Učestalost karijesnih lezija i određivanje broja mikroorganizama Streptococcus mutans i Lactobacillus u slini ispitanika oboljelih od gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB-a)

Ilić, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:994707

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Tihana Ilić

UČESTALOST KARIJESNIH LEZIJA I ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA STREPTOCOCCUS MUTANS I LACTOBACILLUS U SLINI ISPITANIKA OBOLJELIH OD GASTROEZOFAGEALNE REFLUKSNE BOLESTI (GERB-a)

Diplomski rad

Akademska godina:

2017./2018.

Mentor:

Doc. dr. sc. Ivana Medvedec Mikić, dr. med. dent.

Split, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Tihana Ilić

UČESTALOST KARIJESNIH LEZIJA I ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA STREPTOCOCCUS MUTANS I LACTOBACILLUS U SLINI ISPITANIKA OBOLJELIH OD GASTROEZOFAGEALNE REFLUKSNE BOLESTI (GERB-a)

Diplomski rad

Akademska godina:

2017./2018.

Mentor:

Doc. dr. sc. Ivana Medvedec Mikić, dr. med. dent.

Split, srpanj 2018.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

1.1. Gastroezofagealna refluksna bolest 2

1.2. Lactobacillus spp. 5

1.3. Streptoccocus mutans 6

1.4. Dentalni biofilm 7

1.5. Uloga sline 10

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 11

2.1. Hipoteza 12

3. MATERIJALI I METODE 13

3.1. Ispitanici 14

3.2. Određivanje količine bakterija 14

3.3. Statistički postupci 16

4. REZULTATI 17

4.1. Spol 18

4.2. Dob 18

4.3. Broj ispitanika s karijesnim lezijama 19

4.4. Broj zabilježenih karijesnih lezija u ispitanika 20

4.5. Lokacija karijesnih lezija 22

4.6. Kvantum salivacije 23

4.7. Odnos kvantuma salivacije i učestalosti karijesnih lezija 24

4.8. Razlika u broju karijesnih lezija u ispitanika u odnosu na količinu *Lactobacillusa spp.* 25

4.9. Razlika u broju karijesnih lezija u ispitanika u odnosu na količinu *S.mutansa* 25

5. RASPRAVA 26

6. ZAKLJUČAK 30
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 32
8. SAŽETAK 39
9. SUMMARY 41
10. ŽIVOTOPIS 43

POPIS KRATICA

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

TLESR–tranzitorne relaksacije donjeg jednjačkog sfinktera (eng. *transiet lower esophagfeal sphincter relaxation*)

CHO – jednostavni ugljikohidrati

EHP – hipoplazija cakline (eng. *enamel hypoplasia*)

GI – gastrointestinalni trakt

Qs – kvantum salivacije (eng. *quantum of salivation*)

CRT – test rizika od karijesa (eng. *caries risk test*)

KBC – klinički bolnički centar

1. UVOD

1.1. Gastroezofagealna refluksna bolest

Gastroezofagealna refluksna bolest (GERB) definirana je kao patološko stanje uvjetovano refluksom gastrointestinalnog sadržaja u jednjak, usta i dišne putove s različitim spektrom simptoma i znakova bolesti (1). Prema Montrealskom konsenzusu (2) GERB označava stanje koje se razvije kada refluks želučane kiseline uzrokuje štetne simptome i/ili komplikacije. Prema Brazilskom konsenzusu to je kronični poremećaj povezan s retrogradnim tokom gastro-duodenalnog sadržaja u ezofagus i/ili povezane organe, koji rezultira širim spektrom simptoma s ili bez oštećenja tkiva. Ta definicija bolesti je prihvatljivija jer daje značaj kroničnom karakteru, pojašnjavajući da refluksni sadržaj može biti želučani, ali i duodenalni (3).

Prema Los Angeles klasifikaciji, objavljenoj 1999. godine, GERB dijelimo na 4 tipa (Tablica 1, Slika 1) (1, 4).

Tablica 1. Los Angeles klasifikacija GERB-a (1).

Tip A	Jedna (ili više) erozija ne dužih od 5mm koja ne doseže vrhove dva susjedna mukozna nabora
Tip B	Jedna (ili više) erozija dužih od 5mm koja ne doseže vrhove dva susjedna mukozna nabora
Tip C	Jedna (ili više) erozija koje su u kontinuitetu između vrhova susjednih mukoznih nabora ali obuhvaća manje od 75% cirkumferencije
Tip D	Jedna (ili više) erozija koja obuhvaća najmanje 75% cirkumferencije jednjaka

Prema sistemskom pregledu iz 2005. godine, prevalencija GERB-a (definiran kao žgaravica barem jednom tjedno i/ili regurgitacija želučanog sadržaja) je oko 10-20% u zapadnom svijetu, dok je prevalencija te bolesti u Aziji manja od 5%. Također, veća prevalencija primjećena je u Sjevernoj Americi u odnosu na Europu, te je veća prevalencija u Sjevernoj u odnosu na Južnu Europu (5). Iako svi članovi populacije dožive neku vrstu gastroezofagealnog refluksa, njegova učestala pojava spriječena je barijerom koja se nalazi između želuca i ezofagusa koju sačinjava donji ezofagealni sfinkter, ali i dijafragma, Hisov kut, freno-ezofagealni ligament i intraabdominalni dio jednjaka.

Slika 1. Stupnjevi refluksnog ezofagitisa po Los Angeles klasifikaciji
Preuzeto i obrađeno iz (1).

Tlak u želucu je 10mmHg, a tlak donjeg jednjačkog sfinktera je 10-30mmHg viši. Time se sprečava prolaz želučanog sadržaja prema jednjaku. Ezofagealna peristaltika također čini važnu komponentu u antirefluksnom mehanizmu. Oko 40-50% osoba koje boluju od GERB-a ima neki oblik abnormalne peristaltike (6). Defektna peristaltika je tako povezana s teškim oblikom GERB-a u oko 20% pacijenata, a odlikuje se jako niskom amplitudom peristaltičkih valova. Ovi pacijenti su skloni težim ozljedama sluznice, kao i učestalim ekstraezofagealnim simptomima (7). Donji ezofagealni sfinkter je segment koji čini glatki mišić dug 3-4cm koji se tonički kontrahira (8). On je barijera između ezofagusa i želuca koja djeluje na principu visokog tlaka. Kao što je već navedeno, u normalnoj populaciji može doći do povremenog popuštanja donjeg ezofagealnog sfinktera tj. tranzitorne relaksacije donjeg jednjačkog sfinktera (engl. *transiet lower esophagfealsphincter relaxation* - TLESR) i to se pripisuje fiziološkom refluksu. Ako je TLESR učestao i prolongiran, tada ga možemo pripisati refluksnoj bolesti i taj fenomem pronalazimo u

40% osoba koje boluju od GERB-a, a tlak donjeg ezofagealnog sfinktera u mirovanju im je u granicama normale (8, 9).

Bolest se može manifestirati različitim simptomima koje dijelimo u tipične, atipične i ekstraezofagealne simpotme (Tablica 2) (10).

Tablica 2. Podjela simptoma GERB-a (10).

Tipični simptomi	Regurgitacija kiseline, žgaravica
Atipični simptomi	Dispepsija, mučnina, nadutost, epigastrična bol
Ekstraezofagealni simptomi	Kronični kašalj, bronhospazam, astma, laringitis, dentalne erozije, promuklost, hipofunkcija žlijezda slinovnica, peckanje usne šupljine

Ne postoji opći konsenzus za dijagnozu GERB-a, pa se pojava žgaravice, čak i kada je jedini simptom uzima kao dovoljna za dijagnozu ove bolesti. Žgaravicu definiramo kao osjećaj pečenja ili žarenja u području želuca ili donjeg dijela prsne kosti, koji se širi iza prsne kosti sve do vrata (1). Simptomi uobičajeno imaju tendenciju pojave nakon jela, pojačavaju se u ležećem položaju, a smanjuju korištenjem lijekova za smanjene kiseline (11). Među ekstraezofagealne simptome spadaju i dentalne erozije. Dentalne erozije najčešće zamjećujemo na palatinalnim površinama zubi, s prevalencijom od oko 42% (12). Količina sline i funkcija gutanja u GERB-u su znatno smanjene u odnosu na zdravu populaciju (13). Oralne manifestacije bolesti osim dentalnih erozija, obuhvaćaju i peckanje sluznice, zubnu preosjetljivost, kiselkasti okus u ustima i snižavanje vertikalne dimenzije u okluziji (14). Järvinen i sur. su zamijetili simptome peckanja usta, aftoidne lezije i promuklost u pacijenata s poremećajima gornjeg probavnog sustava. Također su povezali simptome poput eritema mekog nepca i uvule, glositisa, atrofije epitela usne šupljine i kserostomije u pacijenata koji boluju od GERB-a (15). U histološkom istraživanju provedenom na štakorima zamijećeno je da želučani refluks može uzrokovati lezije na palatinalnoj sluznici, što se dovodi u vezu s opstrukcijom zračnih puteva u ljudi (16). Takve oralne manifestacije nisu patognomonične i specifične samo za GERB, već su vidljive i u drugim poremećajima, što potvrđuju i istraživanja u kojima se nije pokazala uzročno-posljedična veza

