Oral Biol 1985;30:791–5.

173. Teughels W, Kinder Haake S, Sliepen I, Pauwels M, Van Eldere J, Cassiman J-J, et al. Bacteria Interfere with A. actinomycetemcomitans Colonization. J Dent Res 2007;86:611–7.

174. Zhang JC, Zhou C, Wu B, Zhang YH. Investigation on interaction between Streptococcus sanguis and Porphyromonas gingivalis in specific pathogen-free rats. Chin J Dent Res 2000;3:5–9.

175. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence 2011;2:435–44.

176. Hammond BF, Lillard SE, Stevens RH. A bacteriocin of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun 1987;55:686–91.

177. Tang G, Samaranayake LP, Yip H-K, Chu FCS, Tsang PCS, Cheung BPK. Direct detection of Actinomyces spp. from infected root canals in a Chinese population: a study using PCR-based, oligonucleotide-DNA hybridization technique. J Dent 2003;31:559–68.

178. Hamada S, Amano A, Kimura S, Nakagawa I, Kawabata S, Morisaki I. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. Oral Microbiol Immunol 1998;13:129–38.

179. Egland PG, Dû LD, Kolenbrander PE. Identification of Independent Streptococcus gordonii SspA and SspB Functions in Coaggregation with Actinomyces naeslundii. Infect Immun 2001;69:7512–6.

180. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MPA, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol 2009;36:739–49.

181. Vielkind P, Jentsch H, Eschrich K, Rodloff AC, Stingu C-S. Prevalence of Actinomyces spp. in patients with chronic periodontitis. Int J Med Microbiol 2015;305:682–8.

182. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol 2000;54:413–37.

183. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res 2004;38:204–11.

184. Scheie AA, Petersen FC. The Biofilm Concept: Consequences for Future Prophylaxis of Oral Diseases? Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol 2004;15:4–12.

185. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of Fusobacterium nucleatum and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. Infect Immun 1998;66:4729–32.

186. Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, et al. Induction of Apoptotic Cell Death in Peripheral Blood Mononuclear and Polymorphonuclear Cells by an Oral Bacterium,Fusobacterium nucleatum. Infect Immun 2000;68:1893–8.

187. Kim A-R, Jeong M-J, Ahn Y-S, Kim M-N, Kim S-I, Lim D-S. The Interactive Effect of These Bacterial Substrates on the Growth of Streptococcus gordonii, Fusobacterium nucleatum and Porphyromonas gingivalis. J Dent Hyg Sci 2015;15:209–19.

188. Hendrickson EL, Wang T, Dickinson BC, Whitmore SE, Wright CJ, Lamont RJ, et al. Proteomics of Streptococcus gordonii within a model developing oral microbial community. BMC Microbiol 2012;12:211.

189. Hendrickson EL, Wang T, Beck DAC, Dickinson BC, Wright CJ, J Lamont R, et al. Proteomics of Fusobacterium nucleatum within a model developing oral microbial community. MicrobiologyOpen 2014;3:729–51.

190. Huang R, Li M, Ye M, Yang K, Xu X, Gregory RL. Effects of Nicotine on Streptococcus gordonii Growth, Biofilm Formation, and Cell Aggregation. Appl Environ Microbiol 2014;80:7212–8.

8. ŽIVOTOPIS

Krešimir Bašić rođen je 1982. godine u Zagrebu. Nakon završene XV. gimnazije u Zagrebu upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje diplomira 2009. godine. Nakon obavljenoga pripravničkog staža i godine dana rada u privatnoj stomatološkoj ordinaciji 2011. godine zapošljava se na Stomatološkome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kao asistent na Katedri za farmakologiju, gdje je i danas zaposlen, te upisuje poslijediplomski doktorski studij Dentalne medicine. 2016. godine započeo je specijalizaciju iz oralne kirurgije.

