

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Марко Анђелковић

Утицај различитих зубних надокнада на присуство  
патогених бактерија у оралној дупљи

Докторска дисертација

Београд, 2016. година

University of Belgrade  
School of Dental Medicine

Marko Anđelković

Effects of different dental appliances on prevalence of  
periodontal pathogens in oral cavity

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

**Ментор:**

**Проф. др Љиљана Тихачек Шојић**

Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет,

Клиника за стоматолошку протетику

**Чланови комисије:**

**Доц. др Александра Милић Лемич**

Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет,

Клиника за стоматолошку протетику

**Проф. др Јелена Милашин**

Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет,

Институт за хуману генетику

**проф. др Љиљана Кесић**

Универзитет у Нишу, Медицински факултет,

Одсек стоматологија

Датум одбране: \_\_\_\_\_

## Сажетак

Микрофлора усне дупље је разноврсна и јединствена у поређењу са микрофлором која се налази у другим деловима људског тела, услед специфичних биолошких и физичких услова који владају у оралној средини. До сада је изоловано преко 700 различитих врста бактерија из оралне средине и скоро свакодневно нови сојеви бивају идентификовани. Локални и системски штетни ефекти оралних бактерија, посебно пародонтопатогених микроорганизама, до сада су врло темелјно испитивани. Бројни аутори су се бавили истраживањем састава оралног биофилма код пацијената рехабилитованих зубним надокнадама. Међутим, сама промена до које надокнаде доводе, односно поређење присуства пре израде и након периода ношења надокнада код истог пацијента није била у центру пажње истраживача.

Основни циљ истраживања био је да се утврди веза између различитих врста зубних надокнада и присуства пародонтопатогених бактерија *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Истраживање је дизајнирано као проспективна студија. У студији је учествовало 90 пацијената подељених у три групе по 30. Прву групу чинили су пацијенти код којих је била индикована израда и горње и доње тоталне протезе, другу групу пацијенти којима је била индикована израда једне метало-керамичке крунице, а трећу групу пацијенти код којих је била потребна рехабилитација комбинованим фиксно-мобилним радом са прецизним везним елементима (кугличасти атечмени). Након укључења у студију пацијентима је урађен детаљан стоматолошки преглед и након припреме приступило се изради индикованих зубних надокнада за сваког пацијента посебно. Пре предаје зубне

надокнаде обављено је узимање биолошког материјала. После периода ношења надокнаде од најмање 6 месеци поново су узимани узорци. Након изолације ДНК помоћу *PCR* методе вршена је идентификација присутних бактерија како пре, тако и након периода ношења надокнада.

Резултати показују да постоји веза између различитих врста зубних надокнада и присуства пародонтопатогених бактерија и то код прве групе пацијената (код којих је била индикована тоталних протеза) примећено је статистички значајно повећање присуства бактерија *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* и *Tannerella forsythia*, код друге групе пацијената (код којих је била индикована израда једне метало-керамичке крунице) примећено је статистички значајно повећање присуства бактерије *Prevotella intermedia* а код треће групе пацијената (код којих је била индикована израда комбиноване фиксно-мобилне зубне надокнаде) примећено је статистички значајно повећање присуства бактерија *Treponema denticola* и *Fusobacterium nucleatum*.

Механизми који узрокују повећање присуства оралних патогена морају се детаљно и појединачно испитати, како бисмо могли да смањимо, ако не и елиминишемо штетне бактерије усне дупље. Боље разумевање оралне микрофлоре и утицај који стоматолошка терапија може имати на бактеријске колоније треба да буду једни од главних циљева модерне стоматологије.

**Кључне речи:** зубне надокнаде, пародонтопатогене бактерије, ланчана реакција полимеразе

**Научна област:** Медицинске науке - стоматологија

**Ужа научна област:** Стоматолошка протетика

**УДК број:** 616.314-76/-77:579.61(043.3)

## ***Summary***

*Oral microflora is diverse and unique, especially when compared to microbial communities in other parts of the human body, all because of very specific biological and physical conditions present in the oral cavity. Many different bacterial species, over 750, colonize the mouth. Numerous studies have established a relationship between periodontal pathogens and the development and progression of periodontal disease, also with serious systemic diseases and conditions. The need for understanding the composition of oral microflora in patients rehabilitated with dental appliances has been recognized by some authors, but changes that occur in prevalence of periodontal pathogens, as a result of wearing dental appliances, have not been studied.*

*The aim of this study was to determine if wearing dental appliances can cause changes in prevalence of some of the most common periodontal pathogens (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) in patients wearing dental appliances.*

*A total of 90 patients participated in the study, and were divided into 3 groups of 30. The first group consisted of edentulous patients in need of complete dentures, the second group consisted of patients in need of single metal-ceramic crown restoration, and participants of the third group were indicated for complex partial denture treatment (using proximal ball attachments). After enrollment in the study detailed dental examination was performed, and dental appliances were made for each patient individually. Before insertion of the appliances samples of biological materials were obtained. After the period of at least six months samples were collected again. After the isolation of bacterial DNA, present bacteria were identified using PCR method in samples before and after insertion of dental appliances.*

*Results of this study suggests that wearing dental appliances favors colonization of periodontal pathogens, more specifically, statistically significant increase of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia and Tannerella forsythia was observed in participants from the first group, statistically significant increase of Prevotella intermedia was observed in participants from the second group and statistically significant increase of Treponema denticola and Fusobacterium nucleatum was observed in the third group of participants.*

*Mechanisms responsible for higher bacterial presence need to be analyzed individually and carefully, which might provide us with guidelines on how to reduce, if not eradicate, potentially harmful pathogens. Better understanding of impact that dental treatment has on oral microflora should be considered as one of the main goals of modern dentistry.*

***Keywords:*** dental appliances, periodontal pathogens, PCR

***Scientific field:*** Medical sciences - dentistry

***Scientific field specialized:*** Prosthodontics

***UDK number:*** 616.314-76/-77:579.61(043.3)

## Садржај

1. Увод.....	1
2. Преглед литературе .....	4
2.1 Грађа оралне мукозе .....	4
2.2 Грађа пародонцијума .....	6
2.3 Биофилм.....	8
2.4. Пародонтопатогене бактерије.....	9
2.4.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	10
2.4.2 <i>Treponema denticola</i> .....	11
2.4.3 <i>Tannerella forsythia</i> .....	12
2.4.4 <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	13
2.4.5 <i>Prevotella intermedia</i> .....	14
2.4.6 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	15
2.5 Орални патогени и системска обољења .....	17
3. Научна основа проблема .....	19
4. Циљ.....	24
5. Материјал и методе.....	27
5.1 Клиничка испитивања .....	30
5.2 Молекуларно-генетичка испитивања.....	33
5.2.1 Изолација бактеријске ДНК.....	34



5.2.2 Ланчана реакција полимеразе.....	34
5.2.3 Полиакриламидна гел електрофореза.....	38
5.3 Статистичка анализа.....	40
6. Резултати истраживања.....	41
7. Дискусија.....	58
8. Закључак.....	68
9. Литература.....	71

## **1. Увод**

У људском организму број насељених бактеријских ћелија је десет пута већи него што је број самих људских ћелија[1]. Насељавање почиње још на рођењу и наставља се касније преко мајчине коже и млека. Преко усне и носне дупље бактеријске ћелије долазе у једњак, желудац и црева где се насељавају, и у ткивима и органима су присутне током читавог људског живота. Различите средине унутар човековог организма погодују развоју различитих врста бактеријских заједница, које се тако могу поделити на основу тога које системе или органе насељавају (цревна флора, вагинална, кожна, орална, итд.). Услед великог броја бактерија као и чињенице да се производи њиховог метаболизма или разградње могу наћи у свим телесним течностима човека амерички Национални здравствени институт је 2007. године уврстио Хумани микробиомски пројекат (*Human Microbiome Project - HMP*) у оквир програма медицинских истраживања од посебног значаја (*Roadmap for Medical Research*), препознајући велики утицај који бактерије имају на здравље човека [2]. Циљ пројекта је да се идентификују и до детаља опишу све бактерије које насељавају људска ткива и органе и да се прецизно анализира њихов утицај на здравље човека.

Уобичајена бактеријска флора подразумева микроорганизме који су значајни за нормалну функцију домаћина и доприноси одбрани организма спречавајући насељавање штетних, егзогених врста и стимулишући имуни систем [3-5]. За узврат од домаћина добија стабилну животну средину и извор хране.

Микрофлора усне дупље је разноврсна и јединствена у поређењу са микрофлором која се налази у другим деловима људског тела, услед специфичних биолошких и физичких услова који владају у оралној средини. До сада је изоловано преко 700 различитих врста бактерија из оралне средине и скоро свакодневно нови сојеви бивају идентификовани [6-

8]. Унутар усне дупље налазе се анатомски и морфолошки различите површине (површине зуба, гингивални сулкус, слузокожа језика, слузокожа образа, меко и тврдо непце, под усне дупље), свака погодна за насељивање и живот микроорганизама, односно свака засебно и специфично микробиолошко станиште[9-11]. Састав оралног биофилма се разликује у зависности од површине које прекрива и све бактеријске заједнице су најчешће у равнотежи, како међусобно тако и са домаћином[12]. Уколико дође до промена услова средине узрокованих променом у исхрани, системским поремећајем, изградом испуна или зубне надокнаде, нарушава се и микробиолошка хомеостаза што може довести до фаворизације патогених и условно патогених микроорганизама [13,14].

Када се говори о патолошким променама које оралне бактерије могу узроковати најчешће се мисли на каријес и пародонтопатију, која су међу најчешћим обољењима данашњице и подједнако погађају оба пола и све старосне групе [15-17]. Идентификовање узрочника пародонтопатије предмет је истраживања научника од како су бактерије први пут доведене у везу са обољењем потпорних ткива зуба, пре више од сто година [18]. Данас се зна да не постоји један, главни, узрочник овог обољења, међутим по значају, односно по заступљености и утицају на деструкцију ткива издвајају сеграм негативни анаероби и то посебно *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* (“црвени комплекс”), *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*[19-21].

## 2. Преглед литературе

Усна дупља (лат. *cavum oris*) је почетни део дигестивног система у којем се врши механичка обрада хране и започиње њено хемијско варење. Усна дупља почиње усним отвором а завршава се ждрелом и садржи неколико органа који осим улоге у дигестивном систему, играју важну улогу и у формирању и изговарању гласова. Усна дупља је анатомски подељена на два дела: предворје усне дупље (лат. *vestibulum oris*) је мањи, почетни део усне дупље смештен непосредно иза усног отвора и ограничен уснама, ткивом образа, деснима и зубима. Други, већи део усне дупље назива се права усна дупља (лат. *cavum oris proprium*) и садржи зубе, језик и пљувачне жлезде. Са предње стране се наставља на предворје усне дупље, а са њене задње стране (постериорно) почиње ждрело. Ограничена је са четири зида: горњи зид или кров усне дупље који чине тврдо и меко непце (лат. *palatum durum et mole*), доњи зид или под усне дупље који чине мишићи врата и бочни зидови које чини ткиво образа.

Усна дупља је прекривена плочасто-слојевитим епителом, који је подељен у три типа:

- облажућа (засторна мукоза),
- мастикаторна мукоза и
- специјализована мукоза.

### 2.1 Грађа оралне мукозе

**Облажућа мукоза** се састоји од танког слоја епитела и ламине проприје испод њега. Епител се састоји од базалног слоја (лат. *stratum basale*), интермедијарног слоја (лат. *stratum intermedium/spinosum*) и површинског слоја (лат. *stratum superficiale*) и они заједно формирају некератинизовани епител оралне мукозе. Ламину проприју чине папиларни и

ретикуларни слој везивног ткива. Облажућа мукоза је мека и угибљива и прекрива под усне дупље, образе, усне и меко непце [22, 23].

**Мастикаторна мукоза** чини гингиву и прекрива тврдо непце, а назива се тако зато што прва долази у контакт са храном у току жвакања (мастикације). Базални и интермедијарни слој су исти као и код некератинизованог епитела, док разлику представља гранулозни слој (лат. *Stratum granulosum*) и површински, орожали слој (лат. *stratum corneum*). Површински слој чине спљоштене, орожале ћелије које се супротстављају атрицији. Оне су испуњене кератином, чврстим, авиталним материјалом који је отпоран на трење и непропустљив за инвазију бактерија. Ћелије површинског слоја се непрекидно уклањају и замењују новим из дубљих слојева [22, 23].

**Специјализована мукоза** прекрива горњу страну (дорзум) језика и чине је четири типа посебних структура које се називају папиле (лат. *papillae*). Најбројније су кончасте папиле (лат. *papillae filiformes*), танки, кончасте и кератинизовани продужеци епителних ћелија и везива. Пружају се 2-3 мм у висину и покривају целу храпаву површину језика. Печуркасте папиле (лат. *papillae fungiformes*) су мање бројне од кончастих, растркане по површини језика, црвене боје и прекривене некератинизованим епителом. Опшанчене папиле (лат. *papillae vallatae*) налазе се на прелазу тела у корен језика и има их 10-14. Листасте папиле (лат. *papillae foliate*) налазе се на задњим ивицама бочних делова језика [22, 23].

Осим епителних ћелија (кератиноцита) у састав оралне мукозе улазе и тзв. некератиноцити. Ту се убрајају Лангерхансове ћелије (учествују у обради антигеног материјала), Меркелове ћелије (имају функцију рецептора за додир) и меланоцити

(ћелије које стварају меланин). Треба напоменути да у инфламираном епителу постоје још два типа некератиноцита а то су лимфоцити и полиморфонуклеарни леукоцити [22, 23].

## 2.2 Грађа пародонцијума

Пародонцијум обухвата више ткива која окружују зуб пружајући му потпору и омогућавајући његову функцију. Ту спадају цемент, периодонцијум, унутрашњи зид алвеоле зуба и гингива.

**Цемент** је минерализовано зубно ткиво слично кости које у танком слоју покрива читаву површину корена зуба. Његова улога је двојака; прво, прекрива површину коренског дентина и затвара крајеве дентинских тубула и друго, служи за припој колагених влакана периодонцијума која се у њега уграђују. Колагена влакна служе као веза између унутрашњег зида алвеоларне кости и корена зуба и одржавају зуб у алвеоли [22, 23].

**Периодонцијум** је меко, фиброзно везивно ткиво, смештено између цемента и зубне алвеоле. Повезује цемент зуба са алвеоларном кости и ткивом гингиве и састоји се од влакана, ћелија и међућелијске супстанце. Периодонцијум је добро прилагођен улогама које обавља а то су фиксација зуба, амортизација притиска који се током жвакања преноси са зуба на алвеоларну кост, нутритивна улога као и сензорна функција захваљујући којој горња и доња вилица заузимају одговарајући положај током жвакања [22, 23].

**Алвеоларна кост**, односно алвеоларни наставак максиле и алвеоларни део мандибуле, садржи зубне алвеоле у којима су смештени и припојени зуби. Састоји се од праве

алвеоларне кости и потпорне кости. Права алвеоларна кост облаже зубну чашицу, окружује коренове зуба и служи за припој периодонталних влакана. Потпорна кост је у ствари компактна кортикална плоча која прекрива горњу и доњу вилицу и подупире праву алвеоларну кост. Алвеоларна кост настаје са ницањем зуба, а када дође до њиховог губитка она се ресорбује[22, 23].

**Гингива** је део мастикаторне (кератинизоване) мукозе усне дупље али уједно и потпорних ткива зуба. Развија се са њиховим ницањем и нестаје са њиховим губитком. Гингива обезбеђује припој за површину зуба, механичку стабилност и отпорност на деловање жвачних сила као и заштиту дубљих пародонталних ткива од продора микроорганизама. Гингива се може поделити на три дела: слободну, припојну (фиксну) и интерденталну[22, 23].

Слободна (маргинална) гингива обавија круницу зуба, око које је тесно приљубљена али није везана. Простор између слободне гингиве и зуба назива се гингивални сулкус. То је узан, капиларни простор кога граде глеђ зуба и сулкусни епител слободне гингиве, дно чини припојна гингива, док је коронарно отворен и у комуникацији са усном дупљом. Дно гингивалног сулкуса се нормално налази у нивоу глеђно-цементне границе, обично 1.5-2 мм испод ивице слободне гингиве. Уколико дође до гингивитиса или пародонтитиса ово растојање је веће и тада се говори о гингивалном или пародонталном цепу. Епител који гради дно гингивалног сулкуса назива се припојни епител. Чини га релативно мали број ћелија са велик интерцелуларним просторима што, уз одсуство кератинизације, утиче на велику пропустљивост. Припојни епител представља најрањивији део гингиве на коме долази до иницијалних оштећења током инфламаторних процеса[22, 23].



Припојна гингива је чврсто припојена за зуб и алвеоларну кост, тврда, резилијентна и потпуно непокретна (фиксирана). Вестибуларно, у апикалном правцу, пружа се до мукогингивалне линије, а коронарно прелази у слободну гингиву. Границу између припојне и слободне гингиве чини замишљена линија која пролази кроз дно гингивалног сулкуса[22, 23].

Интердентална гингива је део гингиве смештен у интерденталном простору и назива се још интердентална папила. Она испуњава узани простор између вратних делова круна суседних зуба[22, 23].

### **2.3Биофилм**

Биофилм представља било коју групу микроорганизама повезаних како међусобно тако и са ткивом на које налажу [24]. Микроорганизми су најчешће спојени путем екстрацелуларног матрикса који луче и који се састоји од протеина и полисахарида. Дентални плак је орални биофилм који се састоји од великог броја различитих бактеријских врста везаних за глеђ или цемент зуба. Непосредно након прања зуба, протеини и гликопротеини из пљувачке се таложе на површину зуба стварајући танку мембрану која се назива пеликула. Пеликула представља погодно тле за насељавање бактерија, чиме се ствара дентални плак. Плак се може формирати супра или субгингивално, и бактеријске врсте које се насељавају су различите. Субгингивални плак се теже уклања, пружа услове за насељавање и развој грам негативних анаеробних бактерија, и сматра се одговорним за настанак инфламације и последичне деструкције потпорних ткива зуба.

Први знаци обољења пародонталних ткива јављају се на гингиви. Она постаје отечена лако крвари, али још увек нема продора бактерије у дубља ткива. Уколико се узрок инфламације не уклони, бактерије продиру у периодонцијум, долази до разарања колагених влакана, појачане остеокласне активности, разградње кости и као крајњи резултат губитак зуба.