između promjena na različitim sluznicama i GERB-a (17, 18). U terapiji refluksne bolesti pojedinim pacijentima savjetuje se promjena životnih i prehrambenih navika, što uključuje smanjenje tjelesne težine, spavanje s uzdignutim uzglavljem, prestanak konzumiranja alkohola, cigareta i slično. Za liječenje GERB-a najvažnijom se smatra adekvatna primjena lijekova. Postoji više vrsta medikamenata koji se koriste u liječenju i smanjenju simptoma GERB-a. Antagonisti H_2 histaminskih receptora blokiraju proizvodnju želučane kiseline koju uzrokuje histamin. Tu spadaju cimetidin, ranitidin i famotidin. Antacidi djeluju tako da povisuju pH želuca na vrijednosti 3 ili 4, te time smanjuju erozivni učinak kiseline prema sluznici uz inhibiciju aktivnosti pepsina (19). Cisaprid spada u skupinu prokinetičkih agenasa. Ta skupina lijekova poboljšava simptome GERB-a, kao i ezofagealni motilitet i pražnjenje želuca (20). Inhibitori protonske pumpe blokiraju enzime H^+/K^+-ATP-aze preko kovalentnog vezanja za cisteinske ostatke protonske pumpe i tako inhibiraju lučenje želučane kiseline (21). Antacidi imaju najmanji terapijski učinak, potom ih slijede blokatori H_2 histaminskih receptora i cisaprid koji imaju srednje jaki učinak, a najbolji terapijski učinak nude inhibitori protonske pumpe (1).

1.2. Lactobacillus spp.

Lactobacilli su Gram-pozitivni, fakultativni anaerobi. Oportunističke su i aciduričnе bakterije. Pronalazimo ih u hrani, vodi, tlu, ljudima i životinjama kao dio normalne flore. U usnoj šupljini čine do 1% od ukupne flore, a točan način širenja nije još u potpunosti poznat. Fermentiraju glukozu, te stoga spadaju u skupinu acidogenih bakterija. Njihovi sojevi su homofermentativni ili heterofermentativni. Homofermentativni sojevi fermentacijom glukoze najčešće stvaraju mliječnu kiselinu, poput *Lactobacillus casei*. Heterofermentativni sojevi (poput *Lactobacillus fermentum)* obuhvaćaju one sojeve koji fermentacijom, osim mliječne kiseline, tvore i acetat, etanol i ugljikov dioksid (22). Ovi sojevi se već dugo povezuju s dentalnim karijesom. Da bi mogli kolonizirati usnu šupljinu potrebno je zadovoljiti određene uvjete:

1. Stagnirajuće, mirno, anaerobno okruženje
2. Niski pH
3. Dostatan izvor ugljikohidrata

Te uvjete zadovoljavaju tri mjesta u ljudskom tijelu: karijesne lezije, želudac i vagina (23).

Laktobacili se u usnoj šupljini pojavljuju i prije nicanja zubi, pa je tako u novorođenčadi rođene vaginalnim putem zabilježeno postojanje laktobacila, no oni se u usnoj šupljini novorođenčadi ne zadržavaju duže od mjesec dana (24). Od preko poznatih 150 sojeva *Lactobacillusa*, samo mali broj naseljava usnu šuljinu ljudi. Dominantni sojevi *Lactobacillusa* pronađeni u karijesnim lezijama su *L. fermentum, L. rhamnosus, L. gasseri, L. casei/parcasei, L. salivarius, L. plantarum, L. oris* te *L. vaginalis*. Mnoga istraživanja ukazuju na postojanje korelacije između prisutnosti laktobacila u usnoj šupljini i karijesa u većine ispitanika, dok kod ispitanika koji nemaju karijes, laktobacile u plaku ili fisurama nalazimo rijetko (25-28). Visoku koncentraciju laktobacila povezujemo s hiposalivacijom ili kserostomijom. Bardow i sur. (29) su pronašli vezu između demineralizacije zuba i osjećaja suhoće usta, količine sline, sastava sline i koncentracije *Lactobacillusa* u slini ispitanika u dobi od 44 do 84 godine. Uočena je 20 puta veća količina laktobacila u mililitru sline u ispitanika koji su imali nizak kvantum salivacije (manje od 0.1ml/min) u odnosu na ispitanike s normalnim kvantumom salivacije koji iznosi oko 0.3 – 0.4ml/min (29).

1.3. Streptoccocus mutans

Streptoccocus mutans je skupina bakterija koju sačinjava sedam vrsta i osam serotipova (a-h) na temelju antigenske specifičnosti ugljikohidrata stanične stijenke. Spada u skupinu Gram pozitivnih bakterija. Izolirao ju je Clarke 1924. iz ljudskih karijesnih lezija. Taksonomsku odrednicu *mutans* bakterija je dobila zbog sposobnosti prelaženja iz kokoidnog u kokobacilarni vegetativni oblik. Clarke je povezao S.*mutans* s karijesom, no drugi istraživači nisu uspjeli izolirati *S.mutans* iz karijesnih lezija, te je do 1960. ta bakterija bila zaboravljena (30-32). Tada je ponovno identificirana u karijesnim lezijama glodavaca (33). Pod imenom *Streptococcus mutans* podrazumijevamo izolate iz čovjeka kojima pripadaju serotipovi c, e i f. Ovi serotipovi mogu biti i uzročnici infektivnog endokarditisa, što je zabilježeno u oko 60% pacijenata (22). *Streptococcus mutans* primarno naseljava usnu šupljinu, ždrijelo i crijeva. Ovisan je o biofilmu. Glavni čimbenici virulencije *S. mutansa* su (34-36):

1. Sposobnost proizvodnje velikih količina kiselog sadržaja tokom metaboliziranja ugljikohidrata (acidogenost)
2. Mogućnost preživljavanja u uvjetima niskog pH (aciduričnost)

3. Mogućnost sinteze ekstracelularnih glukan-homopolimera iz sukroze, koji mu pomažu pri primarnoj adheziji i kolonizaciji na zubnu površinu u sklopu biofilma

Pojava *S. mutansa* u usnoj šupljini je praćena pojavom karijesa nakon 6 do 24 mjeseca (37). Postoje istraživanja koja sugeriraju da *S.mutans* ima veću sposobnost formiranja biofilma u odnosu na druge pripadnike soja *Streptococcus* u ljudi (38).

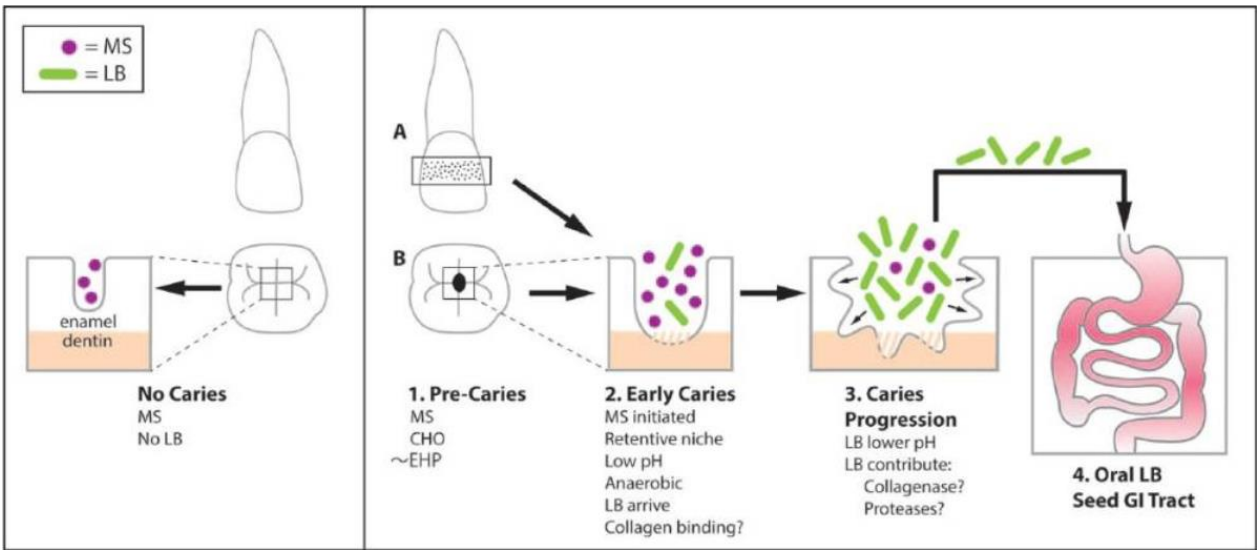
1.4. Dentalni biofilm

Mikrobne biofilmove pronalazimo na mukoznim površinama koje oblažu crijeva, vaginu, usnu i nosnu šupljinu. Već je otprije poznato da međudjelovanje različitih bakterija koje sačinjavaju biofilm, bilo ono sinergističko ili antagonističko, može dovesti do nastanka bolesti. To je posebice značajno u usnoj šupljini, gdje *S.mutans*, uz druge acidogene bakterije poput *Lactobacillusa*, ima tendenciju ka dominaciji u flori karijesnih lezija (39). Prema ekološkoj plak hipotezi karijesa, dentalni karijes je biološka pojava koja se prirodno javlja kao rezultat ekološkog poremećaja u zajednici biofilma, poput niskog pH. Nastanak biofilma ima nekoliko faza, koje se mogu odvijati istovremeno (40):