Tijekom studija bio je predsjednik Studentskoga zbora Sveučilišta u Zagrebu, član Senata Sveučilišta u Zagrebu, Rektorskoga kolegija u širemu sastavu, član Fakultetskoga vijeća Stomatološkoga fakulteta, brojnih odbora i povjerenstava Fakulteta i Sveučilišta te je sudjelovao u organizaciji nekoliko velikih međunarodnih i domaćih kongresa. Zbog svojega angažmana 2008. godine nagrađen je Priznanjem dekana za posebno zalaganje, uspjeh i promicanje studentskih interesa.

Kao suradnik u nastavi iz predmeta Opća farmakologija i Dentalna farmakologija radi od 2011. godine, a 2013. godine dobio je Priznanje dekana za najbolje ocijenjenoga suradnika po rezultatima studentske ankete.

Autor je ili suautor jednoga sveučilišnog priručnika, pet znanstvenih članaka, od čega su dva objavljena u CC časopisima, te petnaest sažetaka i priopćenja na domaćim i međunarodnim skupovima.

Član je Hrvatskoga stomatološkog društva, Hrvatskoga društva farmakologa, Hrvatskoga društva za dentalnu implantologiju te Radne skupine za odnose s medijima, marketing i dentalnu industriju u dentalnoj medicini Ministarstva zdravstva RH.

Oženjen je i otac dvoje djece.

Popis objavljenih radova

Autorske knjige

1. Keros, Predrag; Arbanas, Juraj; Starčević Klasan, Gordana; Vodanović, Marin; Grubić Kezele, Tanja; Bašić, Krešimir; Bergovec, Marina; Lončar Brzak, Božana; Ostroški Anić, Ana. Anatomski pojmovnik s hrvatsko-englesko-latinskim rječnikom. Zagreb: Naklada Slap, 2015 (pojmovnik)

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Savić Pavičin, Ivana; Ivošević-Magdalenić, Nataša; Badel, Tomislav; Bašić, Krešimir; Keros, Jadranka. Analysis of Dental Supportive Structures in Orthodontic Therapy. // Collegium antropologicum. 36 (2012), 3; 779-783 (članak, znanstveni).

2. Šutej, Ivana; Peroš, Kristina; Benutić, Anica; Capak, Krunoslav; Bašić, Krešimir; Rošin-Grget, Kata. Salivary calcium concentration and periodontal health of young adults in relation to tobacco smoking. // Oral Health & Preventive Dentistry. 10 (2012), 4; 397-403 (članak, znanstveni).

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Bašić, Krešimir; Peroš, Kristina; Šutej, Ivana; Rošin-Grget, Kata. The effect of salivary calcium and fluoride toothpaste on the formation of KOH-soluble fluoride: In vitro study. // Acta stomatologica Croatica. 49 (2015), 3; 221-227 (članak, znanstveni).

2. Rošin-Grget, Kata; Peroš, Kristina; Šutej, Ivana; Bašić, Krešimir. The cariostatic mechanisms of fluoride. // Acta Medica Academica. 42 (2013) , 2; 179-188 (pregledni rad, znanstveni).

3. Bašić, Krešimir; Vazdar, Melita; Vodanović, Marin; Brkić, Hrvoje. Internet i koliko se njime koriste studenti Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. // Acta stomatologica Croatica. 41 (2007), 2; 142-151 (članak, znanstveni).

Ostali radovi u drugim časopisima

1. Krešimir Bašić. Bogatstvo naroda: hrvatski jezik u medicinskome nazivlju. // Narodni zdravstveni list. 644-645 (2013); 31-31 (članak, ostalo).

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Ivana Šutej, Krešimir Bašić, Kristina Peroš, Kata Rošin-Grget. Evaluation of fluoride concentration in tapped, bottled and filtered water available in Croatia // Intrinsic Activity / Thomas Griesbacher (ur.). Graz: Austrian Pharmacological Society, 2015. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Krešimir Bašić, Ivana Šutej, Kristina peroš, Kata Rošin-Grget. Fluoride content of bottled waters commercially available in Zagreb, Croatia // Intrinsic Activity / Thomas Griesbacher