Постоји више механизма којима ове бактерије остварују своју патолошку активност. Доминантан је онај путем стварања ендотоксина-липополисахарида (ЛПС). Сулкусни епител има значајан степен пропустљивости, док је код присутне инфламације овај степен знатно већи. Међутим нису само бактерије одговорне за настанак пародонтитиса. Сматра се да су пародонтална обољења мултикаузална и да одговор домаћина игра веома важну улогу у настанку и прогресији болести. Сматра се да су у току запаљења пародонцијума ослобођени биохемијски маркери као што су *PgE2*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  и *IL-6* од пресудног значаја у регулацији разарања везивног ткива као и у клиничким манифестацијама болести. Став је и да су генетски одређени путеви важан фактор који доприноси предиспозицији за настанак и развој пародонтопатије. То се највише односи на гене који регулишу биолошку расположивост инфламаторних медијатора. Утврђено је да моноцити особа које имају тешке облике пародонтопатија (са израженим инфламаторним и деструктивним процесима у пародонцијуму) стварају веће количине инфламаторних медијатора као што су *PgE2* и *IL-1 $\beta$* [25].

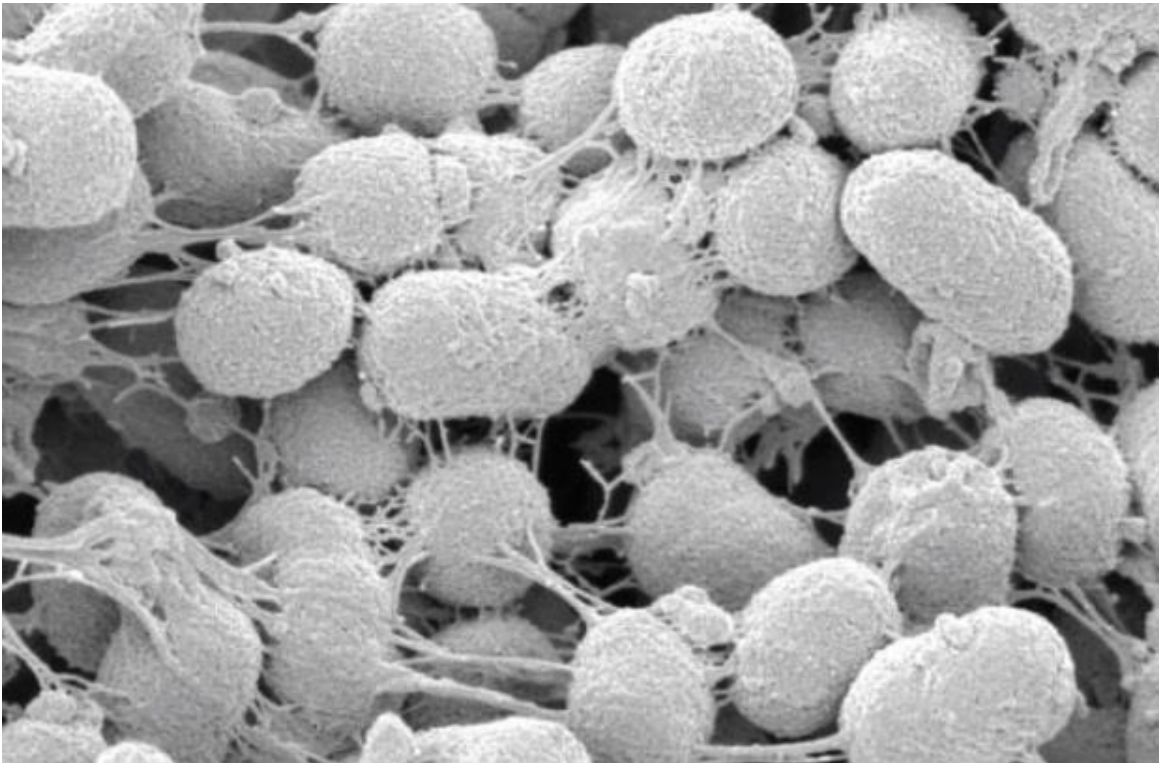
#### **2.4.Пародонтопатогене бактерије**

Оралне бактерије које се најчепће доводе у везу са настанком и развојем како обољења потпорних зубних ткива тако и удаљених система и органа су *Porphyromonas gingivalis*,

*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

#### **2.4.1 *Porphyromonas gingivalis***

*Porphyromonas gingivalis* је грам негативна, црно пигментисана анаеробна бактерија (Слика 1). Поседује угљено-хидратни омотач који спречава опсонизацију комплементом и онемогућава фагоцитну активност неутрофила.



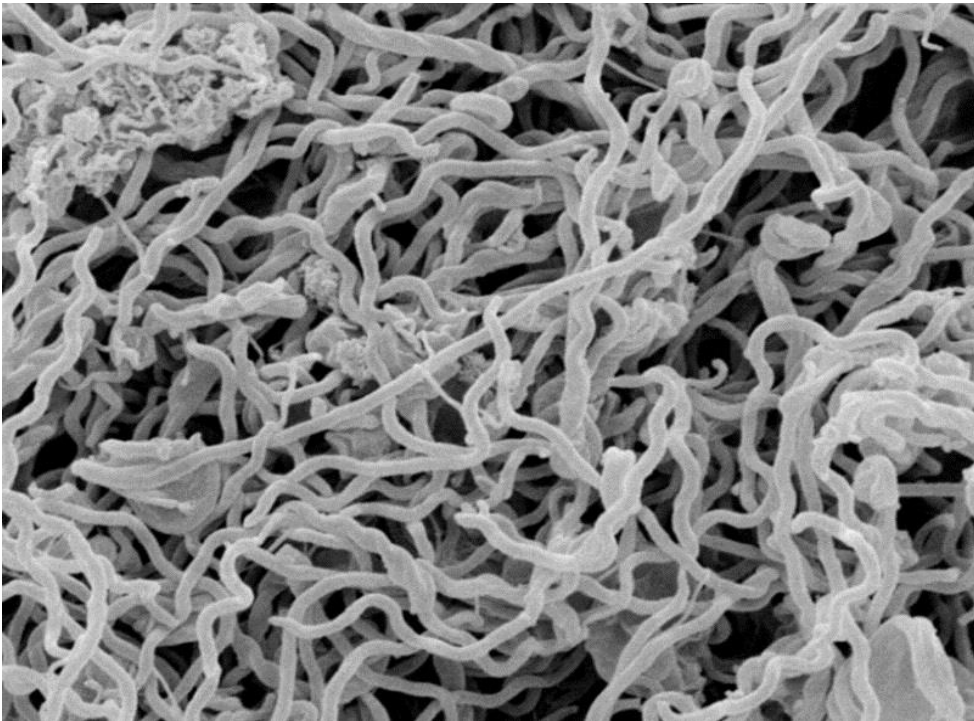
Слика 1 - Колонија *P. gingivalis*-а на крвном агару [26]

Карактеришу је бројни фактори вируленције: протеазе (које разграђују имуноглобулине, колагена влакна и хијалуронску киселину), адхезини, ендотоксини и цитотоксине који директно разарају пародонтална ткива, или пак доводе до запаљенске реакције и разградње коштаног ткива као последице имуног одговора домаћина[27, 28].*P.*

*gingivalis* поседује могућност везивања за ћелије оралног епитела у лабораторијским условима, што указује на његову вируленцију и значај у развоју пародонтопатије [29].

#### 2.4.2 *Treponema denticola*

*Treponema denticola* је грам негативна, спирална, анаеробна бактерија, покретна и са израженом протеолитичком активношћу (Слика 2). Веома је отпорна, и у стању је да опстане у бактеријским заједницама различитог састава [30].



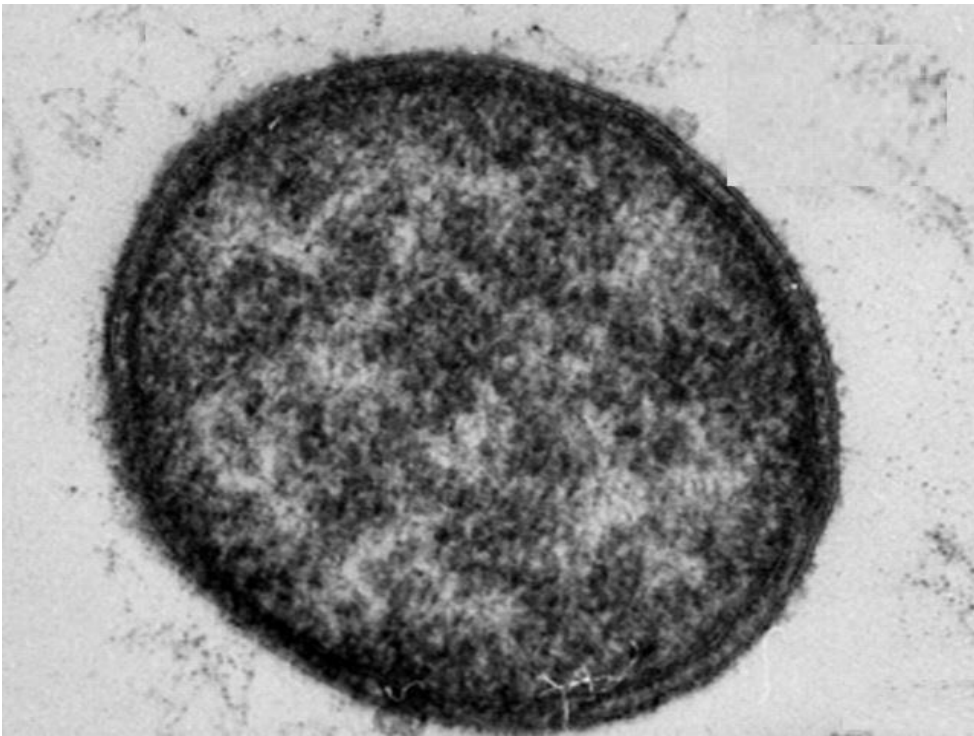
Слика 2 - Скенинг електро-микрограм *T. denticola*-е [31]

Производи липополисахариде, као и бројне потенцијално токсичне продукте метаболизма (индоле, водоник-сулфид, амонијак). Чешће се изолује код пацијената код којих је присутно обољење потпорних ткива и њено присуство указује на озбиљност пародонтопатије [32]. *T. denticola* се везује за фибробласте базалне мембране и доводи до

њихове деструкције, било метаболичким продуктима било дејством цитотоксичних ензима [33].

### 2.4.3 *Tannerella forsythia*

*Tannerella forsythia* је непигментисана, асахаролитична, грам негативна анаеробна бактерија (Слика 3). До скоро је било изузетно тешко узгајати је у лабораторијским условима, па је тако још увек недовољно испитана, али суприсутни бројни докази о утицају *T. forsythia*-е на патогенезу пародонталног обољења [34,35].



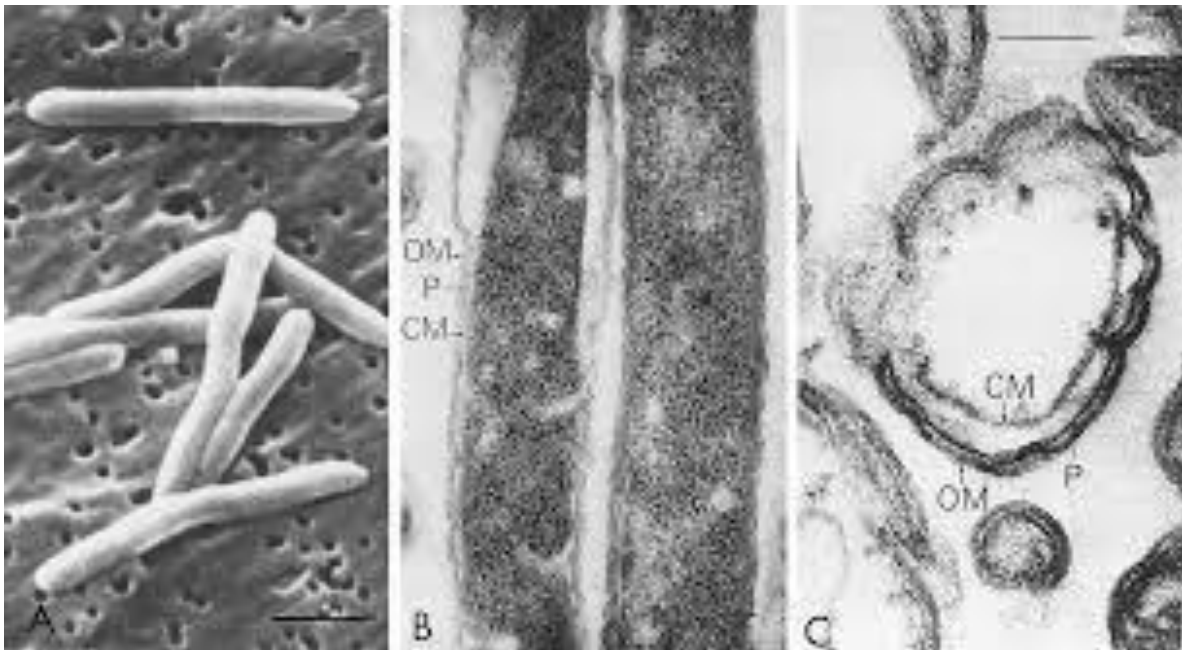
Слика 3 - трансмисиони електро-микрограм *T. forsythia*[36]

Бактерија поседује факторе вируленције који било директно, било тако што провоцирају имуни одговор домаћина, доводе до настанка пародонтопатије. *T. forsythia* нема могућност метаболисања угљених хидрата, те својим протеазним ензимима разграђује протеине домаћина, чиме нарушава интегритет пародонталног ткива.

Истовремено, производи гликозидазе, ензиме одговорне за деградацију олигосахарида и протеогликана, што даље доприноси уништењу потпорних зубних ткива. Осим тога, захваљујући адхезинима, врло лако се везује за ћелије домаћина, и захваљујући липопротеинима на својој мембрани доводи до активације имуног одговора лучењем проинфламаторних цитокина, или пак узрокује апоптозу ћелије [37, 38].

#### 2.4.4 *Fusobacterium nucleatum*

*Fusobacterium nucleatum* је грам негативна, фузиформна или штапићаста непокретна бактерија разлитих дужина (Слика 4). Често се налази у субгингивалном денталном плаку, услед своје способности да се везује за велики број, било грам негативних, било грам позитивних бактерија и да коегзистира са различитим паропатогеним микроорганизмима.



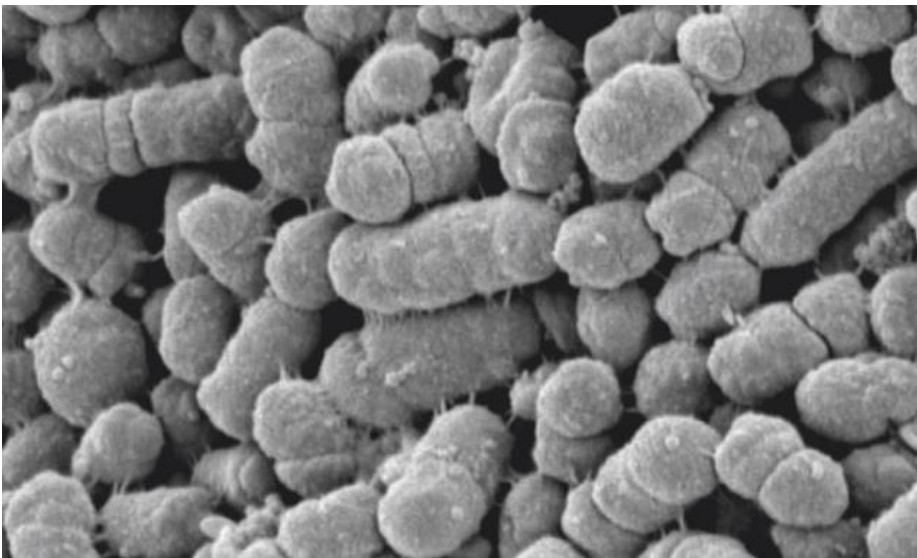
Слика 4 - *F. nucleatum*, снимак СЕМ и ТЕМ [39]

Сам по себи не исказује велико патогено дејство, али способност коагрегације, нарочито са *P. gingivalis*, и велика способност разградње базалне мембране утичу на

прогресију обољења и олакшавају дејство других бактерија [40]. *F. nucleatum* штетно дејство испољава преко својих метаболичких продуката (бутерна киселина, јони амонијака, пропионат) који спречавају или успоравају пролиферацију фибробласта базалне мембране. Иако не доводе до смрти фибробласта, заустављањем њихове пролиферације спречавају правовремену репарацију оштећење. Такође, лучењем сулфида успева да се „сакрије“ од имуних ћелија организма и избегне елиминацију [40]. Битно је напоменути да је, од свих познатих паропатогених бактерија, *F. nucleatum* најчешће изолован из удаљених (ван-оралних) инфективних жаришта у организму [41].

#### **2.4.5 *Prevotella intermedia***

*Prevotella intermedia* је црно пигментисани, грам негативни стриктни анаероб, отпоран на краткотрајно излагање кисеонику (Слика5) [42]. Ова бактерија је присутна у скоро свим пародонталним лезијама, без обзира у ком се стадијуму обољење налази. Када дође до инфламације гингиве, она отиче и лучи се већа количина гингивалне течности богате нутријентима који погодују развоју *P. intermedia*-а.