1. Stvaranje pelikule
2. Pričvršćivanje pojedinih bakterijskih stanica (0-24h)
3. Rast pričvršćenih bakterija dovodi do stvaranja odvojenih mikroorganizama (4-24h)
4. Mikrobni slijed i koadhezija dovode do raznolikosti vrsta istovremeno s daljnim rastom mikrokolonija (1-7 dana)
5. Zreli biofilm (1 tjedan ili stariji)

Glavne komponente biofilma koji se formira na površini zubi su: glukan (10-20%), fruktan (1-2%) i proteini (40%). Količina lipida, kalcija, magnezija, fluora i fosfora varira od pojedinca do pojedinca zavisno o sastavu sline (31). Proces formacije biofilma počinje stvaranjem pelikule na zubnoj površini. Pelikula se sastoji od komponenti iz sline, poput amilaze, mucina, histatina, glikoproteina. Nastaje na goloj površini zuba unutar jedne minute do jednog sata. Pelikula nije nužno negativna pojava. Zbog selektivne propusnosti, pelikula ograničava transport iona unutar i van tvrdih zubnih struktura. Bakterije adheriraju na površinu pelikule stvaranjem slabe fizikalno-kemijske sile između pelikule i površine bakterijske stanice (40). Jedni od ranih kolonizatora zubnoga plaka su *Streptococcus gordonii* i *Streptococcus sanguini*s, te su uobičajeno povezani sa zdravljem zuba radi antagonizirajućeg djelovanja prema *S. mutansu* (41). *S. mutans* pak, ima

sposobnost proizvodnje bakteriocina, preciznije mutacina, koji djeluju inhibitorno protiv gore navedenih bakterija (42). S obzirom da *S.mutans* posjeduje sposobnost pričvršćivanja na zubnu pelikulu pomoću adhezinu sličnih proteina, koji se vežu na receptore u pelikuli, on može biti prisutan i u inicijalnoj kolonizaciji zubnog biofilma (43). Također *S. mutans* proizvodi ekstracelularne polisaharide, većinom u formi glukana, koji potiču akumulaciju bakterijskih stanica jer stvaraju matriks koji ograničava difuziju tvari. Na taj način bakterije ostaju zaštićene. *S.mutans* uz to fermentira šećere unutar matriksa bogatog ekstracelularnim polisaharidima i na taj način stvara kiselo okruženje (44). Kao što je već spomenuto, unutar biofilma zbivaju se složeni odnosi između bakterijskih vrsta, a to uključuje i interakcije između *S. mutansa* i drugih bakterijskih vrsta. U slučaju niskog pH u okruženju, dodatno se pojačava proizvodnja ekstrcelularnih polisaharida (45), te u takvim uvjetima taj *Streptococcus mutans* prosperira. Povećanjem nepogodnih uvjeta, mikrobna raznolikost je dramatično smanjena u korist visoko aciduričnih i acidogenih bakterija (46). Trenutna paradigma je da je dentalni karijes uzrokovan acidogenim bakterijama koje proizvode mliječnu kiselinu kao produkt anaerobne fermentacije ugljikohidrata. Osim svojstva acidogenosti, te bakterije posjeduju i aciduričnа svojstva koja im omogućavaju preživljavanje u okruženju s niskom pH vrijednosti (19). Prije otkrića *S. mutansa*, *Lactobacilli* su bili smatrani glavnim etiološkim čimbenikom u nastanku karijesa zbog visoke korelacije između *Lactobacilla* u slini i KEP indeksa. Danas pak, laktobacile smatramo sekundarnim kolonizatorima, a *S. mutans* primarnim inicijatorom karijesa. Van Houte i sur. su prepoznali slab afinitet laktobacila na zubnu površinu, a njihova zapažanja upućuju na to da *S. mutans* i druge acidogene bakterije stvaraju potrebne uvjete tj. dovode do nastanka prekarijesne lezije na koju se laktobacilli tada vežu mehanički (47). Ta prekarijesna lezija također je i mjesto stagnacije, podržava niski pH i anaerobne uvjete. Ona omogućava mehaničku retenciju hrane, kao izvora ugljikohidrata, što znači da su zadovoljeni uvjeti za razvoj kolonija laktobacila (Slika 2) (23).



Slika 2. Model lijevo prikazuje stanje bez karijesa gdje se vidi izostanak *Lactobacilla*, desni model prikazuje 1. prekarijesnu leziju s prisustvom *S. mutansa*, jednostavnih ugljikohidrata (CHO), a neki zubi mogu već otprije imati retentivna područja u obliku hipoplazije cakline (EHP); 2. rana karijesna lezija gdje zamjećujemo akumulaciju *Lactobacilla*; 3. progresija karijesa zbog djlovanja bakterija i okruženja; 4. *Lactobacilli* iz karijesne lezije dospijevaju u slinu, bivaju progutani i dolaze u GI trakt.

Preuzeto i obrađeno iz (23).

Zubne fisure smatramo najrizičnijim mjestom za nastanak karijesa u denticiji i tu je pronađena najveća povezanost između razine plaka, *S. mutansa* i karijesa. To su potvrdili Loesche i sur. 1975. godine kada su u klasičnoj unakrsnoj studiji zabilježili da 71% karijesnih fisura ima broj živih *S. mutansa* >10% od ukupne mikroflore plaka koja se može kultivirati, a u 70% fisura bez karijesne lezije nisu detektirani *S. mutans* (48). Dugo su postojale dvije glavne hipoteze o ulogama bakterija unutar biofilma u etiologiji karijesa. Specifična plak hipoteza smatrala je da samo jedan ili vrlo mali broj bakterijskih vrsta može biti uključen u nastanak bolesti. Nespecifična plak hipoteza pojašnjava da je bolest posljedica ukupne aktivnosti cjelokupne mikroflore plaka, a ne samo acidogeničnih i aciduričnih bakterija. Najnoviju hipotezu nazivamo ekološka plak hipoteza i ona inkorporira elemente iz obje prijašnje hipoteze (49). Prema ekološkoj plak hipotezi organizmi koji su povezani s nastankom bolesti mogu biti prisutni i na zdravim mjestima, ali u nedovoljnoj količini da bi bili patogeni. Stoga, bolest je posljedica

pomaka ravnoteže tj. narušavanja mikrobne homeostaze. Mikrobna homeostaza označava bakterijski sastav koji, u zdravih pojedinaca, ostaje relativno stabilan kroz vrijeme (49).
Prema Loescheu (50), da bi bakterije svrstali u skupinu kariogenih, one moraju zadovoljiti određene uvjete, odnosno imati određena svojstva. Loesche tu spominje sposobnost brzog prijenosa razgradivih šećera u odnosu na druge bakterije plaka i pretvorbu tih šećera u kiseline, sposobnost održavanja razgradnje šećera pod ekstremnim uvjetima okoline, poput niskog pH, te stvaranje ekstracelularnih i intracelularnih polisaharida koji doprinose strukturi biofilma. Kao što je već i prije navedeno, *Lactobacillus* i *S. mutans* su acidogene i aciduričnе bakterije i zato zadovoljavaju Loescheov uvjet o preživljavanju u ekstremnim uvjetima.