(ur.). Graz: Austrian Pharmacological Society, 2015. (poster,međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Bašić, Krešimir; Peroš, Kristina; Šutej, Ivana; Rošin-Grget, Kata. Influence of brewing temperature on fluoride release from tea // Acta Stomatologica Croatica 48(1) / Vodanović, Marin; Bašić, Krešimir (ur.). Zagreb: Hrvatsko stomatološko društvo, 2014. 69-70 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

4. Peroš, Kristina; Šutej, Ivana; Bašić, Krešimir; Rošin-Grget, Kata. Effect of fluorides, casein phosphopeptides and amorphous calcium phosphate on white spot lesion regression // Acta Stomatologica Croatica 48(1) / Vodanović, Marin; Bašić, Krešimir (ur.). Zagreb: Hrvatsko stomatološko društvo, 2014. 74 (poster,međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

5. Sutej, Ivana; Peros, Kristina; Basic, Kresimir; Rošin-Grget, Kata. Comparison of periodontal status and oral hygiene habits between students of dental medicine and pharmacy and biochemistry students // Acta Stomatologica Croatica 48(1) / Vodanović, Marin; Bašić, Krešimir (ur.). Zagreb: Hrvatsko stomatološko društvo, 2014. 77-77 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

6. Bašić, Krešimir; Šutej, Ivana; Peroš, Kristina; Rošin-Grget, Kata. Fluoride Content in beverages made for infants and young children in Croatia // Periodicum Biologorum / Branko Vitale (ur.). Zagreb: Croatian Society for Natural Sciences, 2013. 68-68 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

7. Šutej, Ivana; Peroš, Kristina; Bašić, Krešimir; Rošin-Grget, Kata. Cigarette smoking and Community Periodontal Index // Periodicum Biologorum / Branko Vitale (ur.). Zagreb: Hrvatsko prirodoslovno društvo, 2013. 91-91 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

8. Bašić, Krešimir; Šutej, Ivana; Peroš, Kristina; Rošin-Grget, Kata. Effect of cigarette smoking on calcium fluoride uptake by enamel: an in vitro study // Proceedings of the British Pharmacological Society. 2012. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

9. Bašić, Krešimir; Illeš, Davor; Valentić-Peruzović, Melita. Povezanost kvantitativnih i kvalitativnih obilježja žvačne i skeletne muskulature // Acta Stomatologica Croatica / Brkić, Hrvoje (ur.). Zagreb: University of Zagreb School of Dental Medicine, 2008. 395-395 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

1. Peroš, Kristina; Vuletić, Lea; Šutej, Ivana; Bašić, Krešimir; Vodanović, Marin. Researchers, physicians, patients – don't be Lost in Translation // Worldwide Research Efforts in the Fighting against Microbial Pathogens: From Basic Research to Technological Developments / A. Mendez-Vilas (ur.). Boca Raton, FL, USA: BrownWalker Press, 2013. 232-234 (poster, međunarodna recenzija, objavljeni rad, znanstveni)

Sažeci u zbornicima skupova

1. Bašić, Krešimir; Peroš, Kristina; Bošnjak, Zrinka; Šutej, Ivana. Association of smoking with subgingival microbial composition in young adults, preliminary cross-sectional study. 2016. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Peroš, Kristina; Šutej, Ivana; Bašić, Krešimir; Rošin-Grget, Kata. The toxicity of the fluorides in oral hygiene products // Book of Abstracts III International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2014. 2014. 282-282 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Šutej, Ivana; Peroš, Kristina; Bašić, Krešimir; Rogić, Dunja; Rošin-Grget, Kata. Salivary mineral characteristics, oral hygiene and periodontal health // 10th European Symposium on Saliva / Ligtenberg, T (ur.). Egmond aan Zee, 2014. 83-83 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

4. Peroš, Kristina; Vuletić, Lea; Šutej, Ivana; Bašić, Krešimir; Vodanović, Marin. Researchers, physicians, patients – don't be Lost in Translation // II International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2012. 2012. 139-139 (poster,međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

5. Bašić, Krešimir; Vazdar, Melita; Vodanovic, Marin; Brkić, Hrvoje. The use of the internet within a Dental School in Croatia // 33rd Annual Meeting of the Association for Dental Education in Europe: Book of abstracts. 2007. 46-46 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).