Слика 5 - Колонија *P. intermedia*-а на крвном агару [26]

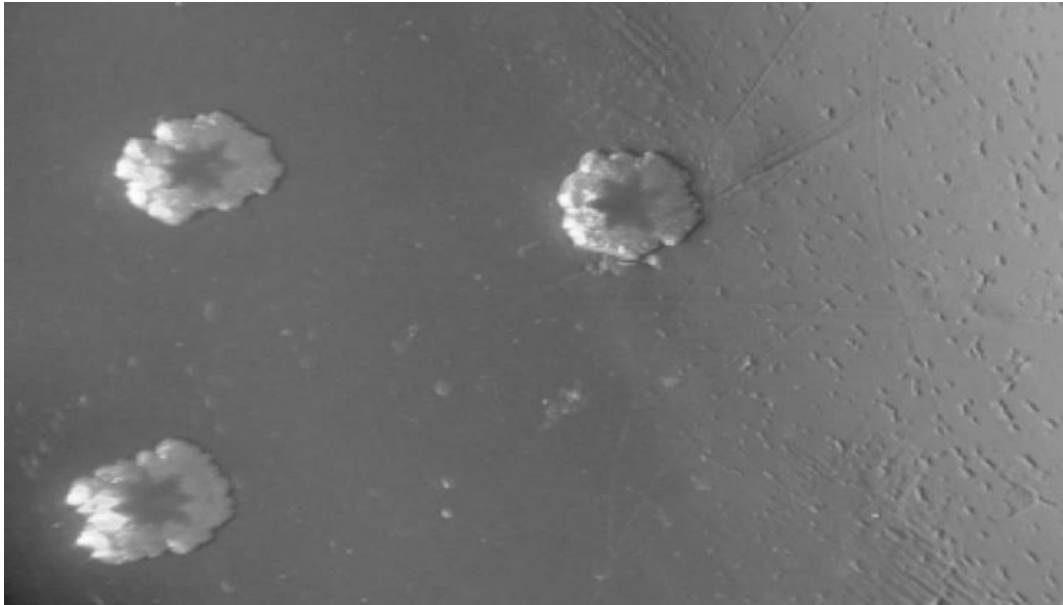
Присутна је и у здравим устима, јер захваљујући фимбријама које поседује, у стању је да се веже и за ћелије оралне мукозе[43]. Присуство *P. intermedia*-е у пародонталном ткиву доводи до израженог имуног одговора домаћина, проузрокујући оштећења потпорних структура зуба, док је сам микроорганизам заштићен капсулом која спречава фагоцитну активност неутрофила. Такође, секретује и *IgA* протеазу која разграђује саливарна *IgA1* и *IgA2* антитела која представљају прву линију одбране усне дупље од инфекције [44]. *P. intermedia*-а игра важну улогу у формирању и одржавању биофилма, омогућавајући међусобно препознавање бактерија, размену генетичког материјала и метаболита [45]. Наиме, доказано је да лучи изузетно велике количине молекула *autoinducer-2* који је заслужан за нормално функционисање комплексних бактеријских заједница. Занимљиво је и да се заступљеност *P. intermedia*-а у гингивалном сулкусу/пародонталном цепу значајно повећава када дође до повећања ниво прогестерона и естрогена у пљувачки домаћина. Стероидни хормони делују као фактори раста на *P. intermedia*-у, и тиме се можда може објаснити повећана учесталост гингивитиса у пубертету и трудноћи[46].

#### **2.4.6 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* је сферична или штапићаста грам негативна бактерија (Слика 6). Факултативни је анаероб те може опстати у средини са и у средини без кисеоника. Поседује неколико фактора вируленције и сматра се једним од главних узрочника јувенилне и агресивне пародонтопатије код одраслих [47,48]. Продукује леукотоксин довољно потентан да може уништити полиморфонуклеарне леукоците, као и моноците периферне крви, чиме директно напада имуни систем домаћина [49]. Такође има токсичан ефекат и на Т лимфоците, што га чини прилично агресивним патогеном [50].



Ендотоксин *A. actinomycetemcomitans* утиче на имуни одговор домаћина, што поспешује разарање ткива.



Слика 6 - *A.actinomycetemcomitans* наTSBV агару [51]

Треба напоменути и улогу коју *A. actinomycetemcomitans* игра у разградњи алвеоларне кости. Наиме липополисахарид мембране стимулише макрофаге на лучењеинтерлеукина *IL-1*, *IL-1 $\beta$*  као и тумор некрозис фактора (*TNF*) који пак доводе до активације остеокласта и последичног губитка коштаног ткива [52]. Такође, разградњом бактеријске ћелије долази до ослобађања протеогликана који опет доводе до разарања пародонцијума [53].

У студији објављеној 1998. године *Socransky* је са својим сарадницима, на укупном броју од 13261 урозака, показао да се *P. gingivalis*, *T. denticola* и *T.forsythia* у изузетно великом броју случајева налазе заједно (црвени комплекс) [54], што само доприноси тврдњи да обољења пародонцијума нису производ деловања само једне бактерије већ

удруженог дејства многих фактора, који, поред микроорганизама, укључују и факторе везане за имуни одговор домаћина као и за услове који владају у оралној средини.

## **2.5 Орални патогени и системска обољења**

Штетно дејство оралних патогених бактерија није ограничено само на средину коју обично насељавају. Усна дупља представља, у правом смислу речи, улаз у организам. Храном, преко пљувачке, бактерије могу доћи у дигестивни тракт, ваздухом односно удисањем у горње и доње дисајне путеве и плућа.

Није познато да пародонтални патогени своје штетно дејство испољавају у дигестивном тракту. Кисела средина желуца у стању је да их ефикасно елиминише. Међутим усну дупљу насељавају и неки други микроорганизми, попут *Helicobacter pylori*-ја чије штетно дејство на желудац је веома добро документовано [55-57]. Утврђено је да присутна пародонтална инфекције погодује насељавању и прогресији овог микроорганизма у усној дупљи, те се може рећи да пародонтопатогени посредно утичу и на гастрична обољења стварајући повољне услове за развој ове бактерије [58, 59].

Пародонтални патогени најчешће се у усној дупљи налазе у оквиру супра/субгингивалног денталног плака. Деловањем пљувачке или неких механичких фактора (абразивног дејства хране, чишћењем зуба), плак се одваја и удисањем може dospети у дисајне путеве и плућа. Велики број оралних бактерија је изолован из плућног и бронхијалног секрета [60-62], што указује на могућност да пародонтални патогени могу опстати и на слузокожи дисајних путева. Подаци у литератури указују и на дисеминацију бактерија усне дупље током хируршких интервенција, односно током ендотрахеалне интубације[63],или код лежећих пацијената прикључених на апарате за дисање[64].Здрав

респираторни тракт у стању је да се одбрани од аспирираних бактерија. Међутим, уколико пацијенти имају смањену секрецију пљувачке (што је код носилаца тоталних протеза реалтивно чест случај [65]), смањен рефлекс кашљања, проблеме са гутањем или неадекватно одржавају оралну хигијену, стварају се услови који погодују колонизацији грам негативних пародонтопатогена.

Још један, можда и најзначајнији начин ширења оралних патогена у удаљена ткива и органе је бактеријемја. Узрочници болести потпорног ткива зуба налазе се у веома специфичној средини. Насељавају гингивални сулкус/пародонтални џеп, где су само танким зидом (дебљине 10 ћелија) одвојени од веома развијене мреже крвних судова [66]. Уколико дође до оштећења припојног епитела врло лаку доспевају у циркулацију, односно доводе до бактеријемје. Сматра се да је бактеријемја само пролазна, међутим скорашња изолација вијабилних ћелија *A. actinomycetemcomitans*-а и *P. gingivalis*-а у атеросклеротичном плаку пацијената [67] указује и на могућност трајнијег задржавања и опстајања бактерија у циркулацији. До продора микроорганизама у крвоток не долази само услед оштећења припојног епитела као последице присутне инфекције, већ се може јавити и током стоматолошких интервенција као и током редовног одржавања оралне хигијене самих пацијената. Подаци из литературе указују да до бактеријемје може доћи током екстракције зуба [68], уклањања чврстих и меких наслага са зуба [69], сондирања [69], уклањања конаца [70], препарација зуба [71], ендодонтске терапије [72], током ортодонтске терапије [73], али и током прања зуба [69], коришћењем зубног конца [74] па и жвакања [75]. Треба нагласити да је вероватноћа да до продора бактерија дође већа код особа код којих је већ присутан неки облик инфламације, него код пацијената без клиничких знакова болести [76].

Неким од претходно наведених путева дисеминације микроорганизми се могу наћи у удаљеним ткивима и испољити штетно дејство. Све су присутнији докази који имплицирају да бактерије усне дупље учествују у патогенези и одређеног броја системских болести попут бактеријског ендокардитиса [77-79], аспирационе пнеумоније (која код особа старије доби и код лежећих пацијената често има и леталан исход) [80-82], остеомијелитиса код деце и одраслих [83-85], кардиоваскуларних обољења (пре свега атеросклерозе) [86-90] па чак и карцинома [91-93].

### **3. Научна основа проблема**

Протетика је као специјалистичка грана грана стоматологије дуго сматрана искључиво куративном дисциплином и њена превентивна улога је остала занемарена. Зуби који носе фиксне надокнаде, њихова потпорна ткива, резидуални алвеоларни гребен и околна мека ткива морају бити здрави како би се обезбедила трајност зубне надокнаде. Свака стоматолошка надокнада мора да делује терапијски и превентивно, односно нема за циљ само да надокнади оно што је изгубљено већ и да заштити преостале структуре стоматогнатног система и спречи њихово даље пропадање [94, 95].

Успех терапије зубним надокнадама зависи од избора градивног материјала и дизајна надокнаде. Када су у питању фиксне зубне надокнаде посебно треба водити рачуна о томе да се не угрози здравље пацијента, да се максимално очува зубна супстанца јер се једном уклоњено зубно ткиво не може природно надокнадити, да се обезбеди добра ретенција и стабилизација зубне надокнаде што се постиже адекватним обликовањем ретенционог зуба водећи рачуна о паралелности проксималних површина и оклузогингивалној

димензији зуба и да се обезбеди оптимално рубно заптивање, односно адекватан однос руба зубне надокнаде и демаркације препарације. Металокерамичка зубна надокнада мора бити тако дизајнирана да интимно одговара патрљку збрушеног зуба. Такође, мора се водити рачуна о изгледу оклузалне површине и квржично-фисурни комплекс обликовати тако да се обезбеде одговарајући, тачкасти оклузални контакти и самим тим правилна дистрибуција мастикаторних сила. Потребно је адекватно измоделовати и висине контуре како би се добио одговарајући дефлексни бедем и тиме храна усмеравала од слободне гингиве [94, 96].

Израда комплексних парцијалних зубних протеза има за циљ естетску и функционалну рехабилитацију пацијената, али и низ превентивних улога. Потребно је да зубна надокнада очува вертикалну димензију оклузије и тиме обезбеди стабилан положај и функцију темпоромандибуларних зглобова, да успори процес ресорпције резидуалног алвеоларног гребена, заустави миграције, ротације, елонгације и инклинације преосталих зуба, да омогући бољу расподелу оклузалних сила и спречи промене у изгледу и самим тим допринесе психичком благостању пацијента [94, 97].

Мобилни део комбиноване фиксно мобилне надокнаде, односно парцијална скелетирана протеза мора бити дизајнирана тако да не доприноси акумулацији денталног плака. То подразумева да се велике спојнице у горњој вилици морају што више удаљити од слободне гингиве, а најмање 4-5мм, да горњу ивицу подјезичног лука треба удаљити најмање 3-4мм од слободне гингиве, да веза између велике спојнице и базе протезе буде под тупим углом као и да акрилатни и метални делови морају бити високо исполирани. Уколико се обавља коректура протезе неопходно је поновити процес полирања у лабораторији [95].

Када је у питању тотална зубна протеза она не само да треба да надокнади изгубљене зубе и потпорна ткива ресорбована у постекстракционом периоду већ и да рехабилитује функције оро-фацијалног система (жвакање, говор, гутање) као и да одговори естетским захтевима пацијента и поврати изглед какав је био у присуству природних зуба. Тоталне зубне протезе морају да испуњавају и одређене превентивне захтеве. Оне не смеју штетно деловати на ткива орофацијалног система, морају да спрече даље нарушавање интегритета потпорних ткива безубих вилица (кост, слузокожа и подслузокожно ткиво) као и структура темпоромандибуларних зглобова [94, 95].

Моделовање тоталних зубних протеза у воску мора бити што прецизније како би се што мање обрађивала након киветирања. Такође, моделоване површине морају да буду високо полиране, а делови протезе који имитирају гингиву тако обликовани да усмеравају храну од протезе. Вештачки зуби треба да буду одговарајућег облика и величине и адекватно постављени, чиме се елиминишу штетне хоризонталне силе, оптерећење на потпорна ткива се усмерава у вертикалном правцу, обезбеђује се правилна дистрибуција оклузалних сила и чува интегритет темпоромандибуларних зглобова [94].

Као што је већ наведено један од фактора који може да доведе до поремећаја равнотеже међу оралним бактеријама, и то променом услова локалне средине, је ношење зубних надокнада. Протетском рехабилитацијом успоставља се, односно обнавља нарушена функција и изглед орофацијалног система, побољшава квалитет живота пацијента што подразумева дуговечност и постојаност изабраног решења. Вишегодишње ношење зубних надокнада узрокује и потребу за анализом и проценом могућих ефеката како на структуре на које се надокнада ослања или у чијој близини се налази, тако и на удаљене системе и органе, односно на организам у целини. Један од могућих механизма

на основу кога зубне надокнаде могу штетно деловати по пацијента јесте и промена састава биофилма, односно фаворизација паропатогених бактерија. У комбинацији са лошом оралном хигијеном могу довести до озбиљног нарушавања општег здравља појединца [98-100].

Значај пародонталних патогена и потенцијални ефекти које на њих могу имати зубне надокнаде није остао незапажен. Још почетком шездесетих година 20. века *Bishop* је публикувао свој рад у коме покушава да установи везу између израде зубних надокнада и потенцијалних штетних ефекта на кардиоваскуларни систем [101]. Касније, све је већи број истраживача који су испитивали утицај фиксних и мобилних надокнада па периодонтално здравље и присуство патогених микроорганизама [102-105].

*Yasui* и *Tanaka* [106,107], као и бројни други аутори [108-111] бавили су се истраживањем састава биофилма код протетски рехабилитованих пацијената. Њихови резултати указују на присуство пародонталних патогена, како код носилаца тоталних протеза тако и код пацијената рехабилитованих фиксним зубним надокнадама. Микробиолошким (култура бактерија) као и методама молекуларне генетике (ланчанарација полимеразе) покушали су да дефинишу састав и карактеристике оралне микрофлоре код пацијената након стоматопротетске терапије. Међутим, у овим истраживањима, контролне групе чинили су испитаници са присутним природним зубима, те је поређење вршено између различитих особа, са различитим имунолошким и другим реакцијама. Сама промена до које надокнаде доводе, односно поређење присуства пре израде и након периода ношења надокнада код истог пацијента није била у центру пажње истраживача.

Могуће је да различито дизајниране надокнаде другачије делују на састав биофилма, а материјали различитог састава и особина отежавају или олакшавају колонизацију. Такође,

низак ниво одржавања оралне хигијене недвосмислено фаворизује размножавање патогених микроорганизама [112-116]. Вероватно да и неодговарајућа препротетска припрема пацијента условљава касније патолошке промене на потпорним ткивима што повећава и вероватноћу системског деловања бактерија. Међутим, да би се бавили овим питањима неопходно је прво установити да ли само присуство зубне надокнаде, независно од састава, дизајна и локализације, мења биофилм усне дупље и на који начин.



## **4. Циль**

Након прегледа и анализе доступне литературе дефинисана је радна хипотеза и постављени циљеви истраживања.

### **Радна хипотеза**

Присутне зубне надокнаде у усној дупљи могу довести до промене састава оралног биофилма и фаворизације паропатогених бактерија.

### **Основни циљ истраживања**

Утврдити везу између различитих врста зубних надокнада и присуства пародонтопатогених бактерија *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

### **Ближи циљеви истраживања**

1. Утврђивање клиничког статуса испитаника приликом прегледа
2. Утврђивање присуства паропатогених бактерија пре израде зубних надокнада код пацијената.
3. Утврђивање присуства паропатогених бактерија након периода ношења надокнаде од најмање 6 месеци.

### **У оквиру циљева истраживања дефинисани су следећи задаци:**

1. Прикупљање детаљних анамнестичких података учесника у студији и обављање детаљног стоматолошког клиничког прегледа.

2. Припрема пацијената за ношење будуће зубне надокнад и израда индиковане зубне надокнаде за сваког пацијента
3. Обављање клиничких мерења и прикупљање биолошког материјала пре предаје зубних надокнада.
4. Предаја зубне надокнаде пацијентима и обучавање пацијената како да на адекватан начин одржавају оралну хигијену
5. Обављање клиничких мерења и поновно прикупљање биолошког материјала након периода ношења надокнаде од најмање 6 месеци код истих пацијената.
6. Упоредивање налаза пре и након периода ношења зубних надокнада и утврђивање одговарајућих асоцијација.

## 5. Материјал и методе

Истраживање је дизајнирано као проспективна студија. У студији је учествовало 90 пацијената (51 мушкарац и 39 жена) старости од 27 до 81 година подељених у три групе по 30. Прву групу чинили су пацијенти (14 мушкараца и 16 жена) код којих је била индикована израда и горње и доње тоталне протезе, другу групу пацијенти (20 мушкараца и 10 жена) којима је била индикована израда једне метало-керамичке крунице, а трећу групу пацијенти (17 мушкараца и 13 жена) код којих је била потребна рехабилитација комбинованим фиксно-мобилним радом са прецизним везним елементима (кугличасти атечмени). Истраживање је спроведено у складу са Хелсиншком декларацијом и одобрено од стране Етичког комитета Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Изабрани субјекти истраживања су детаљно информисани о циљевима студије и поступцима који су спровођени током истраживања. Сваки испитаник имао је право да у било ком тренутку одустане од студије без икавих правних или било каквих других последица. Учесницима у студији је након свих неопходних објашњења тражен писмени пристанак за учешће у студији.

Критеријуми укључења у студију су се разликовали у зависности од групе услед специфичности везаних за успостављање индикације и израду надокнаде.

Код **прве групе** пацијената критеријуми за укључење у студију били су:

- индикована израда горње и доње тоталне протезе,
- пацијенти пре тога нису носили мобилне зубне надокнаде.

Код **друге групе** пацијената критеријуми за укључење у студију били су:

- индикована израда једне метало-керамичке круне,

- изабрани зуб, пре успостављања индикације, није носио ниједну фиксну зубну надокнаду,
- зуб је виталан и остало је довољно зубне супстанце да се круница може изградити без потребе за надоградњом.

Код **треће групе** пацијената критеријуми за укључење у студију били би:

- присуство скраћеног зубног низа и индикација за израду комбинованог фиксно-мобилног рада са кугличастим атечменима на ретенционом зубу/зубима,
- пацијенти раније нису носили мобилне зубне надокнаде,
- изабрани ретенциони зуб, пре успостављања индикације, није носио ниједну фиксну зубну надокнаду,
- ретенциони зуб је виталан и остало је довољно зубне супстанце да се круница може изградити без потребе за надоградњом.