1.5. Uloga sline

Mnoga istraživanja su pokazala da pojedinci s aktivnim karijesnim lezijama sadrže veću količinu *S. mutansa* i *Lactobacilla* u slini, u odnosu na one koji nemaju aktivnih lezija (51, 52). Već je spomenuto da pacijenti koji pate od hipofunkcije žlijezda slinovnica često imaju povećanu karijesnu aktivnost i progresiju u usporedbi s osobama koje imaju normalnu funkciju slinovnica (53). U pacijenata u kojih je zabilježena hiposalivacija, karijes najčešćće pronalazimo na mjestima gdje je uobičajena retencija zubnog plaka, poput gingivnog ruba, uz stare ispune i sl. Bardow i sur. su 2003. godine došli do zaključka da je nestimulirani protok sline dijagnostički važniji od stimuliranog protoka (54). Ispitanici kojima je protok nestimulirane sline ispod 0,2ml/min imaju povišenu demineralizaciju i viši rizik od nastanka karijesnih lezija. Niski protok nestimulirane sline pospješuje kiselost, pa time i razvoj acidogenih i aciduričnih bakterijskih sojeva. Na taj način dolazi do promjene ekologije usne šupljine (55).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovoga istraživanja bili su:

- usporediti koncentraciju bakterija *S. mutans* i *Lactobacillus* u uzorcima sline ispitanika koji boluju od GERB-a u odnosu na kontrolnu skupinu, te dobivene rezultate povezati s brojem i mjestom karijesnih lezija zabilježenih pregledom usne šupljine ispitanika.
- povezati količinu nestimulirane sline s brojem navedenih bakterija i brojem aktivnih karijesnih lezija.

Svrha istraživanja bila jedati bolji uvid u specifičnu mikrobiološku floru ispitanika koji boluju od GERB-a s obzirom na manjak sličnih istraživanja.

2.1. Hipoteza

Hipoteza ovog istraživanja je bila da će kod ispitanika s dijagnosticiranim GERB-om biti više karijesnih lezija u usnoj šupljini te da će biti znatno veći broj mikroorganizama *S.mutans* i *Lactobacillus spp*. u nestimuliranoj slini.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Split i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Svi ispitanici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u ovom istraživanju. Sudjelovalo je 36 ispitanika, 18 u ispitnoj i jednako toliko u kontrolnoj skupini. Ispitna skupina sastojala se od ispitanika sa dijagnosticiranim GERB-om od strane specijalista interne medicine, subspecijalista gastroenterologa. Kontrolna skupina sastojala se od nasumično odabranih pacijenata koji su došli u ambulantu oralne kirurgije na odjelu za Maksilofacijalnu kirurgiju KBC-a Split, te u stomatološku ordinaciju Doma zdravlja Split. Iz ispitne skupine isključeni su pacijenti koji su već na medikamentoznoj terapiji. Svakom ispitaniku je napravljen detaljan stomatološki pregled i zabilježene su karijesne lezije na tvrdim zubnim tkivima. Zatim je određen kvantum nestimulirane salivacije, te je od nje uzet uzorak za nasađivanje na hranjive podloge kako bi se utvrdio broj *S.mutans* i *Lactobacillusa.*

3.2. Određivanje količine bakterija

Uzorci nestimulirane sline prikupljani su u staklenim graduiranim epruvetama kroz staklene lijevke u razdoblju od 5 minuta. Uzorci sline su naseljeni na dvije razlličite hranjive podloge, jednu za *S.mutans*, a drugu za *Lactobacillus spp*. Korišten je CRT bakterijski test (Ivoclar Vivadent, Linchenstein). Taj test omogućava simultano dokazivanje broja kolonija *S.mutans* i *Lactobacillus spp*. Plavi mitis-salivarius-bacitracin agar je korišten za detekciji *S. mutans*a, dok je Rogosa agar korišten za detekciju *Lactobacillusa*. Hranjive podloge su prije uporabe bile prekrivene zaštitnom folijom u svrhu sprječavanja kontaminacije i isušivanja. Podloge s uzorcima sline su stavljene u inkubator prilagođen na temperaturu 37°C na 48 sati u okolišu ispunjenom CO_2. To je postignuto dodavanjem tablete $NaHCO_3$ u zatvorenu epruvetu. Te tablete oslobađaju CO_2 u kontaktu s vlagom, a to stvara potrebne uvjete za razvoj ovih bakterija. Nakon inkubacije od 48 sati *S.mutans* se očitavao u obliku malenih plavkastih kolonija, promjera manjeg od 1 mm, *Lactobacillus spp.* kolonije su bile bijele boje (Slika 3).

Slika 3. Evaluacijske slike za očitavanje CRT podloga

Preuzeto i obrađeno s: https://www.researchgate.net/figure/CRTR-bacteria-CRTR-Intro-Pack-Caries-Risk-Test-Ivoclar-Vivadent-Schaan_fig1_235405321

Usporedbom s evaluacijskim slikama priloženim unutar CRT kutije odredio se broj novostvorenih kolonija *S.mutansa* i *Lactobacillusa*. Ispitanicima je napravljen stomatološki pregled radi utvrđivanja postojanja aktivnih karijesnih lezija. Kao pomoćna sredstva za intraoralni pregled korišteni su stomatološko ogledalo, sonda i svjetlo stomatološke jedinice. Položaj karijesnih lezija na zubima je također zabilježen. Pregled i uzimanje uzoraka sline od ispitanika u kontrolnoj skupini su obavljeni na isti način kao i kod ispitanika u ispitnoj skupini.

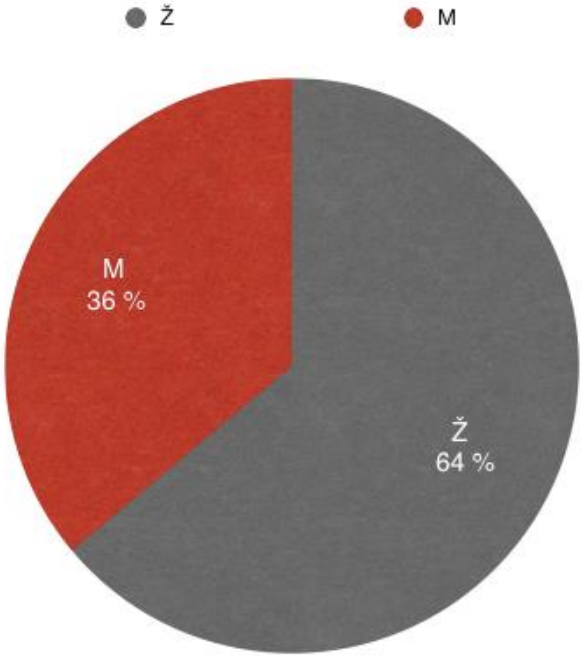
3.3. Statistički postupci

U radu su korišteni metoda deskriptivne statistike, T-test te u slučaju nezadovoljenja uvjeta za provedbu T-testa provodio se Mann-Whitney U test, χ^2 test, te alternativni Fisher egzaktni test. Normalnost distribucije je testirana Kolmogorov-Smirnov testom. Homogenost promatranih ispitanika prema spolu testirana je je χ^2 testom. Prosječna starnosna dob ispitanika određena je pomoću T-testa. Fisher egzaktni test korišten je u određivanju statistički značajne zavisnosti broja ispitanika s karijesnim lezijama u dvije ispitivane skupine. Razlika u brojnosti karijesa, odnos između kvantuma salivacije i karijesa, te odnos između *Lactobacillusa spp*., *S.mutansa* i karijesih lezija testirani su Mann-Whitney U testom. Analiza je rađena u statističkom programu STATISTICA 12 (Dell Software, Kalifornija, SAD). Zaključci su doneseni pri razini značajnosti od 5%.

4. REZULTATI

4.1. Spol

U istraživanju je sudjelovalo 36 ispitanika, od toga 23 žene i 13 muškaraca (Slika 4).



Slika 4. Spolna struktura ispitanika

4.2. Dob

U Tablici 3. prikazana je srednja vrijednost dobi u ispitanika ispitne i kontrolne skupine.

Tablica 3. Dobna struktura ispitanika

	Ispitna skupina	**Kontrolna skupina**	**P***
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	
Starost	57,78	56,17	0,764

$\bar{X}$ – srednja vrijednost, P* – empirijska p vrijednost T- testa

4.3. Broj ispitanika s karijesnim lezijama

U Tablici 4. prikazan je broj ispitanika s i bez zabilježenih karijesnih lezija te odgovarajući postotak unutar skupina. Iz tablice je vidljivo da je u 6 (33,33%) ispitanika ispitne skupine zabilježeno postojanje aktivnih karijesnih lezija, dok su kod kontrolne skupine karijesne lezije zastupljene kod 15 ispitanika (83,33%). Razlika je statistički značajna (p=0.003)

Tablica 4. Broj i postotak ispitanika s karijesnim lezijama u ispitnoj i kontrolnoj skupini

	Bez karijesnih lezija		**Karijesne lezije**		**Ukupno**
	N		**N**		**N**
Ispitna skupina	12	(66,67%)	6	(33,33%)	18
Kontrolna skupina	3	(16,67%)	15	(83,33%)	18
Ukupno	15		21		36

N- broj ispitanika s karijesnim lezijama, %- postotak ispitanika s karijesnim lezijama. Vrijednosti su izražene kao cijeli broj i postotak.

4.4. Broj zabilježenih karijesnih lezija u ispitanika

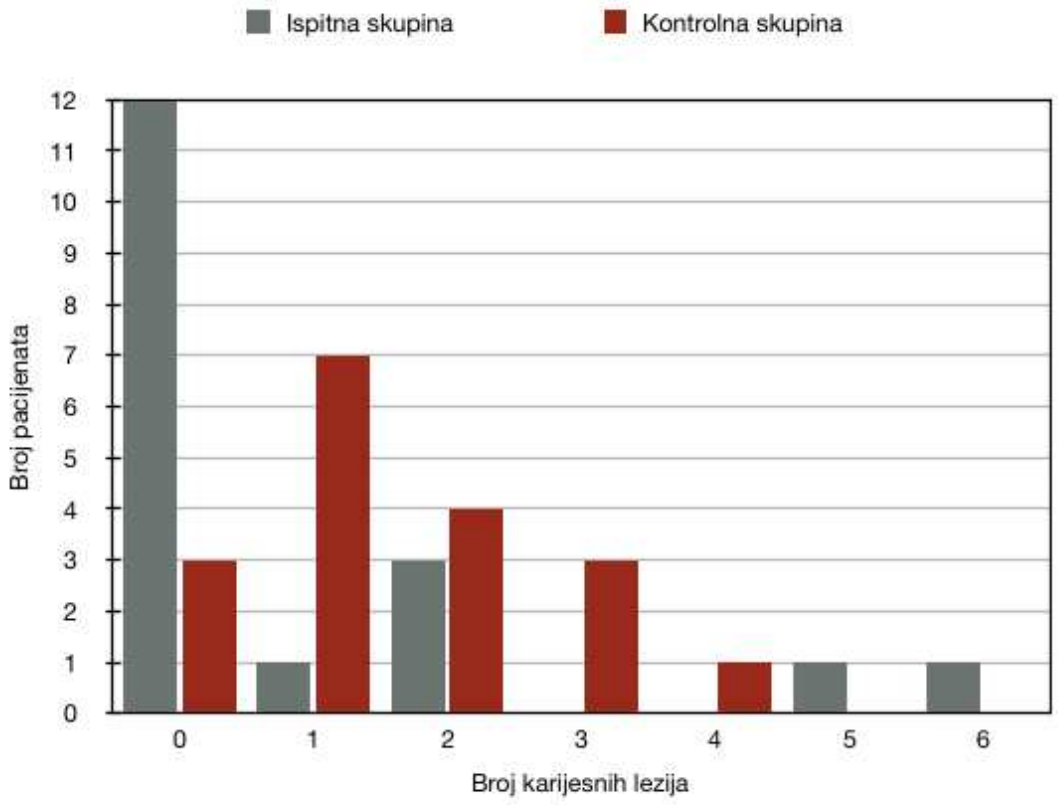
Tablica 5. prikazuje strukturu ispitanika prema broju karijesnih lezija. Najveći broj ispitanika u ispitnoj skupini nema karijesne lezije (66,67%), dok u kontrolnoj skupini najveći broj ispitanika ima karijes na jednom zubu (38,39%).

Tablica 5. Broj zabilježenih karijesnih lezija u ispitanika ispitne i kontrolne skupine

	Ispitna skupina		**Kontrolna skupina**	
Broj karijesa	**N**		**N**	
0	12	(66,67%)	3	(16,67%)
1	1	(5,56%)	7	(38,89%)
2	3	(16,67%)	4	(22,22%)
3	0	(0,00%)	3	(16,67%)
4	0	(0,00%)	1	(5,56%)
5	1	(5,56%	0	(0,00%)
6	1	(5,56%)	0	(0,00%)
Ukupno	18	(100,00%)	18	(100,00%)

N- broj ispitanika; % - postotak ispitanika. Vrijednosti su izražene kao cijeli broj i postotak.

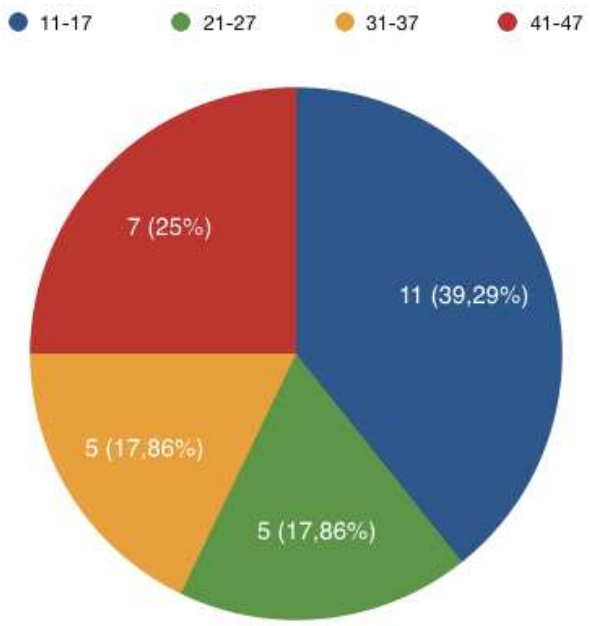
Razlika između kontrolne i ispitne skupine prikazana je grafički (Slika 5.)



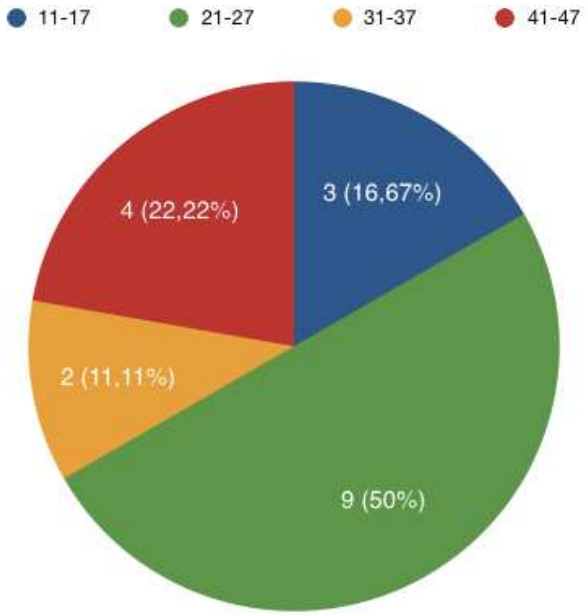
Slika 5. Broj karijesnih lezija u ispitanika ispitne i kontrolne skupine.

4.5. Lokacija karijesnih lezija

Slika 6. prikazuje lokaciju karijesnih lezija u zubnom nizu u kontrolnoj skupini , a Slika 7. lokaciju karijesnih lezija u ispitnoj skupini**.**



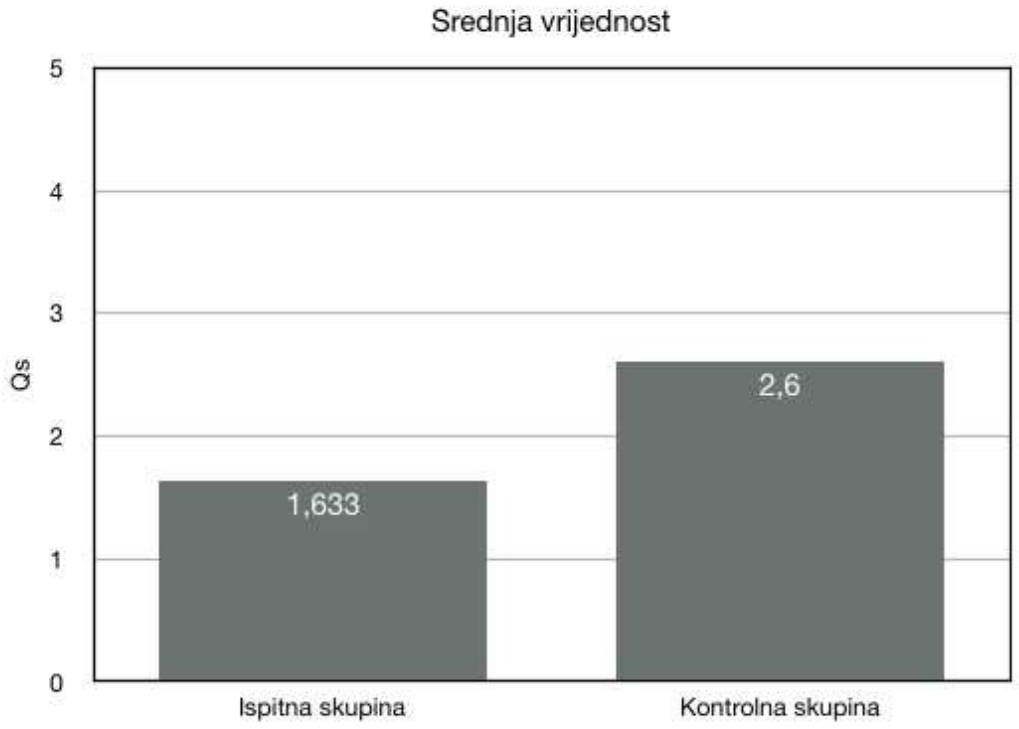
Slika 6. Lokacija i broj karijesnih lezija po kvadrantu u ispitanika iz kontrolne skupine



Slika 7. Lokacija i broj karijesnih lezija po kvadrantu u ispitanika iz ispitne skupine

4.6. Kvantum salivacije

Razlika među vrijednostima Qs u promatranim skupinama prikazana je grafički (Slika 8.) Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je Qs veće vrijednosti među ispitanicima kontrolne skupine (srednja vrijednost 2,6), dok je u ispitnoj skupini srednja vrijednost jednaka 1,6. Empirijska p vrijednost testa upućuje na zaključak da postoji statistički značajna razlika u Qs vrijednosti među promatranim skupinama.