Критеријуми за искључење из студије били су заједнички за све три групе пацијената:

- пацијенти са хроничним стањима и обољењима због којих, као и због могуће тих терапије, може доћи до компромитованог имуног одговора,
- пацијенти са бруксизмом код којих може доћи до механичког оштећења пародонталних ткива,
- пацијенти са менталном ретардацијом,
- пацијенти са болестима зависности.

## 5.1 Клиничка испитивања

Након укључења у студију пацијентима је урађен детаљан стоматолошки преглед. Где је за тим било потребе обављена је конзервативна и хируршка припрема пре саме израде надокнаде (уклањање меких и чврстих наслага са зуба, обрада присутних пародонталних џепова, санација каријесних лезија и неопходне екстракције). Након припреме пацијента приступило се израдииндикованих зубних надокнада за сваког пацијента посебно.Преглед, постављање дијагнозе и израду зубне надокнаде обавио је аутор студије. Непосредно пре предаје дефинитивног рада обављеноје узорковање.

Код прве групе пацијената узорак за анализу узиман је стерилним сетом за узимање бриса са слузокоже горњег резидуалног алвеоларног гребена у пределу *tuber-a processus alveolaris-a maxillae*(Слика 7).Памучном ватом на крају дрвеног штапића прелазило се преко слузокоже у смеру напред-назад 10 пута уз истовремену ротацију. Брисеви су остављани отворени на собној температури 15 минута како би се осушили и тиме спречила појава буђи и компромитовање узорка. Након тога брисеви су затварани и чувани на температури од  $-20^{\circ}\text{C}$  до процеса изолације ДНК.



Слика 7 - Узимање бриса са слузокоже горњег резидуалног алвеоларног гребена



Слика 8 - Узимање узорка папирним поеном из гингивалног сулкуса/цепа

Код друге групе пацијената узорковање је обављено папирним поенима, пажљивом апликацијом у сулкус/породонтални џеп зуба индикованог за метало-керамичку круну односно ретенционог зуба комплексне протезе, до првог знака отпора (Слика 8). Папирни поен је тако остављен 20 секунди након чега је уклоњен. Папирни поени су стављани у стерилне *Eppendorf* тубе (Исманинг, Немачка) и чувани на температури од  $-20^{\circ}\text{C}$  до процеса изолације ДНК.

Након предаје одговарајућег протетског рада пацијенти су адекватно информисани и обучени о начинима правилног одржавања оралне хигијене. Пацијентима друге и треће групе објашњено је и како да на одговарајући начин одлажу и чувају своје протезе током ноћи. Пацијенти су долазили на прегледе једном недељно када им је, уз помоћ таблета за



пребојавање плака, процењиван ниво оралне хигијене, и уколико је било потребно поново су мотивисани и обучавани (Слика 9).



Слика 9 - Наслаге на тоталним зубним протезама видљиве уз помоћ таблета за пребојавање плака

Контролни прегледи су понављани док год није постигнут адекватан резултат. Сви пацијенти су достигли жељени ниво оралне хигијене у првих месец дана ношења надокнада. Након опсервационог периода од најмање 6 месеци пацијенти су поново дошли како би им узели други узорак на исти начин као и пре предаје рада.

Обављена је и процена стања потпорних ткива зуба код пацијената друге и треће групе од стране аутора и то применом:

- гингивалног индекса по *Löe-Silnessu* помоћу кога је оцењивано да ли је гингива здрава или инфламирана уз истовремено утврђивање интензитета присутног запаљења. Испитивање се изводило са све четири стране зуба: букодисталне, букалне, букомезиалне и оралне стране. Додељиване су бројчане вредности које одговарају степену инфламације

гингиве и то на следећи начин: 0 - здрава гингива, 1 - блага инфламација, 2 - умерена инфламација и 3 - јака инфламација.

- Индекса крварења гингиве, где је регистровано крварење гингиве провоцирано пародонталном сондом. Сондиран је прво дистални, а затим и мезијални део гингивалног сулкуса и то од базе папиле, па све до њеног врха. Појава, односно интезитет крварења је бодован на следећи начин: 0 - нема крварења након сондирања, 1 - после сондирања, крварење се јавља само на једном месту и то у виду тачке, 2 - присутно је крварење у виду линије дуж ивице гингиве, 3 - непосредно након сондирања, интердентални простор се пуни крвљу (капљасто крварење) и 4 - одмах по сондирању јавља се профузно крварење, а крв се прелива ван гингивалног сулкуса и из интерденталног простора.

- Мерењем нивоа припојног епитела, који је утврђиван мерењем растојања од цементноглеђне границе до места где се пародонтална сонда утиснута у пародонтални цеп под лаким притиском зауставила. Ниво припојног епитела је изражен у дужним милиметрима. Сондирање је вршено у шест тачака на сваком зубу и то букомезијални брид, средина букалне површине, букодистални брид, оралномезијални брид, средина оралне површине и оралнодистални брид[25].

Процена стања потпорног ткива зуба је обављена како током иницијалног узимања узорака тако и након предвиђеног опсервационог периода.

## **5.2 Молекуларно-генетичка испитивања**

Молекуларно-генетичка испитивања подразумевала су изолацију бактеријске ДНК, умножавање одређене секвенце гена путем ланчане реакције полимеразе и визуализацију резултата реакције уз помоћ полиакриламидне гел електофорезе.

### 5.2.1 Изолација бактеријске ДНК

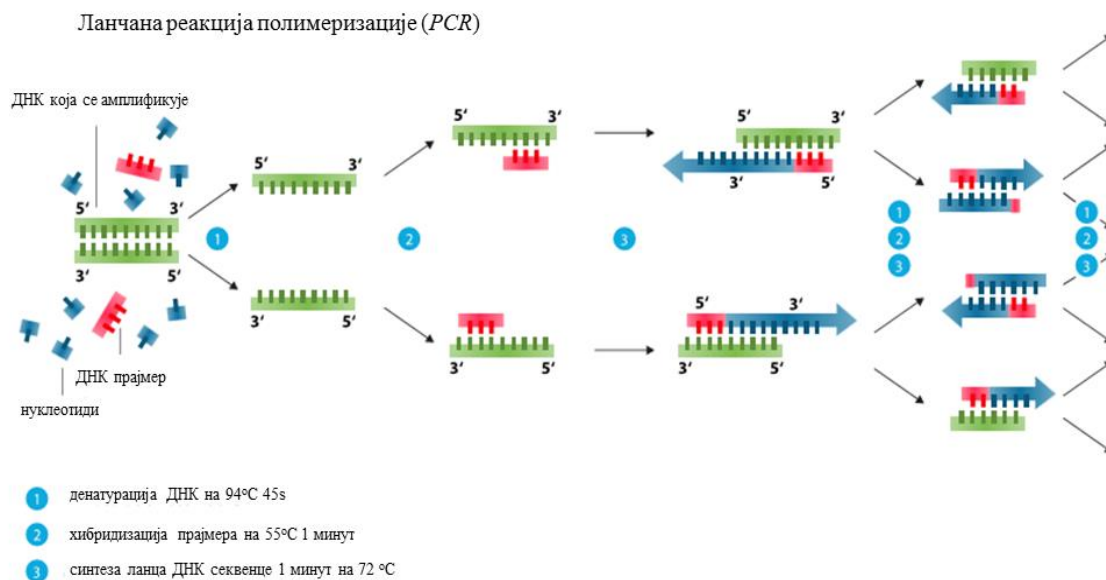
Код прве групе пацијената, пре него што се приступило изолацији, памучна вата са сета за узимање бриса која је садржала генетски материјал, одвојена је маказицама и стављена у *Eppendorf* тубе (Исманинг, Немачка) запремине 1.5 ml. Узорци друге и треће групе пацијената, узимани папирним поенима, директно су стављани у тубе исте запремине. У сваку од туба додато је 300µl 50mM раствора NaOH (добијеног растварањем 2 грама натријум-хидроксида у једном литру дестиловане воде). Тубе су затворене, наслоњене на вортекс апарат и мућкане у трајању од 10 секунди. Узорци су потом стављени у термомиксер, на температуру од 95°C током 5 минута. Након тога памучна вата, односно папирни поени, су извађени из туба и одбачени. У сваки узорак додавано је 30 микролитара 1M раствора Tris HCl, pH 8, тубе су стављене у центрифугу, подешену на 13000 обртаја у минуту у трајању од 120 секунди. Добијени супернатант, који је садржао евентуално присутну бактеријску ДНК, коришћен је за *PCR (polymerase chain reaction)* анализу.

### 5.2.2 Ланчана реакција полимеразе (енгл. *polymerase chain reaction - PCR*)

Ланчана реакција полимеразе је метода која се користи у молекуларној биологији у циљу вишеструког умножавања једног или неколико ланаца ДНК и добијања великог броја копија одређене секвенце гена (мерених у стотинама хиљада или милионима) [117]. *PCR* је данас уобичајена и, често, незаменљива метода која је своју примену нашла у великом броју медицинских и биолошких истраживања као и у свакодневной пракси. Може се користити за умножавање ДНК ради секвенцирања, функционалну анализу гена, дијагностику наследних обољења, одређивање генетских маркера (које се користи у

форензичкој медицини или за утврђивање очинства), као и за идентификацију узрочника различитих инфекција [118-120].

Ланчана реакција полимеразе представља у ствари симулацију ДНК репликације у лабораторијским условима (*in vitro*) помоћу термостабилне полимеразе. Најчешће коришћени ензим је *Taq* полимеразе, добијена изолацијом из бактерије *Thermus aquaticus*. Осим ензима неходног за умножавање ланца ДНК (по коме је и метода добила назив) за успешну реакцију потребни су и специфични прајмери. Они садрже секвенце комплементарне региону нуклеинске киселине који желимо да умножимо и омогућавају специфичност и селективност реакције. Прајмери се „хибридују“ за специфичне секвенце ДНК по принципу комплементарности и ограничавају жељени продукт који касније бива умножаван. Како *PCR* анализа напредује новостворени ланци ДНК и сами постају шаблони за репликацију, чиме се количина амплификата експоненцијално умножава (Слика 10).



Слика 10 - Шематски приказ *PCR* реакције

Да би реакција *PCR*-а била могућа неопходно је у раствор, осим полимеразе и прајмера, додати и нуклеотиде (од којих ће бити изграђене копије циљне секвенце ДНК), као и одређена хемијска једињења која стварају оптималне услове за амплификацију (пуфер, магнезијум -хлорид).

За потребе овог истраживања, након изолације ДНК, у *Eppendorf* тубе додавани су 1X *PCR* пуфер (МВІ Fermentas, Литванија), 1.5 mM раствор  $MgCl_2$ , 0.2 mM раствор dNTPs (нуклеотиди), 0.375  $\mu$ M прајмера и једна јединица *Taq* полимеразе (МВІ Fermentas, Литванија) као и 5  $\mu$ l супернатанта добијеног процесом изолације. Укупна запремина раствора припремљеног за анализу износила је 25  $\mu$ l за сваки узорак. Амплификација је обављена у *PCR* апарату *PeqStar*, *PeqLab*, Ерланген, Немачка.

Умножавање секвенце ДНК одигравало се кроз три фазе:

1. Активација полимеразе - *Taq* полимеразе коришћена у експерименту је заштићена ензимом. Како би се активирала неопходно је било загрејати раствор на 95°C у трајању од 3 минута. Такође, овај корак омогућава и иницијалну денатурацију ДНК молекула, ради олакшавања наредних корака.

2. Након активације следило је 35 циклуса који су подразумевали

- денатурацију ДНК на 94°C у трајању од 45 секунди,

- хибридизацију прајмера 1 минут на 55°C,

- синтезу (екстензија) ланца ДНК 1 минут на 72°C.

3. *PCR* анализа узорака у апарату завршавана је финалном екстензијом ланца на температури од 72°C у трајању од 5 минута.

Уз сваку групу узорака анализираних у *PCR* апарату укључивана је позитивна и негативна контрола. Код негативних контролних узорака уместо изолованог ДНК додавана је иста запремина дестиловане воде, док је позитивна контрола подразумевала додавање изоловане ДНК референтних сојева за сваки микроорганизам. Секвенце прајмера коришћених за анализу приказане су у табели 1.

Табела 1 - Секвенце прајмера, температура хибридизације и дужина производа *PCR* реакције

прајмер	бактерија	дужина (бп)	секвенце прајмера	температура хибридизације
<b>PGF</b>	<i>P. gingivalis</i>	400	5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3'	55°C
<b>PGR</b>			5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'	
<b>AAF</b>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	500	5'-GCTAATACCGCGTAGAGTCGG-3'	55°C
<b>AAR</b>			5'-ATTTACACCTCACTTAAAGGT-3'	
<b>PrevoF</b>	<i>P. intermedia</i>	259	5'-CGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA-3'	55°C
<b>PrevoR</b>			5'-CCGCTTTACTCCCAACAAA-3'	
<b>TanF</b>	<i>T. forsythia</i>	600	5'-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3'	55°C
<b>TanR</b>			5'-TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3'	
<b>TDF</b>	<i>T. denticola</i>	316	5'-TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT-3'	55°C
<b>TDR</b>			5'-TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA-3'	
<b>FusoF</b>	<i>F. nucleatum</i>	1000	5'-ATTGTGGCTAAAAATTATAGT-3'	55°C
<b>FusoR</b>			5'-ACCCTCACTTTGAGGATTATA-3'	

Успешност ланчане реакције полимеразе, односно утврђивање присуства бактеријске ДНК, проверавана је вертикалном гел електрофорезом на полиакриламидном гелу.

### **5.2.3 Полиакриламидна гел електрофореза (енгл. *polyacrilamide gel electrophoresis - PAGE*)**

Гел електрофореза је метод сепарације и анализе макромолекула и њихових продуката заснован на разлици у величини и наелектрисању. Различитита величина молекула (утиче на брзину кретања), просторни распоред и количина наелектрисања (одређује смер кретања) утичу на њихову неједнаку покретљивост кроз гел. ДНК молекул поседује велики број фосфатних група које су у физиолошким условима (рН 7.4) јонизоване што цело молекул чини негативно наелектрисаним и током електрофорезе усмереним од негативне електроде (катоде) ка аноди ( позитивној електроди).

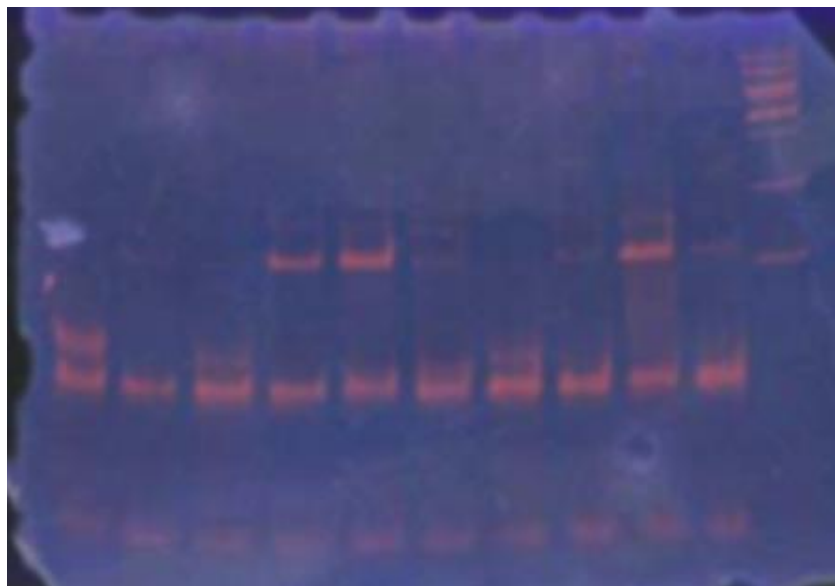
Услед релативно велике брзине процеса и захваљујући одличној могућности приказивања резултата *PAGE* је данас стандард када је визуализација резултата реакције ланчане полимеризације у питању.

Полимеризацијом мономера акриламида добијају се дугачки ланци полимера где бис-акриламид формира попречне везе, те се на тај начин добија структура налик мрежи. Као иницијатори и катализатори полимеризације акриламида додају се амонијум персулфат (*APS*) и  $N, N, N', N'$ -тетраметилетилендиамин (*TEMED*). Односи запремина компонентиполиакриламидног гела приказанису у табели 2.

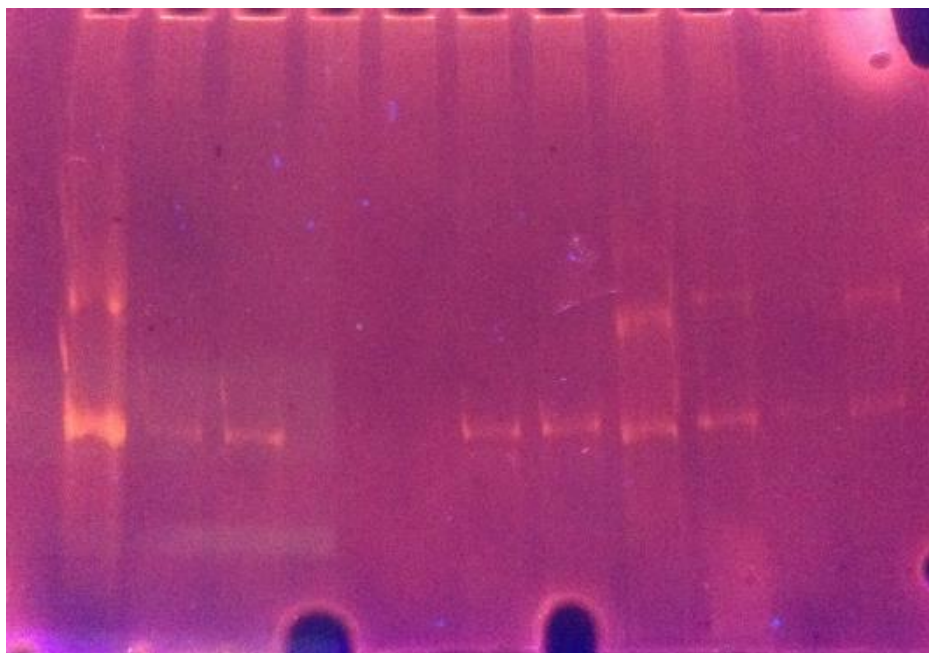
Табела 2 - 8% полиакриламидни гел

ddH <sub>2</sub> O	3,96 mL
5 x TBE puffer	1,3 mL
Akrilamid / bis-akrilamid (40 %)	1,3 mL
APS (10 %)	45 µL
TEMED	8,4 µL

Електрофореза се одвијала у 1 x *TBE* пуферу при константном напону струје од 220V у трајању од 60 минута. Након завршене електрофорезе гелови су потапани у водени раствор етидијум-бромида, који се умеће између ланаца ДНК и омогућава визуализацију резултата на УВ трансилуминатору, у виду светлећих трака (Слика 11 и 12) .







Слике 11 и 12 - визуелизација *PCR* продукта на полиакриламидном гелу

### 5.3 Статистичка анализа

Добијени подаци су анализирани коришћењем компјутерског статистичког софтвера *SPSS* верзија 17.0, *SPSS Inc*, Чикаго, Илиноис, САД). МекНемар-ов (*McNemar*) тест је коришћен за поређење присуства бактерија пре и након периода ношења надокнаде за исту групу испитаника, док је Хи квадрат (*Chi-Square*,  $\chi^2$ ) тест коришћен за поређење резултата између група. За поређење података везаних за гингивални индекс, индекс крварења гингиве и ниво епителног припојаунутар група, у зависности од расподеле података (нормална или различита од нормалне што је утврђивано Колгоморов-Смирноф(*Kolmogorov-Smirnov*) тестом) коришћен је *t*-тест за парове (*Paired-Samples t-test*) и Вилкоксонов (*Wilcoxon*) тест, док су *t*-тест за независне узорке (*Independent-Samples t-test*) и Ман-Витнијев (*Mann-Whitney U*) тест коришћени за поређење вредности ових резултата између група. Дескриптивна статистика је приказана као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација.

## **6. Резултати истраживања**

Клиничко-лабораторијско истраживање је завршено након периода од три године. Сви испитаници су успешно испунили задатке предвиђене студијом и комплетирали је. Просечна старост свих испитаника износила је 57 година (СД ± 14); просечна старост као и заступљеност полова по групама приказана је у табели 3.

Табела 3 - Дистрибуција испитаника према полу и старости

Опште карактеристике		Група 1	Група 2	Група 3
<b>Број испитаника (N)</b>		30	30	30
<b>Старост</b>		70±5	43±13	57±6
<b>Пол</b>	<b>Мушки</b>	46.67%	66.67%	56.67%
	<b>Женски</b>	53.33%	33.33%	43.33%

Средње вредности гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и нивоа епителног припоја за другу и трећу групу испитаника пре предаје зубне надокнаде приказане су у табели 4.

Табела4 - Вредности гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и нивоа припојног епитела препредаје зубне надокнаде

Група	Гингивални индекс	Индекс крварења гингиве	Ниво припојног епитела (мм)
<b>2</b>	0.41±0.01	0.14±0.01	1.10±0.10
<b>3</b>	0.66±0.30	0.27±0.14	1.28±0.17

Средње вредности гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и нивоа епителног припоја за другу и трећу групу испитаника након периода ношења зубне надокнаде приказане су у табели 5.

Табела 5 - Вредности гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и нивоа припојног епитела након периода ношења зубне надокнаде

Група	Гингивални индекс	Индекс крварења гингиве	Ниво припојног епитела
2	0.43±0.01	0.16±0.10	1.11±0.13
3	1.01±0.33	0.51±0.29	1.23±0.16

*P* вредност, као и тестови коришћени за утврђивање статистичке значајности разлика у вредностима гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и нивоа епителног припоја пре и након периода ношења надокнаде унутар група приказане су у табели 6.

Табела 6 - Статистичка значајност вредности гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и нивоа епителног припоја пре и након периода ношења надокнаде унутар група

Група	Гингивални индекс	Индекс крварења гингиве	Ниво припојног епитела
2	$p=0.08$ (т-тест за парове)	$p=0.09$ (т-тест за парове)	$p=0.32$ (Вилкоксон тест)
3	$p=0.006$ (т-тест за парове)	$p=0.001$ (Вилкоксон тест)	$p=0.001$ (т-тест за парове)

*P* вредност, као и тестови коришћени за утврђивање статистичке значајности разлика у вредностима гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и нивоа епителног припоја пре и након периода ношења надокнаде између група приказане су у табели 7.

Табела 7 -Статистичка значајност вредности гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и нивоа епителног припоја пре и након периода ношења надокнаде између група

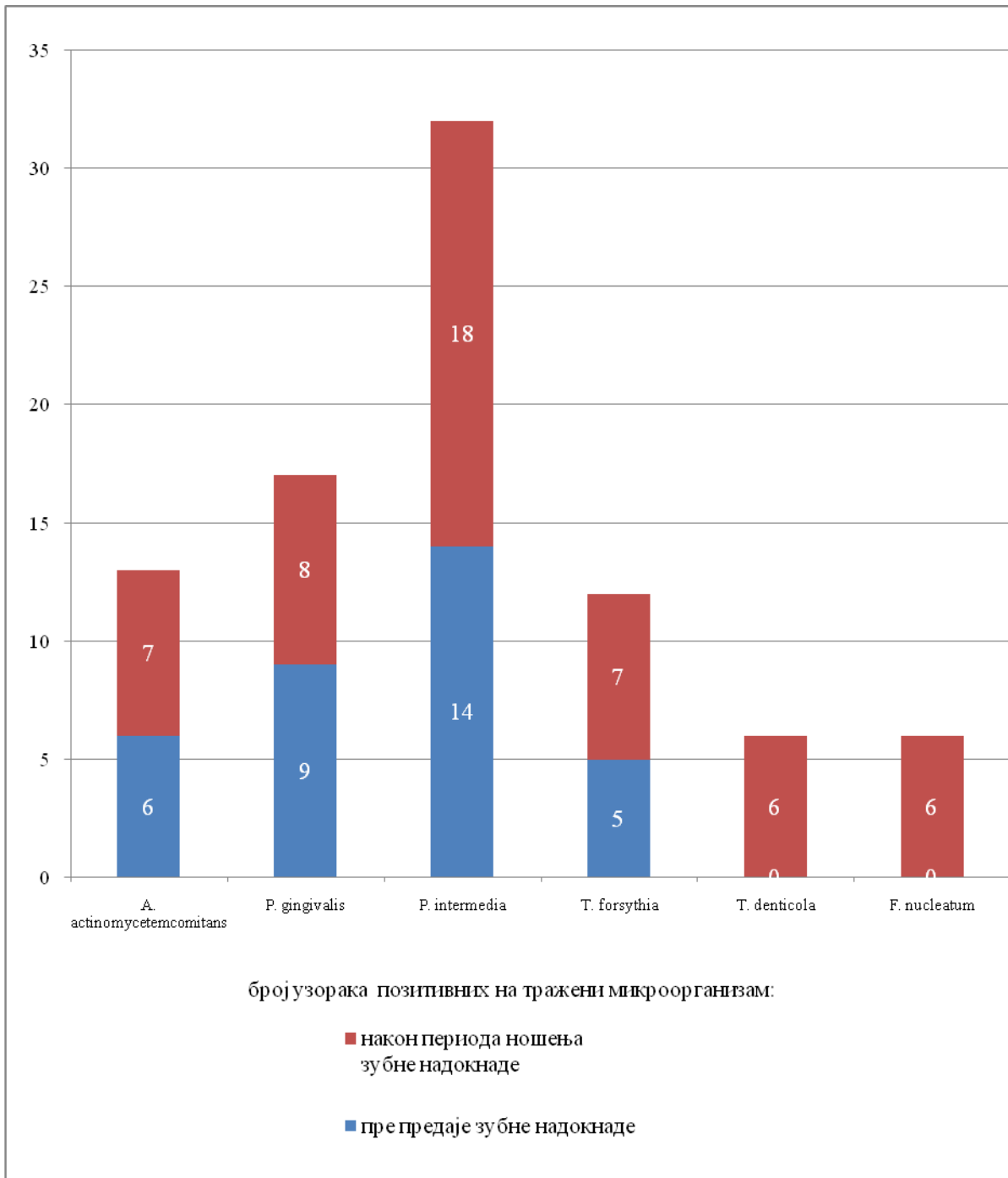
Пародонтални индекси	Пре предаје зубне надокнаде	Након периода ношења
<b>Гингивални индекс</b>	<b><i>p</i>=0.002</b> (Ман-Витнијев тест)	<b><i>p</i>=0.000</b> (Ман-Витнијев тест)
<b>Индекс крварења гингиве</b>	<b><i>p</i>=0.000</b> (т-тест за независне узорке)	<b><i>p</i>=0.000</b> (Ман-Витнијев тест)
<b>Ниво припојног епитела</b>	<b><i>p</i>=0.000</b> (Ман-Витнијев тест)	<b><i>p</i>=0.000</b> (Ман-Витнијев тест)

Заступљеност пародонтопатогених бактерија, односно проценат узорака код којих је сваки од тражених микроорганизама идентификован, непосредно пре предаје одговарајуће зубне надокнаде код све три групе пацијената приказана је у табели 8.

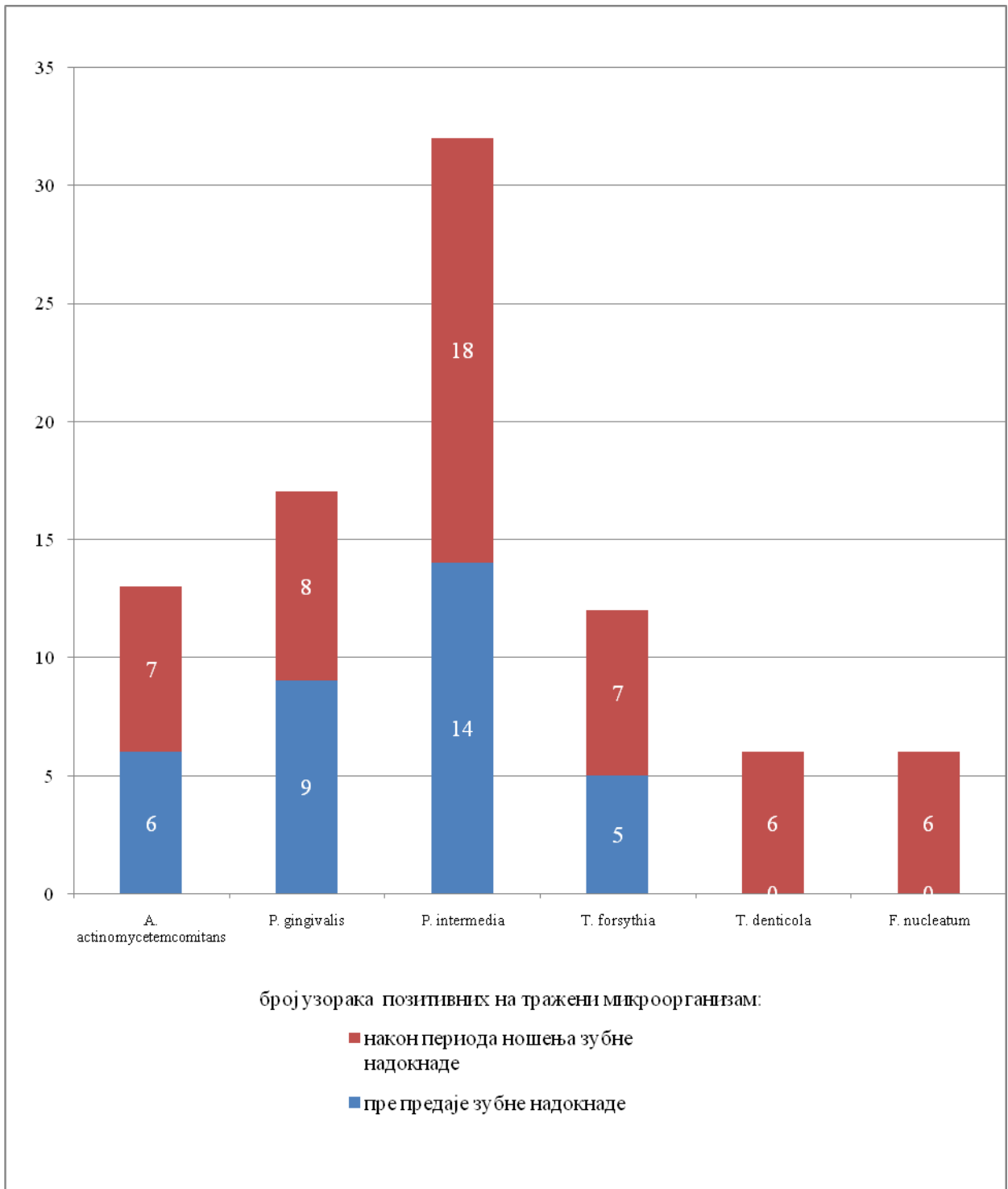
Табела 8 - Иницијална дистрибуција пародонталних патогена по групама (%)

Пародонтопатогене бактерија	Група 1	Група 2	Група 3
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	6.67%	30.00%	20.00%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	20.00%	30.00%	30.00%
<i>Prevotella intermedia</i>	30.00%	40.00%	46.67%
<i>Tannerella forsythia</i>	6.67%	16.67%	6.67%
<i>Treponema denticola</i>	13.33%	16.67%	0%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3.33%	3.33%	0%

Заступљеност пародонтопатогених бактерија пре предаје зубне надокнаде и након периода ношења од најмање шест месеци код прве, друге и треће групе испитаника приказана је на сликама 13, 14 и 15.

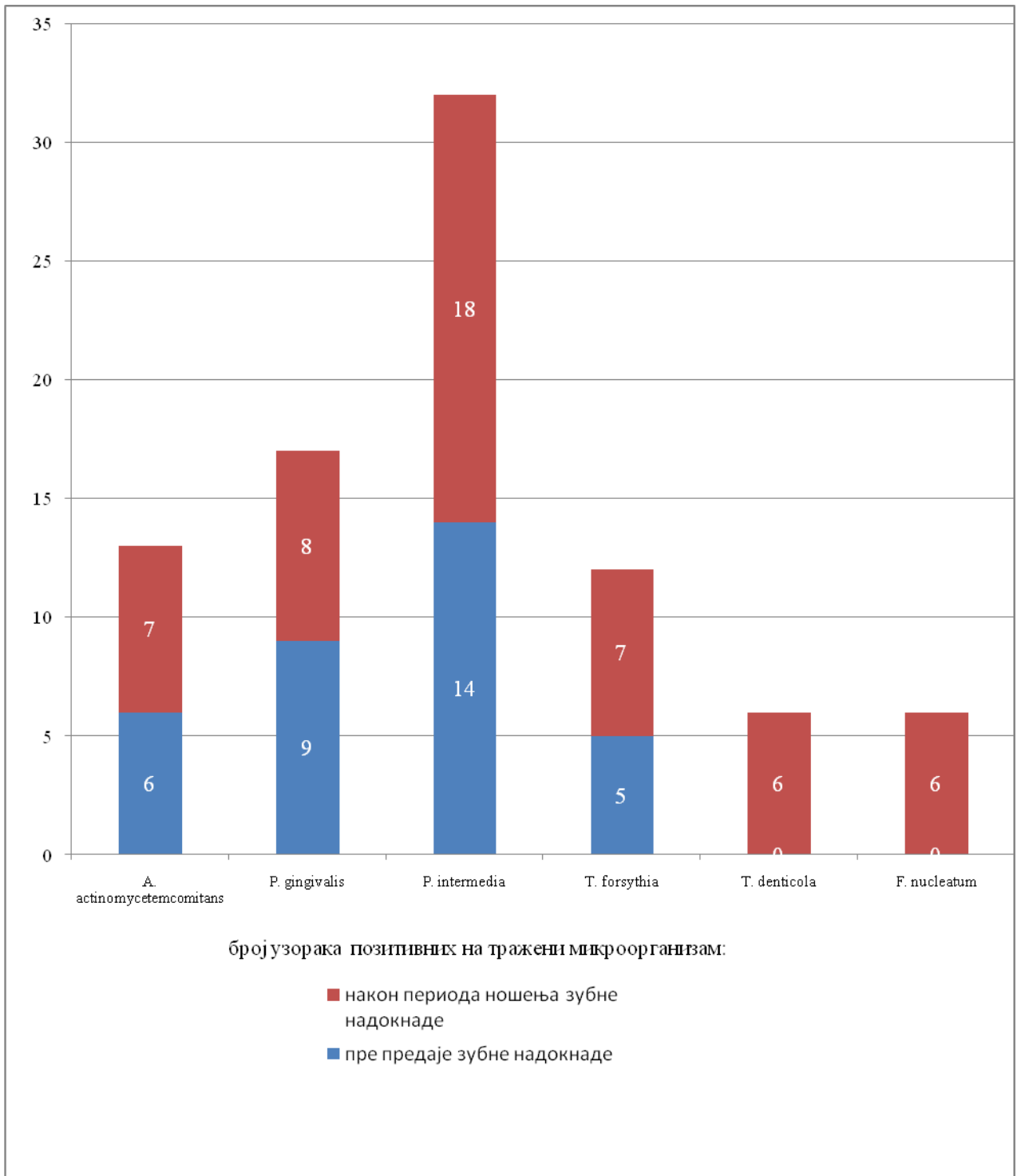


Слика 13 - Заступљеност пародонтопатогених бактерија пре и након терапије код прве групе испитаника



Слика 14 - Заступљеност пародонтопатогених бактерија пре и након терапије код друге групе испитаника





Слика 15 - Заступљеност пародонтопатогених бактерија пре и након терапије код друге групе испитаника

У табелама 9, 10и 11 приказане су *p* вредности добијене поређењем заступљености пародонтопатогених бактерија пре предаје надокнаде и након периода ношења коришћењем *McNemar*-овог теста за прву, другу и трећу групу испитаника.