Slika 8. Srednje vrijednosti kvantuma salivacije (Qs) u ispitnoj i kontrolnoj skupini

4.7. Odnos kvantuma salivacije i učestalosti karijesnih lezija

U Tablici 6. prikazan je odnos kvantuma salivacije i zabilježenih karijesnih lezija, a p vrijednost 0,925 odnosno 0,55 Mann-Whitney U testa upućuje na zaključak kako nema statistički značajne razlike u Qs u ispitanika koji imaju i koji nemaju karijesne lezije.

Tablica 6. Odnos kvantuma salivacije u razdoblju od 5 minuta i prisutnosti karijesa među ispitanicima

	Bez karijesnih lezija			**S karijesnim lezijama**			**Ukupno**
	$\bar{X}$ Qs¹	**N**		**$\bar{X}$ Qs²**	**N**		
Ispitna skupina	1,64	12	(66,67%)	1,61	6	(33,33%)	18
Kontrolna skupina	2,1	3	(16,67%)	2,7	15	(83,83%)	18
Ukupno		15			21		36

$\bar{X}$ Qs¹– srednja vrijednost kvantuma salivacije u ispitanika bez karijesnih lezija, $\bar{X}$ Qs²– srednja vrijednost kvantuma salivacije u ispitanika s karijesnim lezijama, N- broj ispitanika s karijesnim lezijama, %- postotak ispitanika s karijesnim lezijama. Vrijednosti su izražene kao cijeli broj i postotak

4.8. Razlika u broju karijesnih lezija u ispitanika u odnosu na količinu *Lactobacillusa spp.*

Zabilježena je statistički značajna razlika u kontrolnoj skupini (p=0,032), u broju karijesnih lezija u odnosu na količinu bakterija *Lactobacillus spp*, no ne i u ispitnoj, što nam je prikazano u Tablici 7.

Tablica 7. Odnos broja karijesnih lezija i koncentracije *Lactobacillus spp.*

	Bakterije	
	>10^5*Lactobacillus spp*	**<10^5*Lactobacillus spp***
Broj karijesa u ispitnoj skupini	11	7
Broj karijesa u kontrolnoj skupini	20	8

4.9. Razlika u broju karijesnih lezija u ispitanika u odnosu na količinu *S.mutansa*

Zabilježena je statistički značajna razlika u kontrolnoj skupini (p=0,038) u broju karijesnih lezija u odnosu na količinu bakterija *S. mutans,* no ne i u ispitnoj, što nam je prikazano u Tablici 8.

Tablica 8. Odnos broja karijesnih lezija i koncentracije *S. mutans*

	Bakterije	
	>10^5*S.mutans*	**<10^5*S.mutans***
Broj karijesa u ispitnoj skupini	11	7
Broj karijesa u kontrolnoj skupini	16	12

5. RASPRAVA

Unatoč učestalosti GERB-a, postoji malo istraživanja koje se bave pojavnošću karijesnih lezija i količinom bakterijskih vrsta *S. mutans* i *Lactobacillus spp.* u ispitanika s GERB-om. Većina istraživanja se bavi proučavanjem prevalencije dentalnih erozija u takvih ispitanika. U ovom istraživanju većina ispitanika oboljelih od GERB-a su bile žene (66,67%), što odgovara objavljenim istraživanjima koja navode da je upravo u žena zabilježena veća incidencija ove bolesti (56, 57). Prosječna dob u ispitnoj skupini bila je 57,78 godina, a u kontrolnoj skupini 56,17 godina, dakle postignuta je homogenost prema dobnoj strukturi. Istraživanje Chait-a navodi GERB kao najčešći poremećaj gornjeg dijela gastrointestinalnog trakta u starijoj populaciji, osvrćući se na rad Collena i sur. koji zamjećuju povećanu učestalost ezofagitisa u ispitanika starijih od 60 godina (58, 59).

Prema ovome istraživanju, zabilježen je manji broj karijesnih lezija u ispitanika s GERB-om u odnosu na kontrolnu skupinu (p vrijednost 0,003), odnosno karijesne lezije su zabilježene u 6 ispitanika iz ispitne skupine (33,33%) i u 15 ispitanika iz kontrolne skupine (83,33%). Takvi rezultati su u skladu s rezultatima koje su dobili Correa i sur. (60, 61) i Cazzonato i sur. (62). U istraživanju Linetta i sur. (63) uočena je veća učestalost karijesa u ispitnoj u odnosu na kontrolnu skupinu (62% u odnosu na 56%), no razlika nije bila statistički značajna. Ersin i sur. (64) su proučavali incidenciju karijesa u djece, a prema njihovim rezultatima iz 2006. godine, nisu uočili znatne razlike između skupine ispitanika koji boluju od GERB-a i zdravih ispitanika. Silva i sur. (65) također nisu zabilježili korelaciju između GERB-a i učestalosti karijesnih lezija.

U našem istraživanju najveći broj ispitanika u ispitnoj skupini nije imao karijesne lezije (66,67%), dok u kontrolnoj skupini najveći broj ispitanika imao karijes na jednom zubu (38,39%). Takvi rezultati su u skladu s istraživanjem Correa i sur. koji su zabilježili manje karijesnih zubi u ispitanika s GERB-om u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$) (66). Nažalost, nema dovoljno podataka iz drugih istraživanja za daljnju usporedbu, te bi se trebalo više posvetiti proučavanju ne samo incidencije, već i progresije i broja karijesnih lezija u usnoj šupljini u ispitanika koji boluju od GERB-a.

Lokacija karijesa u gornjem desnom zubnom nizu je zabilježena u 39,29% ispitanika kontrolne skupine, a u ispitnoj skupini najčešća lokacija je u gornjem lijevom zubnom nizu (50% ispitanika). Demirci i sur. su 2010. godine zamijetili veću incidenciju karijesa na gornjim zubima, u odnosu na donje (67). Isti autori navode ranije nicanje gornjih zubi kao potencijalni razlog. Također, ovo se djelomično može objasniti i pojačanom salivacijom submandibularne žlijezde u

odnosu na ostale, zbog čega su donji zubi više zaštićeni u odnosu na gornje zube (68). Većina drugih istraživanja ne pronalazi trend pojave karijesa na gornjim u odnosu na donje zube (69).

Prema rezultatima ovoga istraživanja, postoji statistički značajna razlika u kvantumu salivacije unutar 5 minuta između promatranih skupina, odnosno veće vrijednosti su zabilježene u kontrolnoj skupini u odnosu na ispitnu skupinu (p=0,018). To odgovara pretpostavci da je jedna od oralnih manifestacija GERB-a upravo hiposalivacija (10). Stoga prema mnogim istraživanjima, kvantum salivacije ispitanika koji boluju od GERB-a je smanjen u odnosu na zdrave pojedince (70-72), što se slaže s rezultatima ovog istraživanja. Ti rezultati nisu u skladu s rezultatima Correa i sur. (60).

Nije zabilježena korelacija između kvantuma salivacije i učestalosti karijesnih lezija ni u jednoj skupini. Prema mnogim istraživanjima postoji korelacija između niskog kvantuma salivacije i učestalosti karijesnih lezija, te se smanjena salivacija navodi kao čimbenik rizika za nastanak karijesa (73). Međutim, u pretraženoj literaturi nisu pronađena istraživanja koja se bave korelacijom kvantuma salivacije i karijesnih lezija u ispitanika koji boluju od GERB-a.

Nisu zabilježena odstupanja u količini bakterija *S.mutans* i *Lactobacillus spp.* u uzorcima sline ispitne i kontrolne skupine. Slične rezultate dobili su i Wild i sur. u istraživanju objavljenom 2011. godine (74) i Hölttä i sur. u istraživanju iz 1997. godine (75). Ersin je pak zabilježio veće koncentracije *S. mutansa* u djece koja boluju od GERB-a u odnosu na zdravu djecu (64). Ispitanici s GERB-om u odnosu na kontrole su imali veću razinu *S. mutansa* u slini (42% u odnosu na 25%), no nije dokazana statistički značajna razlika u istraživanju provedenom 2002. godine (63). U tom istom radu, uočena je pozitivna korelacija između razine *S.mutansa* i karijesnih lezija (p=0.05). To je u skladu s rezultatima ovog istraživanja gdje je zabilježena veća učestalost karijesa u ispitanika s $>10^5$ *S.mutans* bakterija, no samo u kontrolnoj skupini. Uočena je i veća učestalost karijesnih lezija u ispitanika s $>10^5$ *Lactobacillus spp.* u kontrolnoj skupini, što je u skladu s istraživanjima koji potvrđuju njihovu korelaciju (23).