Табела9 - Утицај ношења зубних надокнада на присуство пародонтопатогених бактерија код прве групе испитаника

пародонтопатогене бактерије	преваленца бактерија		статистичка значајност ( <i>p</i> вредности)
	пре предаје	након периода	
	зубних надокнада	ношења надокнада	
	N (%)	N (%)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2 (6.67)	12 (40.00)	<b>0.006</b>
<i>P. gingivalis</i>	6 (20.00)	13 (43.33)	0.065
<i>P. intermedia</i>	9 (30.00)	22 (73.33)	<b>0.004</b>
<i>T. forsythia</i>	2 (6.67)	9 (30.00)	<b>0.004</b>
<i>T. denticola</i>	4 (13.33)	8 (26.67)	0.344
<i>F. nucleatum</i>	1 (3.33)	3 (10.00)	0.500

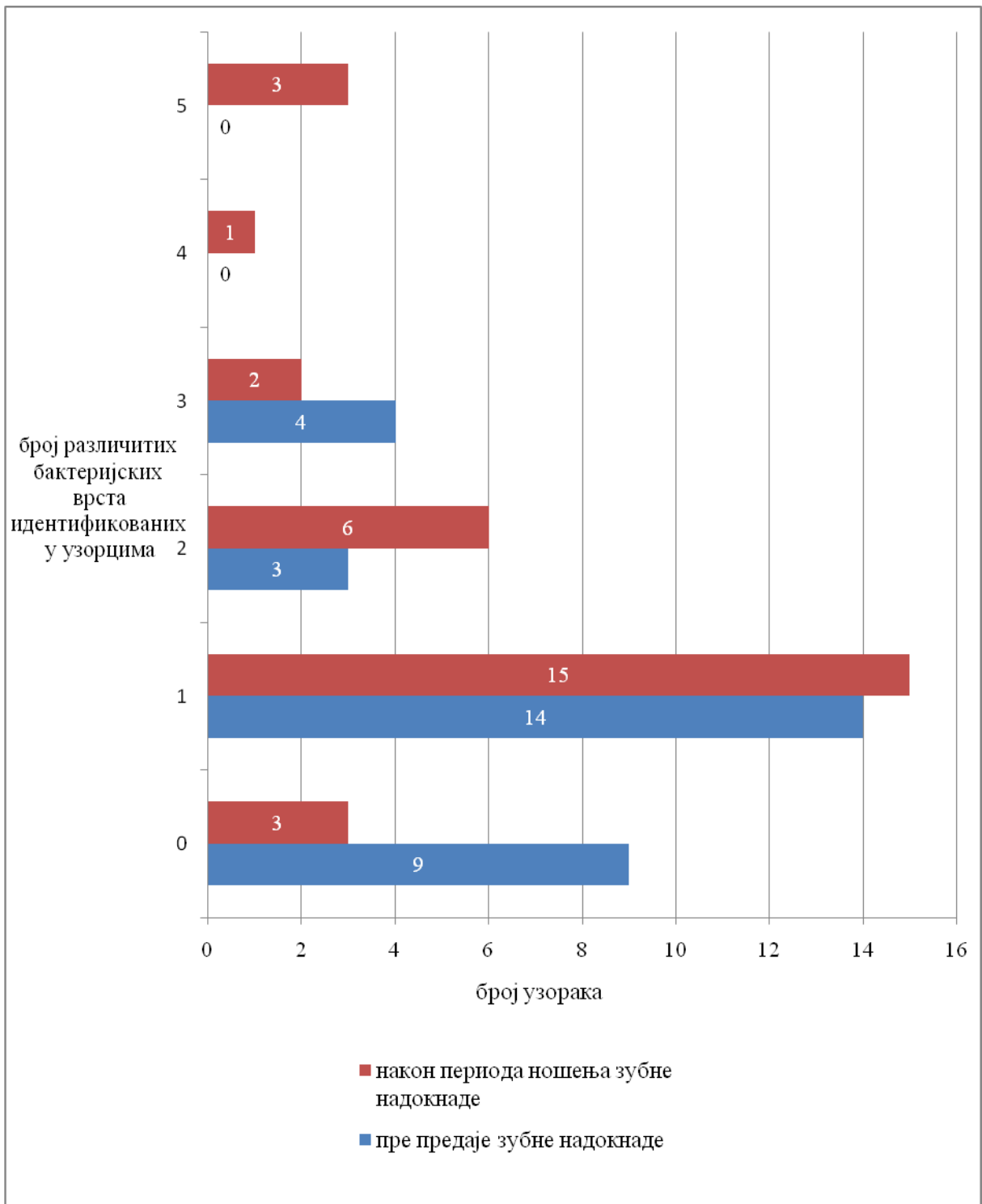
Табела 10 - Утицај ношења зубних надокнада на присуство пародонтопатогених бактерија код друге групе испитаника

пародонтопатогене бактерије	преваленца бактерија		статистичка значајност ( <i>p</i> вредности)
	пре предаје	након периода	
	зубних надокнада	ношења надокнада	
	N (%)	N (%)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	9 (30.00)	7 (23.33)	0.774
<i>P. gingivalis</i>	9 (30.00)	14 (46.67)	0.302
<i>P. intermedia</i>	12 (40.00)	21 (70.00)	<b>0.004</b>
<i>T. forsythia</i>	5 (16.67)	11 (36.67)	0.146
<i>T. denticola</i>	5 (16.67)	5 (16.67)	1.000
<i>F. nucleatum</i>	1 (3.33)	4 (13.33)	0.375

Табела 11 - Утицај ношења зубних надокнада на присуство пародонтопатогених бактерија код треће групе испитаника

пародонтопатогене бактерије	преваленца бактерија		статистичка значајност ( <i>p</i> вредности)
	пре предаје	након периода	
	зубних надокнада	ношења надокнада	
	N (%)	N (%)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	6 (20.00)	7 (23.33)	1.000
<i>P. gingivalis</i>	9 (30.00)	8 (26.67)	1.000
<i>P. intermedia</i>	14(46.67)	18 (60.00)	0.388
<i>T. forsythia</i>	2 (6.67)	7 (23.33)	0.125
<i>T. denticola</i>	0 (0)	6 (20.00)	<b>0.031</b>
<i>F. nucleatum</i>	0 (0)	6 (20.00)	<b>0.031</b>

Код прве групе испитаника број различитих бактеријских врста изолованих у појединачним узорцима пре предаје зубне надокнаде (тоталних зубних протеза) варирао је од 0 до 3, док је након периода ношења од најмање шест месеци тај распон износио од 0 до 5 (слика 16).

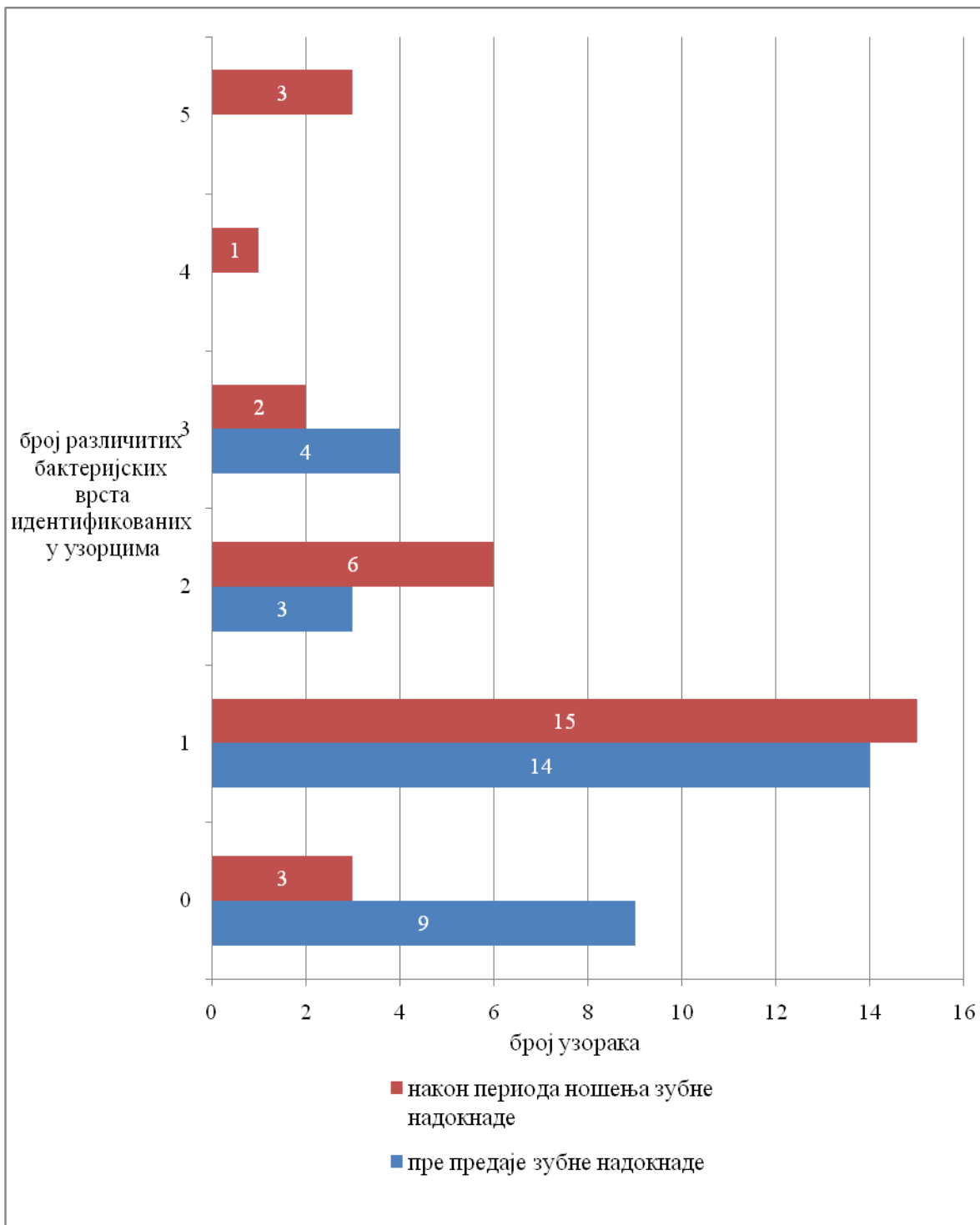


Слика 16 - број различитих врста бактерија идентификованих у узорцима испитаника прве групе

Број узорака код којих је идентификовано више од једне врсте пародонтопатогених бактерија пре предаје зубне надокнаде код прве групе испитаника износио је 5, док је након шестомесечног периода ношења број узорака где је идентификовано 2 и више различитих врста микроорганизама скочио на 20.

Примећена је и одређена тенденција ка удруживању бактерија, односно ка њиховој међусобној повезаности. Тако су, након периода ношења тоталних зубних протеза, у 12 узорака заједно нађени *A. actinomycetemcomitans* и *P. intermedia*, *P. intermedia* и *T. forsythia* у 11 и *P. intermedia* и *P. gingivalis* такође у 11 узорака. Остале „комбинације“ патогених бактерија биле су знатно ређе.

Код друге групе испитаника број различитих бактеријских врста изолованих у појединачним узорцима пре предаје зубне надокнаде (једне метало-керамичке круне) варирао је од 0 до 5, док је након периода ношења од најмање шест месеци тај распон остао исти (од 0 до 5) (слика 17).



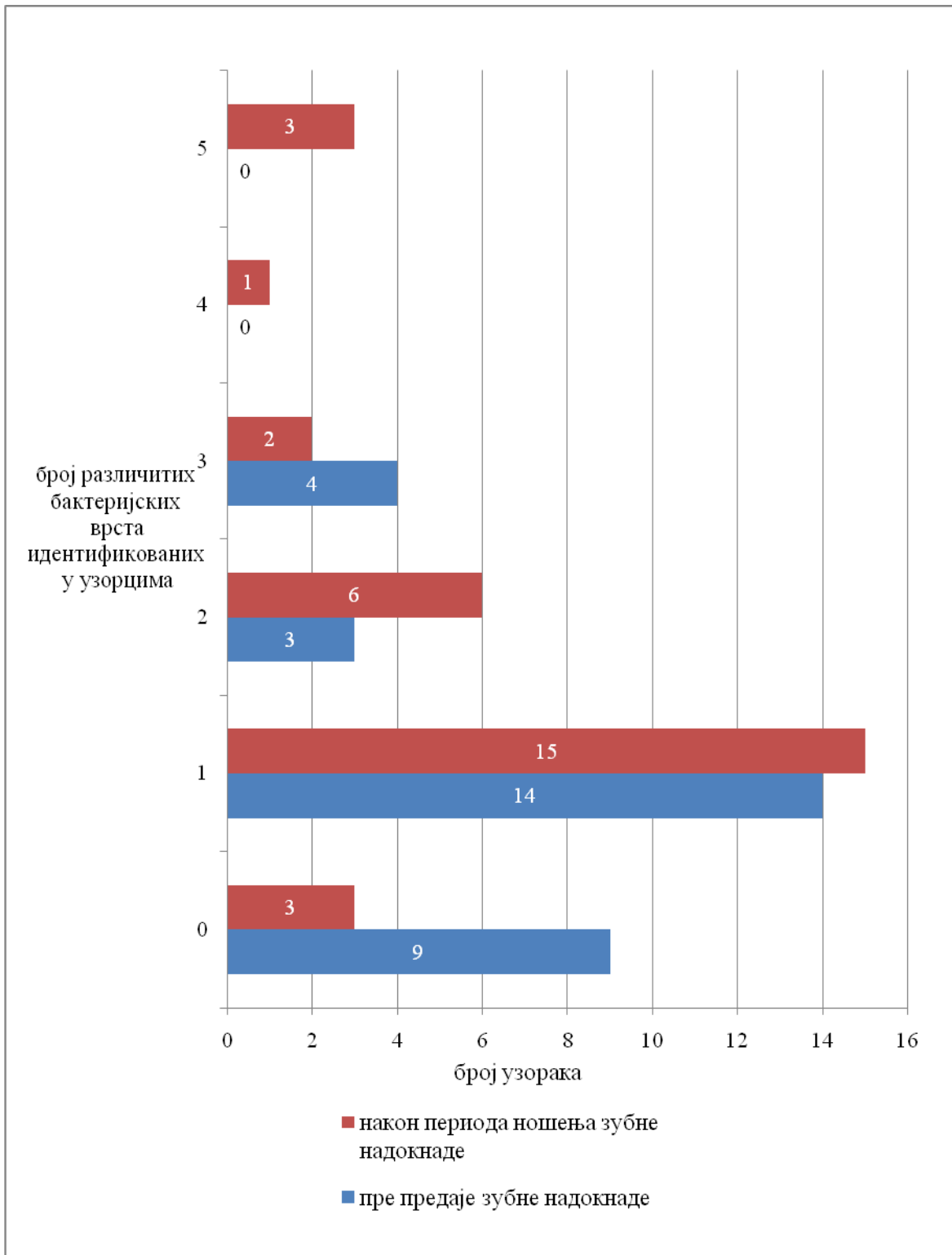
Слика 17 - број различитих врста бактерија идентификованих у узорцима испитаника прве групе

Број узорака код којих је идентификовано више од једне врсте пародонтопатогених бактерија пре предаје зубне надокнаде код друге групе испитаника износио је 10, док је након шестомесечног периода ношења број узорака где је идентификовано 2 и више различитих врста микроорганизама скочио на 21.

И у узорцима друге групе испитаника неки од циљаних микроорганизама су се чешће налазили заједно. Тако су, након 6 месеци од предаје металокерамичких круна, *P. intermedia* и *P. gingivalis* идентификовани у 10 узорака, *P. intermedia* и *T. forsythia* у 9, *P. gingivalis* и *F. nucleatum* у 4 узорка као и *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*. Остале „комбинације“ патогених бактерија биле су знатно ређе.

Код треће групе испитаника број различитих бактеријских врста изолованих у појединачним узорцима пре предаје зубне надокнаде (комбинованог фиксно-мобилног рада) варирао је од 0 до 3, док је након периода ношења од најмање шест месеци тај распон остао износио од 0 до 5 (слика 18).





Слика 18 - број различитих врста бактерија идентификованих у узорцима испитаника треће групе

Број узорака код којих је идентификовано више од једне врсте пародонтопатогених бактерија пре предаје зубне надокнаде код треће групе испитаника износио је 7, док је након шестомесечног периода ношења број узорака где је идентификовано 2 и више различитих врста микроорганизама износио 12.

Као и код прве две групе испитаника, и код треће је уочена одређена тенденција ка удруживању бактерија. Шест месеци након предаје комбинованог фиксно-мобилног рада *P. intermedia* и *P. gingivalis* су заједно идентификовани у 5 узорака, *P. intermedia* и *T. forsythia* такође у 5, *F. nucleatum* и *T. denticola* у три, као и *P. intermedia*, *T. forsythia* и *F. nucleatum*.

Поређењем резултата између група није нађена статистички значајна разлика у преваленцији бактерија, како пре, тако и након периода ношења надокнаде.

## 7. Дискусија

Резултати истраживања показују изражену тенденцију ка повећању присуства пародонтопатогених бактерија код све три групе испитаника. Анализом узорака прикупљених од пацијената утврђено је повећано присуство свих тражених микроорганизама осим у три случаја (табеле 10 и 11) када је њихово присуство остало непромењено. Као што је раније наведено, пародонтопатогени микроорганизми су доведени у везу са великим бројем системских, оралних и интрахоспиталних обољења [15-17, 75-93, 98-104, 121, 122] и свака промена која доводи до стварања услова који фаворизују њихово размножавање треба бити озбиљно схваћена.

Резултати истраживања показују да је *P. intermedia* имала највећу преваленцу у односу на све друге анализиране пародонтопатогене, како пре тако и након периода ношења надокнаде и то код све три групе испитаника. *P. intermedia* је укупно идентификована у 35 узорака (38.89%) пре предаје надокнада и у 61 узорку (67.78%) после завршетка опсервационог периода. Овај податак се можда може објаснити чињеницом да *P. intermedia* поседује фимбрије типа „С“ које јој омогућавају да се ефикасније везује за епителне ћелије и да се лепи за еритроците. Тако да, осим значајне улоге коју има у функционисању бактеријских заједница у биофилму и штетном ефекту који испољава блокарањем имуног одговора домаћина [44, 45], присуство фимбрија типа „С“ јој омогућава везивање за ћелије са одговарајућим рецепторима, инкорпорацију, инвазију и последичну смрт ћелије домаћина [43, 123].