Neka istraživanja ukazuju na to da *S. mutans*, s obzirom da je acidogena i acidurična bakterija, ima veću učestalost kod oboljelih od GERB-a (75, 76). Prema drugim autorima, u ispitanika s GERB-om dolazi do razlaganja biofilma zbog prisutosti želučane kiseline, a moguće i zbog prisutnosti pepsina (77).

S obzirom da je za razvoj karijesogenih bakterija poput *S.mutans* i *Lactobacillus spp.* potreban dentalni biofilm, kao i stabilno okruženje u određenom vremenskom periodu, pretpostavka ovog istraživanja je da je upravo zato u ispitnoj skupini zabilježena manja incidencija karijesnih lezija.

Potrebno je provesti još istraživanja koje će se baviti otkrivanjem korelacije između karijesnih lezija i GERB-a.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Karijesne lezije su manje zastupljene u ispitanika koji boluju od gastroezofagealne refluksne bolesti (33,33% ispitanika) u odnosu na kontrolnu skupinu (83,33% ispitanika).

2. Kvantum salivacije u ispitanika koji boluju od GERB-a je statistički je značajno smanjen u odnosu na zdravu kontrolu.

3. Nije moguće povezati kvantum salivacije s pojavom karijesa kod ispitanika s GERB-om i kontrolama.

4. Postoji korelacija između koncentracije bakterija *S.mutans* i *Lactobacillus spp.* i broja karijesnih lezija u zdravoj populaciji, no ne i u ispitanika koji boluju od GERB-a.

5. Ne postoji razlika u koncentraciji bakterija *S.mutans* i *Lactobacillus spp*. između kontrolne i ispitne skupine.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Vucelic B i sur. Gastroenterologija i hepatologija 1.dio. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
2. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. Am J Gastroenterol. 2006;101(8):1900-20.
3. Herbella FA, Patti MG. Gastroesophageal reflux disease: From pathophysiology to treatment. World J Gastroenterol. 2010;16(30):3745-9.
4. Lundell LR, Dent J, Bennett JR, Blum AL, Armstrong D, Galmiche JP, i sur. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. Gut. 1999;45(2):172-80.
5. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. Gut. 2005;54(5):710-7.
6. Diener U, Patti MG, Molena D, Fisichella PM, Way LW. Esophageal dysmotility and gastroesophageal reflux disease. J Gastrointest Surg. 2001;5(3):260-5.
7. Patti MG, Perretta S. Gastro-oesophageal reflux disease: a decade of changes. Asian J Surg. 2003;26(1):4-6.
8. Kahrilas PJ. Anatomy and physiology of the gastroesophageal junction. Gastroenterol Clin North Am. 1997;26(3):467-86.
9. Patti MG, Gantert W, Way LW. Surgery of the esophagus. Anatomy and physiology. Surg Clin North Am. 1997;77(5):959-70.
10. Badillo R, Francis D. Diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2014;5(3):105-12.
11. DeVault KR, Castell DO, American College of G. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. Am J Gastroenterol. 2005;100(1):190-200.
12. Gregory-Head BL, Curtis DA, Kim L, Cello J. Evaluation of dental erosion in patients with gastroesophageal reflux disease. J Prosthet Dent. 2000;83(6):675-80.
13. Yoshikawa H, Furuta K, Ueno M, Egawa M, Yoshino A, Kondo S et al.. Oral symptoms including dental erosion in gastroesophageal reflux disease are associated with decreased salivary flow volume and swallowing function. J Gastroenterol. 2012;47(4):412-20.

14. Myklebust S, Espelid I, Svalestad S, Tveit AB. Dental health behavior, gastroesophageal disorders and dietary habits among Norwegian recruits in 1990 and 1999. Acta Odontol Scand. 2003;61(2):100-4.
15. Jarvinen V, Meurman JH, Hyvarinen H, Rytomaa I, Murtomaa H. Dental erosion and upper gastrointestinal disorders. World J Gastroenterol. 1988;65(3):298-303.
16. Habesoglu TE, Habesoglu M, Surmeli M, Deveci I, Toros SZ, Gunes P et al.. Histological changes of rat soft palate with exposure to experimental laryngopharyngeal reflux. Auris Nasus Larynx. 2010;37(6):730-6.
17. Meurman JH, Toskala J, Nuutinen P, Klemetti E. Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;78(5):583-9.
18. Ranjitkar S, Smales RJ, Kaidonis JA. Oral manifestations of gastroesophageal reflux disease. J Gastroenterol Hepatol. 2012;27(1):21-7.
19. Lincir I. Farmakologija za stomatologe. Zagreb: Školska knjiga; 1993.
20. DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. Am J Gastroenterol. 2005;100(1):190-200.
21. Khan M, Santana J, Donnellan C, Preston C, Moayyedi P. Medical treatments in the short term management of reflux oesophagitis. Cochrane Database Syst Rev. 2007(2):Cd003244.
22. Presečki V. Stomatološka mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
23. Caufield PW, Schon CN, Saraithong P, Li Y, Argimon S. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. J Dent Res. 2015;94(9 Suppl):110s-8s.
24. Carlsson J, Gothefors L. Transmission of Lactobacillus jensenii and Lactobacillus acidophilus from mother to child at time of delivery. J Clin Microbiol. 1975;1(2):124-8.
25. Piwat S, Teanpaisan R, Thaitasomakul S, Thearmontree A, Dahlen G. Lactobacillus species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. Mol Oral Microbiol 2010;25(2):157-64.
26. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D et al.. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. Genome Biol. 2012;13(6):R42.
27. Teanpaisan R, Thitasomakul S, Piwat S, Thearmontree A, Pithpornchaiyakul W, Chankanka O. Longitudinal study of the presence of mutans streptococci and lactobacilli in

relation to dental caries development in 3-24 month old Thai children. Int Dent J. 2007;57(6):445-51.
28. Yang R, Argimon S, Li Y, Gu H, Zhou X, Caufield PW. Determining the genetic diversity of lactobacilli from the oral cavity. J Microbiol Methods. 2010;82(2):163-9.
29. Bardow A, Nyvad B, Nauntofte B. Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ. Arch Oral Biol. 2001;46(5):413-23.
30. Carlsson J. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. Odontol Revy. 1968;19(2):137-60.
31. Edwardsson S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling Streptococcus mutans. Arch Oral Biol. 1968;13(6):637-46.
32. Guggenheim B. Streptococci of dental plaques. Caries Res. 1968;2(2):147-63.
33. Fitzgerlad RJ. Dental caries research in gnotobiotic animals. Caries Res. 1968;2(2):139-46.
34. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(2):89-99.
35. Bowen WH, Koo H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res. 2011;45(1):69-86.
36. Burne RA. Oral streptococci products of their environment. J Dent Res. 1998;77(3):445-52.
37. Mayooran B, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. Aust Dent J. 2000;45(4):235-45.
38. Jaykus L-A, Wang HH, Schlesinger LS, Microbiology ASf. Food-borne microbes: shaping the host ecosystem. Washington, DC: ASM Press; 2009. 391 p.
39. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL et al.Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbiol. 2002;40(3):1001-9.
40. Fejerskov O, Kidd E. Zubni karijes: bolest i klinički postupci. 2 izd. Zagreb: Naklada Slap; 2011.

41. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: Streptococcus sanguinis and Streptococcus gordonii interference with Streptococcus mutans. J Bacteriol. 2008;190(13):4632-40.
42. Merritt J, Qi F. The mutacins of Streptococcus mutans: regulation and ecology. Mol Oral Microbiol. 2012;27(2):57-69.
43. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. J Dent Res. 1989;68(5):750-60.
44. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by Streptococcus mutans glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. J Bacteriol. 2010;192(12):3024-32.
45. Li Y, Burne RA. Regulation of the gtfBC and ftf genes of Streptococcus mutans in biofilms in response to pH and carbohydrate. Microbiology. 2001;147(Pt 10):2841-8.
46. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond Streptococcus mutans: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. PLoS One. 2012;7(10):e47722.
47. Van Houte J, Gibbons RJ, Pulkkinen AJ. Ecology of human oral lactobacilli. Infect Immun. 1972;6(5):723-9.
48. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of Streptococcus mutants with human dental decay. Infect Immun. 1975;11(6):1252-60.
49. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology. 2003;149(Pt 2):279-94.
50. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50(4):353-80.
51. Leverett DH, Featherstone JD, Proskin HM, Adair SM, Eisenberg AD, Mundorff-Shrestha SA et al..Caries risk assessment by a cross-sectional discrimination model. J Dent Res. 1993;72(2):529-37.
52. Vanobbergen J, Martens L, Lesaffre E, Bogaerts K, Declerck D. Assessing risk indicators for dental caries in the primary dentition. Community Dent Oral Epidemiol. 2001;29(6):424-34.
53. Leone CW, Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. J Dent Educ. 2001;65(10):1054-62.