Праћењем клиничких параметара (пародонтални индекси) вршена је евалуација здравља пародонталних ткива код испитаника друге и треће групе. Резултати пре предаје зубних надокнада показују да вредности три праћена индекса одговарају здравом пародонцијуму, односно показују одсуство инфламације гингиве као и физиолошке

вредности нивоа припојног епитела код обе групе испитаника. Резултати поређења параметара између група показују статистичку значајност, али су у оквиру вредности које указују на здрав пародонцијум (Табела 7). Код испитаника код којих је била индикована израда једне метало-керамичке круне није нађена статистички значајна разлика након периода ношења зубне надокнаде и вредности пародонталних индекса су указивале на одсуство запаљенских процеса. Код испитаника треће групе уочена је статистички значајна разлика након опсервационог периода у сва три анализирана индекса, с тим што је, са клиничког аспекта, вредност гингивалног индекса у овом случају најважнија. Наиме, средња вредност гингивалног индекса скочила је на вредност преко 1 што указује на присуство благе инфламације гингиве.

Разлике у вредностима пародонталних индекса код пацијената код којих је била индикована израда комбиноване фиксо-мобилно зубне надокнаде пре и након периода ношења као и између самих група могу се објаснити недовољно развијеном бригом о оралном здрављу (код сваког испитаника треће групе присутан је губитак већег броја бочних зуба), као и отежаним одржавањем оралне хигијене услед присуства метало-керамичких мостова на преосталим зубима[124-127].

Разлика у вредностима пародонталних индекса између друге и треће групе пацијената може се приписати и мотивацији самих пацијената и њиховој свести о значају здравља оралних ткива као и утицају околине. Наиме, пацијенти друге групе су млађи, друштвено активни и вођени не само сопственом жељом за очуваним осмехом, него и притисцима средине. Гоел је у својој студији истраживао значај естетике уста и зуба и различито схватање лепоте у зависности од старости пацијента [128], и дошао до закључка да млади људи придају већи значај концепту лепоте. Калид и Хоџис су се независно један од

другога бавили утицајем друштва на формирање „пожељног“ изгледа зуба и негативног става околине када су у питању особе које ове критеријуме не испуњавају [129,130].

Треба нагласити да је код пацијената са присутним свим (или скоро свим) природним зубима очуван зубни низ и присутна је хармонија денталног лука, па је самим тим олакшано самочишћење, не долази до накупљања хране и одржавање хигијене је олакшано.

Орална хигијена засигурно представља један од најзначајнијих фактора који утичу на присуство пародонтопатогених бактерија. Сви испитаници су детаљно обучени како да на адекватан начин одржавају оралну хигијену. Пацијентима са присутним природним зубима објашњене су технике правилног прања зуба и њихов значај [131-135], као и како адекватно да користе конач за зубе, интерденталне четкице и оралне иригансе [127, 136-142]. Безубипацијенти, односно носиоци тоталних зубних протеза, као и носиоци парцијалних скелетираних протеза детаљно су обучени како да одржавају хигијену зубних надокнада и како да на одговарајући начин одлажу зубне протезе током ноћи [143, 144]. Иако пљувачка механички чисти усну дупљу и смањује адхезију микроорганизама на акрилат од кога је зубна протеза сачињена, ови ефекти се значајно умањују уколико пацијенти спавају са тоталним зубним протезама у устима [145, 146]. Такође, зубне протезе могу бити резервоари патогених бактерија одакле се могу ширити по усној дупљи и даље до удаљених система и органа [147, 148]. Још један разлог због којих је тоталне зубне протезе препоручљиво не носити ноћу је и тај што је носећим ткивима потребно неколико сати како би се опоравила од деловања оклузалних сила током мастикације и саме трауме коју условљава контакт са зубним надокнадама [149]. Како би се унапредио степен одржавања оралне хигијене, испитаницима је препоручено и коришћење хемијских

супстанци са натријум-перборатом или натријум-перкарбонатом, које у воденом раствору ослобађају насцентни кисеоник и утичу на смањење броја микроорганизама [116, 150]. Ниво одржавања оралне хигије је строго контролисан од стране стоматолога, како би се осигурала адекватна мотивисаност и посвећеност испитаника.

Сокрански и Ван дер Велден су са својим сарадницима објавили резултате који показују да дорзална површина језика може служити као погодан хабитат за насељавање пародонтопатогених микроорганизама и представљати погодан резервоар реинфекције [113, 114]. Међутим само чишћење језика, иако доводи до смањења броја микроорганизама на дорзуму, не утиче на смањење стварања денталног плака [115], те иако је било препоручено пацијентима, није контролисано.

Упркос задовољавајућем нивоу оралне хигије, код испитаника је ипак дошло до повећања присуства пародонтопатогених бактерија. Може се претпоставити да би ово повећање било још израженије да пацијенти нису правилно обучени, мотивисани и контролисани у примени свих превентивних мера. Међутим, сви подаци добијени од пацијената, попут коришћења конца за зубе, интерденталних четкица или одлагања протеза током ноћи као и квалитет одржавања оралне хигијене између контролних прегледа, треба узети са резервом.

Култура бактерија до сада се користила као златни стандард приликом испитивања оралне микрофлоре. Владало је мишљење да се једино на тај начин могу испитати све особине микроорганизама, посебно код оралних инфекција нејасне етиологије (пародонтитиса). Такође се сматрало, да се једино уз помоћ вијабилних култура може испитати осетљивост бактерија на одређене антибиотике коришћењем антибиограма. Међутим култивација микроорганизама је као метода изузетно скупа, осетљива и захтева

добро обучено особље са завидним познавањем микробиологије [151,152]. Ово се посебно односи на пародонтопатогене бактерије које су већином стриктни анаероби. Методе култивације бактерија базирају се на детекцији живих микроорганизама и подразумевају тренутно слање прикупљених узорака у лабораторију како би се осигурало њихово преживљавање [153,154]. Пародонтопатогене бактерије су врло „пробирљиве“ и потребни су им врло специфични медијуми као и атмосферски услови за узгајање, што уз често неадекватан начин прикупљања узорака и неоптималне услове транспорта доводи до неуспеха [155].

До сада је преко 250 различитих врста анаеробних бактерија изоловано и описано коришћењем метода култивације [156]. Међутим методама директне микроскопије утврђено је да постоји још много различитих бактерија које, постојећим техникама, није могуће узгајати у лабораторијским условима. Највећи број бактеријских врста које живе у нашем окружењу није могуће култивисати. Студије које су се бавиле испитивањем бројних екосистема установиле су да само један проценат укупног броја ових микроорганизама успева у *in vitro* условима [157-159]. Ситуација је нешто боља када је у питању орална средина; сматра се да је од 30% до 50% бактерија које насељавају усну дупљу немогуће култивисати [160-164].

Услед ограничења техника култивације, јавила се потреба за коришћењем нових, савременијих метода у циљу изолавања и идентификације бактерија. Методе молекуларне биологије омогућиле су брже, једноставније и јефтиније начине проналажења и описивања микроорганизама и као последица тога сваким даном се знање о саставу оралне микрофлоре повећава.



Иако су *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* и *A. actinomycetemcomitans* бактерије које се могу узгајати у лабораторијским условима, њихова култивација је изузетно захтевна и често неуспешна [165-167].

Бројни аутори су се бавили могућношћу идентификације бактерија молекуларно генетичким методама и поређењем са успешношћу култивације и дошли су до закључка да ланчана реакција полимеразе показује већу осетљивост и специфичност [168-171].

Методом култивације је изузетно тешко, ако не и немогуће, јасно одредити појединачне врсте из једног рода бактерија. Тако се на подлогама тешко уочава разлика између *F. nucleatum*-а и *F. periodonticum*-а [172], *P. intermedia*-е и *P. nigrescens*-а [173] као и појединих врста из рода *Treponema* [174]. Сторм и сарадници су на 78 узорака пацијената оболелих од пародонтитиса поредили специфичност и осетљивост метода *PCR*-а и култивације пародонтопатогених бактерија и дошли до закључка да ланчана реакција полимеразе пружа поузданије резултате са значајно већом могућношћу идентификације и диференцијације појединих врста [175]. До истих закључака, на већем броју узорака (170) дошао је и Ригио са својим сарадницима [176].

Молекуларно-генетички приступ детекцији бактерија пружа бројне предности попут специфичности, прецизности, осетљивости, брзини добијања резултата и могућности идентификације микроорганизама који се не могу култивисати. Такође, омогућава и прецизну идентификацију бактерија које се могу култивисати, али које због сличног фенотипа није лако под микроскопом препознати. *PCR* се може поуздано користити током антимикуробне терапије и не захтева присуство живих бактеријских ћелија, што је од посебног значаја за инфекције изазване анаеробним, пародонтопатогеним

микроорганизмима. Због свега наведеног ланчана реакција полимеразе постаје златни стандард за идентификацију микроорганизама и незамењљив алат у истраживању пародонтопатогених бактерија [177-180]. Због свега наведеног *PCR* метода је била метода избора приликом планирања и реализације овог истраживања.

Као последица формирања биофилма на природним зубима као и на зубним надокнадама, патогеним бактеријама усне дупље обезбеђују се услови за испољавање штетних ефеката на чврста зубна ткива и пародонцијум. Материјали који се користе у изради зубних надокнада стога морају показивати изразито низак афинитет ка насељавању микроорганизама. Бројне *in vitro* и *in vivo* студије бавиле су се проблемом пријемчивости различитих стоматолошких материјала на оралне бактерије [181-186] и уважено је мишљење да оно у највећој мери зависи од храпавости површине надокнаде [187,188].

Топлотно полимеризујући полиметил метакрилат (ПММА) има широку примену у изради базе тоталне и парцијалне плочасте протезе због прихватљиве естетике, добре топлотне проводљивости, ниске пропустљивости, добрих механичких особина као и једноставне израде и поправке [189-192]. И поред свих предности које пружа, ПММА је у великој мери плак пријемчив [106-110], па су Нишиока и сарадници покушали да додатним полирањима смање храпавост површине и тиме отежају акумулацију плака [193]. Показали су да микроорганизми теже колонизују овако обрађене површине, али да се додатним полирањем угрожава механичка отпорност зубне надокнаде. Гомез је са својим сарадницима поредила адхезију бактерија на акрилат за меко подлагање протеза са ПММА и установила да је меки акрилат знатно пријемчивији за плак, те га, са микробиолошког аспекта треба избегавати и предност дати другим материјалима [194].

Проблемом присуства бактеријских колонија на тоталним зубним протезама и могућношћу смањења њиховог броја бавио се и Ханел. Он је покушао да утврди да ли различити вештачки зуби, направљени од разних комбинација материјала утичу на присуство денталног плака [195], и нажалост није нашао никакве разлике између испитиваних производа када је у питању акумулација микроорганизама.

Проблем формирања денталног плака није везан само за мобилне зубне надокнаде. Наиме, са аспекта оралних обољења, носиоци фиксних зубних надокнада су у ризику од настанка каријеса и пародонтитиса за разлику од безубих пацијената, те од материјала који се користе у изради зубних круница и њихових способности за спречавање формирања плака зависи и успех терапије. Бремер и сарадници су истраживали различите врсте керамичких материјала у односу на степен и количину формирања биофилма [196]. Њихови резултати показују да различите врсте денталне керамике имају различиту отпорност на акумулацију плака и истичу да су у случају цирконија-керамикете вредности најниже. Међутим, крунице израђене од овог материјала су скупље од конвенционалних метало-керамичких круница, технологија израде захтева коришћење комплексних апарата, а сама естетска вредност надокнаде није идеална [197]. Моура је испитивао да ли употреба различитих материјала за дефинитивно цементирање фиксних зубних надокнада има утицај на насељавање бактерија [198]. Резултати његовог истраживања су показали да између коришћених материјала (цинк фосфатног, глас јономер и композитног цемента) не постоји разлика када је у питању колонизација бактерија, односно да немају утицај на формирање биофилма.

Један од фактора који може допринети промени услова који владају у оралној средини, а који није био предмет истраживања јесте и дијететска навика испитаника, односно начин

и врста исхране. Неколико студија се бавило могућим утицајем који исхрана може имати на промену састава оралне микрофлоре, али су резултати углавном уско повезани са нивоом одржавања оралне хигијене [199-201].

Зуботехничка лабораторија такође може представљати један од путева ширења инфекције. Резултати бројних студија наглашавају потребу за одговарајућом дезинфекцијом отисака пре изливања гипсаних модела [202, 203] како не би дошло до контаминације инструмената у лабораторији. Уколико се ове процедуре не поштују може доћи до преноса микроорганизама преко инструмената за полирање на зубне надокнаде других пацијената што може проузроковати инфекцију [204-208]. Такође, документована је и могућност преживљавања пародонтопатогених микроорганизама на гипсаним моделима зуба и вилица, одакле се могу пренети на готове зубне надокнаде и последично у усну дупљу пацијента [209,210]. Треба нагласити да на Клиници за стоматолошку протетику, Стоматолошког факултета у Београду, постоје протоколи који подразумевају дезинфекцију отисака као и зубних протеза пре предаје пацијенту, као и стерилизацију и дезинфекцију инструмената који се користе у изради зубних надокнада, те је вероватноћа преношења инфекције преко зуботехничке лабораторије минимална.

## **8. Закључак**

Клинички статус испитаника, праћен коришћењем гингивалног индекса, индекса крварења гингиве и мерењем нивоа припојног епитела пре и након периода ношења зубне надокнаде остао је непромењен, што указује на задовољавајући ниво одржавања оралне хигијене.

Анализом узорака прикупљених пре предаје зубних надокнада утврђено је умерено присуство оралних патогена, док је након периода ношења надокнада дошло до промена услова средине који су довели до значајног увећања броја пародонтопатогених микроорганизама,

Резултати овог истраживања недвосмислено показују да ношење зубних надокнада, упркос адекватној оралној хигијени и осталим превентивним мерама, доводи до повећаног присуства пародонтопатогених бактерија.

Утврђена је веза између различитих врста зубних надокнада и присуства пародонтопатогених бактерија и то:

1. Код прве групе пацијената (код којих је била индикована тоталних протеза) примећено је статистички значајно повећање присуства бактерија *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* и *Tannerella forsythia*.

2. Код друге групе пацијената (код којих је била индикована израда једне метало-керамичке крунице) примећено је статистички значајно повећање присуства бактерије *Prevotella intermedia*.

3. Код треће групе пацијената (код којих је била индикована израда комбиноване фиксно-мобилне зубне надокнаде) примећено је статистички значајно повећање присуства бактерија *Treponema denticola* и *Fusobacterium nucleatum*.

Штетно дејство пародонтопатогених бактерија је добро документовано, али још увек није до краја разјашњено. Скоро свакодневно се објављују студије које указују на улогу оралних микроорганизама у све већем броју системских стања и обољења. Значај ове студије је у томе што нам указује да и рутинске стоматолошке интервенције могу, под одређеним условима, озбиљно утицати на здравствени статус пацијента. Механизми који узрокују повећање присуства оралних патогена морају се детаљно и појединачно испитати, како бисмо могли да смањимо, ако не и елиминишемо штетне бактерије усне дупље.

Боље разумевање оралне микрофлоре и утицај који стоматолошка терапија може имати на бактеријске колоније треба да буду међу главним циљевима модерне стоматологије.

## **9. Литература**



1. Wenner, Melinda. "Humans carry more bacterial cells than human ones." *Scientific American* 30 (2007).
2. Peterson, Jane, Susan Garges, Maria Giovanni, Pamela McInnes, Lu Wang, Jeffery A. Schloss, Vivien Bonazzi et al. "The NIH human microbiome project." *Genome research* 19, no. 12 (2009): 2317-2323.
3. Marsh, Philip D. "Role of the oral microflora in health." *Microbial Ecology in Health and Disease* 12, no. 3 (2000): 130-137.
4. Marsh, Philip D., Michael V. Martin, Michael AO Lewis, and David Williams. *Oral microbiology*. Elsevier Health Sciences, 2009.
5. Bik, Elisabeth M., Clara Davis Long, Gary C. Armitage, Peter Loomer, Joanne Emerson, Emmanuel F. Mongodin, Karen E. Nelson, Steven R. Gill, Claire M. Fraser-Liggett, and David A. Relman. "Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals." *The ISME journal* 4, no. 8 (2010): 962-974.
6. Aas, Jørn A., Bruce J. Paster, Lauren N. Stokes, Ingar Olsen, and Floyd E. Dewhirst. "Defining the normal bacterial flora of the oral cavity." *Journal of clinical microbiology* 43, no. 11 (2005): 5721-5732.
7. Paster, Bruce J., Susan K. Boches, Jamie L. Galvin, Rebecca E. Ericson, Carol N. Lau, Valerie A. Levanos, Ashish Sahasrabudhe, and Floyd E. Dewhirst. "Bacterial diversity in human subgingival plaque." *Journal of bacteriology* 183, no. 12 (2001): 3770-3783.
8. Keijser, B. J. F., E. Zaura, S. M. Huse, J. M. B. M. Van Der Vossen, F. H. J. Schuren, R. C. Montijn, J. M. Ten Cate, and W. Crielaard. "Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults." *Journal of dental research* 87, no. 11 (2008): 1016-1020.
9. Costello, Elizabeth K., Christian L. Lauber, Micah Hamady, Noah Fierer, Jeffrey I. Gordon, and Rob Knight. "Bacterial community variation in human body habitats across space and time." *Science* 326, no. 5960 (2009): 1694-1697.

10. Dewhirst, Floyd E., Tuste Chen, Jacques Izard, Bruce J. Paster, Anne CR Tanner, Wen-Han Yu, Abirami Lakshmanan, and William G. Wade. "The human oral microbiome." *Journal of bacteriology* 192, no. 19 (2010): 5002-5017.
11. Quirynen, Marc, Marc De Soete, K. Dierickx, and Daniel Van Steenberghe. "The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy." *Journal of Clinical Periodontology* 28, no. 6 (2001): 499-507.
12. Mager, Donna L., Laurie Ann Ximenez-Fyvie, Anne D. Haffajee, and Sigmund S. Socransky. "Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces." *Journal of clinical periodontology* 30, no. 7 (2003): 644-654.
13. Darveau, Richard P. "Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis." *Nature Reviews Microbiology* 8, no. 7 (2010): 481-490.
14. Lamont, Richard J., and Ö. Zlem Yilmaz. "In or out: the invasiveness of oral bacteria." *Periodontology 2000* 30, no. 1 (2002): 61-69.
15. US Department of Health and Human Services. "Oral Health in America: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, 2000." *NIH Publication no. 00-4713* (2014).
16. Ettinger, Ronald L. "Epidemiology of dental caries. A broad review." *Dental Clinics of North America* 43, no. 4 (1999): 679-94.
17. Albandar, J. M., J. A. Brunelle, and A. Kingman. "Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994." *Journal of periodontology* 70, no. 1 (1999): 13-29.
18. Miller, W. D. "THE MICROORGANISMS OF THE MOUTH." *The American Journal of the Medical Sciences* 98, no. 3 (1889): 275-276.