54. Bardow A, ten Cate JM, Nauntofte B, Nyvad B. Effect of unstimulated saliva flow rate on experimental root caries. Caries Res. 2003;37(3):232-6.
55. Dawes C. A mathematical model of salivary clearance of sugar from the oral cavity. Caries Res. 1983;17(4):321-34.
56. Kim YS, Kim N, Kim GH. Sex and Gender Differences in Gastroesophageal Reflux Disease. J Neurogastroenterol Motil. 2016;22(4):575-88.
57. Fakhre Yaseri H. Gender is a risk factor in patients with gastroesophageal reflux disease. Med J Islam Repub Iran. 2017;31:58.
58. Collen MJ, Abdulian JD, Chen YK. Gastroesophageal reflux disease in the elderly: more severe disease that requires aggressive therapy. Am J Gastroenterol. 1995;90(7):1053-7.
59. Chait MM. Gastroesophageal reflux disease: Important considerations for the older patients. World J Gastrointest Endosc. 2010;2(12):388-96.
60. Corrêa MCCSF, Lerco MM, Cunha MdLRdSd, Henry MACdA. Salivary parameters and teeth erosions in patients with gastroesophageal reflux disease. Arq Gastroenterol. 2012;49:214-8.
61. Corrêa MCCSF, Lerco MM, Henry MACdA. Study in oral caviy alterations in patients with gastroesophageal reflux disease. Arq Gastroenterol. 2008;45:132-6.
62. Cazzonatto Jr H BG, Pedrazzolli JR. . Gastroesophageal reflux and oral lesions: is the acid that bad? . GED Gastroenterol Endosc Dig. 2003;22:42-6.
63. Linnett V, Seow WK, Connor F, Shepherd R. Oral health of children with gastro-esophageal reflux disease: a controlled study. Aust Dent J. 2002;47(2):156-62.
64. Ersin NK, Oncag O, Tumgor G, Aydogdu S, Hilmioglu S. Oral and dental manifestations of gastroesophageal reflux disease in children: a preliminary study. Pediatr Dent. 2006;28(3):279-84.
65. Silva MA, Damante JH, Stipp AC, Tolentino MM, Carlotto PR, Fleury RN. Gastroesophageal reflux disease: New oral findings. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91(3):301-10.
66. Correa MC, Lerco MM, Cunha Mde L, Henry MA. Salivary parameters and teeth erosions in patients with gastroesophageal reflux disease. Arq Gastroenterol. 2012;49(3):214-8.
67. Demirci M, Tuncer S, Yuceokur AA. Prevalence of caries on individual tooth surfaces and its distribution by age and gender in university clinic patients. Eur J Dent. 2010;4(3):270-9.

68. Dawes C. Why does supragingival calculus form preferentially on the lingual surface of the 6 lower anterior teeth? J Can Dent Assoc. 2006;72(10):923-6.
69. Luan W, Baelum V, Fejerskov O, Chen X. Ten-year incidence of dental caries in adult and elderly Chinese. Caries Res. 2000;34(3):205-13.
70. Di Fede O, Di Liberto C, Occhipinti G, Vigneri S, Lo Russo L, Fedele S et al. Oral manifestations in patients with gastro-oesophageal reflux disease: a single-center case-control study. J Oral Pathol Med. 2008;37(6):336-40.
71. Campisi G, Lo Russo L, Di Liberto C, Di Nicola F, Butera D, Vigneri S et al. Saliva variations in gastro-oesophageal reflux disease. J Dent. 2008;36(4):268-71.
72. Watanabe M, Nakatani E, Yoshikawa H, Kanno T, Nariai Y, Yoshino A et al. Oral soft tissue disorders are associated with gastroesophageal reflux disease: retrospective study. BMC Gastroenterol. 2017;17(1):92.
73. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. J Calif Dent Assoc. 2013;41(2):107-9.
74. Wild YK, Heyman MB, Vittinghoff E, Dalal DH, Wojcicki JM, Clark AL et al.Gastroesophageal reflux is not associated with dental erosion in children. Gastroenterology. 2011;141(5):1605-11.
75. Holtta P, Aine L, Maki M, Ruuska T, Vuento R, Ashorn M et al.. Mutans streptococcal serotypes in children with gastroesophageal reflux disease. ASDC J Dent Child. 1997;64(3):201-4.
76. Bretz WA, Krahn DD, Drewnowski A, Loesche WJ. Salivary levels of putative cariogenic organisms in patients with eating disorders. Oral Microbiol Immunol. 1989;4(4):230-2.
77. Ranjitkar S, Kaidonis JA, Smales RJ. Gastroesophageal reflux disease and tooth erosion. Int J Dent. 2012;2012:479850.

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj istraživanja bio je dobiti bolji uvid u specifičnu mikrobiološku floru ispitanika koji boluju od GERB-a s obzirom na manjak sličnih istraživanja. Hipoteza ovog istraživanja je bila da će kod ispitanika s dijagnosticiranim GERB-om biti više karijesnih lezija u usnoj šupljini te da će biti znatno veći broj mikroorganizama *S.mutans* i *Lactobacillus spp*. u nestimuliranoj slini.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 36 ispitanika, od čega 18 ispitanika u ispitnoj, a drugih 18 u kontrolnoj skupini. Ispitanicima je izmjeren kvantum salivacije u razdoblju od 5 minuta, a uzorak sline naseljen na CRT hranjive podloge, te je napravljen stomatološki pregled i zabilježena je prisutnost karijesnih lezija.

Rezultati: Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su karijesne lezije zastupljenije u zdravoj populaciji (83,33% ispitanika) u odnosu na ispitanike koji boluju od GERB-a (33,33% ispitanika). Kvantum salivacije je znatno smanjen u ispitanika koji boluju od GERB-a. Ne postoji statistički značajna povezanost kvantuma salivacije s brojem karijesnih lezija u ispitivanih skupina. Ne postoji razlika između količine *S. mutansa* i L*actobacillusa* u dvije ispitivane skupine.

Zaključak: Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti kako ispitanici koji boluju od GERB-a imaju smanjen rizik za nastanak karijesnih lezija, unatoč smanjenom kvantumu salivacije. Broj mikroorganizama *S. mutans* i L*actobacillus* u nestimuliranoj slini nije različit u odnosu na zdravu skupinu.

9. SUMMARY

Thesis title: Incidence of carious lesions and bacterial count of microorganisms *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* in saliva of patients with GERD.

Objective: To achieve a better insight into a specific microbial flora of the patients with GERD, considering a lack of similar studies. Hypothesis was that patients with GERD will have more carious lesions in their oral cavity and significantly higher counts of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* bacteria in unstimulated saliva.

Material and methods: 36 patients were included into this study, 18 patients were in a test group and 18 were healthy controls. Unstimulated salivary flow rate was measured through the period of 5 minutes. Saliva samples were collected and incubated for 48 hours for colony forming unit counting. Caries was diagnosed by visual detection of carious lesions.

Results: Carious lesions are more common in the healthy population (83,33% of the healthy control), compared to patients with GERD (33,33% patients). There is no significant correlation between unstimulated salivary flow rate and number of carious lesions in patients with GERD and healthy controls. There is no statistically significant difference between bacterial counts of *S.mutans* and *Lactobacillus* in the two test groups.

Conclusion: Patients with GERD have lower risk of carious lesions, despite low unstimulated salivary flow rate. Number of microorganisms *S.mutans* and *Lactobacillus* is not significantly different compared to the healthy controls.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Tihana Ilić

Datum rođenja: 18.03.1994.

Mjesto rođenja: Knin, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: 4. gardijske 24, 22300, Republika Hrvatska

Telefon: +385919778138

E-mail: tihana.ilic5@gmail.com

Obrazovanje:

- 2000. – 2008. II osnovna škola Knin
- 2008. – 2012. Srednja škola Lovro Monti Knin, Opća gimnazija
- 2012. – 2018. Medicinski fakultet u Splitu, integrirani studij „Dentalna medicina“

Znanja i vještine:

- poznavanje stranih jezika: engleski jezik, njemački jezik
- rad na računalu (MS Office aplikacije)

Aktivnosti:

- Demonstrator na kolegiju Restaurativna dentalna medicina I 2015./2016
- Demonstrator na kolegiju Restaurativna dentalna medicina II 2017./2018
- Demonstrator na kolegiju Endodoncija I 2017./2018
- Član udruge „Zubolina“