19. Holt, Stanley C., and Jeffrey L. Ebersole. "Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis." *Periodontology 2000* 38, no. 1 (2005): 72-122.
20. D'Ercole, Simonetta, Giovanni Catamo, and Raffaele Piccolomini. "Diagnosis in periodontology: a further aid through microbiological tests." *Critical reviews in microbiology* 34, no. 1 (2008): 33-41.
21. Rôças, Isabela N., José F. Siqueira, Kátia RN Santos, Ana MA Coelho, and Rio de Janeiro. "'Red complex' (Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis, and Treponema denticola) in endodontic infections: a molecular approach." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 91, no. 4 (2001): 468-471.
22. Danilović, Vesna, i Radujković Kuburović Gordana. *Oralna histologija i embriologija*. Zavod za udžbenike, Beograd, 2012.
23. Avery, James K., and Pauline F. Steele. *Essentials of oral histology and embryology: a clinical approach*. Mosby, 2006.
24. O'Toole, George, Heidi B. Kaplan, and Roberto Kolter. "Biofilm formation as microbial development." *Annual Reviews in Microbiology* 54, no. 1 (2000): 49-79.
25. Dimitrijević, Božidar, Zelić, Obrad, i Leković Vojislav. *Klinička parodontologija*. Zavod za udžbenike, Beograd, 2011.
26. Yamanaka, Takeshi, Kazuyoshi Yamane, Tomoyo Furukawa, Chiho Matsumoto-Mashimo, Chieko Sugimori, Takayuki Nambu, Noboru Obata, Clay B. Walker, Kai-Poon Leung, and Hisanori Fukushima. "Comparison of the virulence of exopolysaccharide-producing *Prevotella intermedia* to exopolysaccharide non-producing periodontopathic organisms." *BMC infectious diseases* 11, no. 1 (2011): 228.
27. Kesic, Ljiljana, Jelena Milasin, Marija Igetic, and Radmila Obradovic. "Microbial etiology of periodontal disease—mini review." *Medicine and biology* 15, no. 1 (2008): 1-6.

28. Holt, Stanley C., Lakshmyya Kesavalu, Stephen Walker, and Caroline Attardo Genco. "Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*." *Periodontology* 200020, no. 1 (1999): 168-238..
29. Papaioannou, William, Daniel van Steenberghe, Jean-Jacques Cassiman, Johan Van Eldere, and Marc Quirynen. "Comparison of fluorescence microscopy and culture assays to quantitate adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to mono-and multi-layered pocket epithelium cultures." *Journal of periodontology* 70, no. 6 (1999): 618-625.
30. Marie-Claude Jobin, Mohsen Amin, Richard P. Ellen (2008). "Chapter 8 - The Molecular Biology of the Survival and Virulence of *Treponema denticola*". In Anthony H. Rogers. *Molecular Oral Microbiology*. Caister Academic Press. p. 177.
31. Frederick, J. R., J. Sarkar, J. V. McDowell, and R. T. Marconi. "Molecular signaling mechanisms of the periopathogen, *Treponema denticola*." *Journal of dental research* 90, no. 10 (2011): 1155-1163.
32. Takeuchi, Yasuo, Makoto Umeda, Mitsuo Sakamoto, Yoshimi Benno, Yi Huang, and Isao Ishikawa. "*Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction." *Journal of periodontology* 72, no. 10 (2001): 1354-1363.
33. Chan, E. C. S., and R. McLaughlin. "Taxonomy and virulence of oral spirochetes." *Oral microbiology and immunology* 15, no. 1 (2000): 1-9.
34. Serio, Francis G., and Teresa B. Duncan. "The pathogenesis and treatment of periodontal disease." *Academy of Dental Therapeutics and Stomatology* (2009): 1-12.
35. Sharma, Ashu. "Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*." *Periodontology* 2000 54, no. 1 (2010): 106-116.
36. Sekot, G., G. Posch, P. Messner, M. Matejka, X. Rausch-Fan, O. Andrukhov, and C. Schäffer. "Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response." *Journal of dental research* 90, no. 1 (2011): 109-114.

37. Sekot, Gerhard, Gerald Posch, Yoo Jin Oh, Sonja Zayni, Harald F. Mayer, Dietmar Pum, Paul Messner, Peter Hinterdorfer, and Christina Schäffer. "Analysis of the cell surface layer ultrastructure of the oral pathogen *Tannerella forsythia*." *Archives of microbiology* 194, no. 6 (2012): 525-539.
38. Nakajima, Takuma, Naoko Tomi, Yayoi Fukuyo, Hiroaki Ishikura, Yuka Ohno, Ramanathan Arvind, Takao Arai, Isao Ishikawa, and Shinichi Arakawa. "Isolation and identification of a cytopathic activity in *Tannerella forsythia*." *Biochemical and biophysical research communications* 351, no. 1 (2006): 133-139.
39. Bolstad, A. I., H. B. Jensen, and V. Bakken. "Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*." *Clinical microbiology reviews* 9, no. 1 (1996): 55-71.
40. Astasov-Frauenhoffer, Monika, Olivier Braissant, Irmgard Hauser-Gerspach, Alma U. Daniels, Roland Weiger, and Tuomas Waltimo. "Isothermal microcalorimetry provides new insights into biofilm variability and dynamics." *FEMS microbiology letters* 337, no. 1 (2012): 31-37.
41. Huggan, Paul J., and David R. Murdoch. "Fusobacterial infections: clinical spectrum and incidence of invasive disease." *Journal of Infection* 57, no. 4 (2008): 283-289.
42. Doan, Nguyen, Adolfo Contreras, Jane Flynn, John Morrison, and Jørgen Slots. "Proficiencies of three anaerobic culture systems for recovering periodontal pathogenic bacteria." *Journal of clinical microbiology* 37, no. 1 (1999): 171-174.
43. Dorn, Brian R., K-P. Leung, and Ann Progulske-Fox. "Invasion of Human Oral Epithelial Cells by *Prevotella intermedia*." *Infection and immunity* 66, no. 12 (1998): 6054-6057.
44. Marcotte, Harold, and Marc C. Lavoie. "Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A." *Microbiology and molecular biology reviews* 62, no. 1 (1998): 71-109.
45. Araki, Hakuzo, T. Kuriyama, K. Nakagawa, and T. Karasawa. "The microbial synergy of *Peptostreptococcus micros* and *Prevotella intermedia* in a murine abscess model." *Oral microbiology and immunology* 19, no. 3 (2004): 177-181.

46. Kornman, Kenneth S., and Walter J. Loesche. "Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melanogenicus* and *Bacteroides gingivalis*." *Infection and Immunity* 35, no. 1 (1982): 256-263.
47. Slots J, Genco RJ. Black-pigments *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 1984; 63: 412-421.
48. Slots, Jergen, and Max A. Listgarten. "*Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases." *Journal of clinical periodontology* 15, no. 2 (1988): 85-93.
49. Baehni, P., C. C. Tsai, W. P. McArthur, B. F. Hammond, and N. S. Taichman. "Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism." *Infection and Immunity* 24, no. 1 (1979): 233-243.
50. Mangan, Dennis F., N. S. Taichman, E. T. Lally, and S. M. Wahl. "Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes." *Infection and immunity* 59, no. 9 (1991): 3267-3272.
51. Perfecto, Donald Ramos. "Aggregatibacter actinomycetemcomitans patógeno importante en la periodontitis agresiva." *Revista Kiru* 8, no. 2 (2015).
52. Saglie, F. Reinaldo, Ken Simon, Jean Merrill, and H. Phillip Koeffler. "Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates macrophages to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein." *Oral microbiology and immunology* 5, no. 5 (1990): 256-262.
53. Kinoshita, F. "[Chemical structure and immunomodulating activities of peptidoglycan from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*]." *Kanagawa shigaku. The Journal of the Kanagawa Odontological Society* 24, no. 3 (1989): 523-535.

54. Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith, and R. L. Kent. "Microbial complexes in subgingival plaque." *Journal of clinical periodontology* 25, no. 2 (1998): 134-144.
55. Wong, Benjamin Chun-Yu, Shiu Kum Lam, Wai Man Wong, Jian Shun Chen, Ting Ting Zheng, Rui E. Feng, Kam Chuen Lai et al. "Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial." *Jama* 291, no. 2 (2004): 187-194.
56. Hopkins, Robert J., Luigi S. Girardi, and Elizabeth A. Turney. "Relationship between Helicobacter pylori eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review." *gastroenterology* 110, no. 4 (1996): 1244-1252.
57. Wündisch, Thomas, Christian Thiede, Andrea Morgner, Astrid Dempfle, Annette Günther, Hongxiang Liu, Hongtao Ye et al. "Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after Helicobacter pylori eradication." *Journal of Clinical Oncology* 23, no. 31 (2005): 8018-8024.
58. Zou, Qing-Hua, and Ren-Qing Li. "Helicobacter pylori in the oral cavity and gastric mucosa: a meta-analysis." *Journal of Oral Pathology & Medicine* 40, no. 4 (2011): 317-324.
59. Gebara, E. C. E., C. M. Faria, C. Pannuti, L. Chehter, M. P. A. Mayer, and L. A. P. A. Lima. "Persistence of Helicobacter pylori in the oral cavity after systemic eradication therapy." *Journal of clinical periodontology* 33, no. 5 (2006): 329-333.
60. Chen, An-Chyi, Ching-Chuan Liu, Wei-Jen Yao, Chun-Ta Chen, and Jiu-Yao Wang. "Actinobacillus actinomycetemcomitans pneumonia with chest wall and subphrenic abscess." *Scandinavian journal of infectious diseases* 27, no. 3 (1995): 289-290.
61. Brook, I., and E. H. Frazier. "Aerobic and anaerobic microbiology of empyema. A retrospective review in two military hospitals." *CHEST Journal* 103, no. 5 (1993): 1502-1507.
62. Lorenz, K. A., and P. J. Weiss. "Capnocytophagal pneumonia in a healthy man." *Western journal of medicine* 160, no. 1 (1994): 79.

63. Munro, Cindy L., Mary Jo Grap, R. K. Elswick, Jessica McKinney, Curtis N. Sessler, and Russell S. Hummel. "Oral health status and development of ventilator-associated pneumonia: a descriptive study." *American Journal of Critical Care* 15, no. 5 (2006): 453-460.
64. Dennesen, Paul, André Van Der Ven, Mariel Vlasveld, Linka Lokker, Graham Ramsay, Alphons Kessels, Petra van den Keijbus, Arie van Nieuw Amerongen, and Enno Veerman. "Inadequate salivary flow and poor oral mucosal status in intubated intensive care unit patients." *Critical care medicine* 31, no. 3 (2003): 781-786.
65. Turner, Michael, Leila Jahangiri, and Jonathan A. Ship. "Hyposalivation, xerostomia and the complete denture: a systematic review." *The Journal of the American Dental Association* 139, no. 2 (2008): 146-150.
66. Nanci, Antonio, and Dieter D. Bosshardt. "Structure of periodontal tissues in health and disease\*." *Periodontology 2000* 40, no. 1 (2006): 11-28.
67. Kozarov, Emil V., Brian R. Dorn, Charles E. Shelburne, William A. Dunn, and Ann Progulsk-Fox. "Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, no. 3 (2005): e17-e18.
68. Rajasuo, Ari, Kaarle Perkki, Susan Nyfors, Hannele Jousimies-Somer, and Jukka H. Meurman. "Bacteremia following surgical dental extraction with an emphasis on anaerobic strains." *Journal of dental research* 83, no. 2 (2004): 170-174.
69. Kinane, Denis F., Marcello P. Riggio, Katie F. Walker, Duncan MacKenzie, and Barbara Shearer. "Bacteraemia following periodontal procedures." *Journal of clinical periodontology* 32, no. 7 (2005): 708-713.
70. Giglio, James A., Randal W. Rowland, Harry P. Dalton, and Daniel M. Laskin. "Suture removal-induced bacteremia: a possible endocarditis risk." *The Journal of the American Dental Association* 123, no. 8 (1992): 65-70.



71. Roberts, Graham J. "Dentists are innocent! ``Everyday"bacteremia is the real culprit: A review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children." *Pediatric cardiology* 20, no. 5 (1999): 317-325.
72. Savarrio, L., D. Mackenzie, M. Riggio, W. P. Saunders, and J. Bagg. "Detection of bacteraemias during non-surgicalroot canal treatment." *Journal of dentistry* 33, no. 4 (2005): 293-303.
73. Lucas, Victoria S., Jamilah Omar, Anya Vieira, and Graham J. Roberts. "The relationship between odontogenic bacteraemia and orthodontic treatment procedures." *The European Journal of Orthodontics* 24, no. 3 (2002): 293-301.
74. Lineberger, Luther Truett, and Thomas J. De Marco. "Evaluation of transient bacteremia following routine periodontal procedures." *Journal of periodontology* 44, no. 12 (1973): 757-762.
75. Guntheroth, Warren G. "How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis?." *The American journal of cardiology* 54, no. 7 (1984): 797-801.
76. Forner, Lone, Tove Larsen, Mogens Kilian, and Palle Holmstrup. "Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation." *Journal of clinical periodontology* 33, no. 6 (2006): 401-407.
77. Berbari, Elie F., Franklin R. Cockerill, and James M. Steckelberg. "Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms." In *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 72, no. 6, pp. 532-542. Elsevier, 1997.
78. Rosado, Alonso A., Hernández G. Marcos, and Pérez R. Gómez. "Scientific evidence for the relationship between periodontitis and cardiovascular disease." (2013).
79. Mang-de la Rosa, María R., Lizett Castellanos-Cosano, María J. Romero-Perez, and Antonio Cutando. "The bacteremia of dental origin and its implications in the appearance of bacterial endocarditis." *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 19, no. 1 (2014): e67.
80. Scannapieco, Frank A. "Role of oral bacteria in respiratory infection." *Journal of periodontology* 70, no. 7 (1999): 793-802.

81. Tiháček-Šojić, Lj, and I. Stančić. *Stomatološka gerontoprotetika*. Kragujevac, Serbia: Koraci doo, 2009.

82. Sumi, Y., H. Miura, M. Sunakawa, Y. Michiwaki, and N. Sakagami. "Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly." *Gerodontology* 19, no. 1 (2002): 25-29.

83. Dodman, T., J. Robson, and D. Pincus. "Kingella kingae infections in children." *Journal of paediatrics and child health* 36, no. 1 (2000): 87-90.

84. Gaetti-Jardim Júnior, Elerson, Angélica Cristiane Fardin, Ellen Cristina Gaetti-Jardim, Alvimar Lima de Castro, Christiane Marie Schweitzer, and Mario Julio Avila-Campos. "Microbiota associated with chronic osteomyelitis of the jaws." *Brazilian Journal of Microbiology* 41, no. 4 (2010): 1056-1064.

85. Gaetti-Jardim, Elerson, Luis Fernando Landucci, Kathlenn Liezbeth de Oliveira, Iracy Costa, Robson Varlei Ranieri, Ana Cláudia Okamoto, and Christiane Marie Schweitzer. "Microbiota associated with infections of the jaws." *International journal of dentistry* 2012 (2012).

86. Pucar, Ana, Jelena Milasin, Vojislav Lekovic, Miroslav Vukadinovic, Miljko Ristic, Svetozar Putnik, and E. Barrie Kenney. "Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries." *Journal of periodontology* 78, no. 4 (2007): 677-682.

87. Ramírez, J. H., B. Parra, S. Gutierrez, R. M. Arce, A. Jaramillo, Y. Ariza, and A. Contreras. "Biomarkers of cardiovascular disease are increased in untreated chronic periodontitis: a case control study." *Australian dental journal* 59, no. 1 (2014): 29-36.

88. Alfakry, H., S. Paju, J. Sinisalo, M. S. Nieminen, V. Valtonen, P. Saikku, M. Leinonen, and P. J. Pussinen. "Periodontopathogen-and Host-Derived Immune Response in Acute Coronary Syndrome." *Scandinavian journal of immunology* 74, no. 4 (2011): 383-389.

89. Calandrini, C. A., A. C. Ribeiro, A. C. Gonnelli, C. Ota-Tsuzuki, L. P. Rangel, E. Saba-Chujfi, and M. P. A. Mayer. "Microbial composition of atherosclerotic plaques." *Oral diseases* 20, no. 3 (2014): e128-e134.
90. Toyofuku, Takahiro, Yoshinori Inoue, Nobuhisa Kurihara, Toshifumi Kudo, Masatoshi Jibiki, Norihide Sugano, Makoto Umeda, and Yuichi Izumi. "Differential detection rate of periodontopathic bacteria in atherosclerosis." *Surgery today* 41, no. 10 (2011): 1395-1400.
91. Kostic, Aleksandar D., Eunyoung Chun, Lauren Robertson, Jonathan N. Glickman, Carey Ann Gallini, Monia Michaud, Thomas E. Clancy et al. "Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment." *Cell host & microbe* 14, no. 2 (2013): 207-215.
92. Castellarin, Mauro, René L. Warren, J. Douglas Freeman, Lisa Dreolini, Martin Krzywinski, Jaelyn Strauss, Rebecca Barnes et al. "Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma." *Genome research* 22, no. 2 (2012): 299-306.
93. Tahara, Tomomitsu, Eiichiro Yamamoto, Hiromu Suzuki, Reo Maruyama, Woonbok Chung, Judith Garriga, Jaroslav Jelinek et al. "Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma." *Cancer research* 74, no. 5 (2014): 1311-1318.
94. Janković, Lj., and D. Stamenković. Preventivna stomatologija u odraslih. Beograd, Serbia: Izdavačka agencija „Draganić“, 1995.
95. Totalna proteza
96. Rosenstiel, Stephen F., Martin F. Land, and Junhei Fujimoto. Contemporary fixed prosthodontics. Elsevier Health Sciences, 2006.
97. Dragoslav Stamenković. Stomatološka protetika - parcijalne proteze. Interprint, 2006.
98. Yoneyama, Takeyoshi, Mitsuyoshi Yoshida, Takashi Ohru, Hideki Mukaiyama, Hiroshi Okamoto, Kanji Hoshiba, Shinichi Ihara et al. "Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes." *Journal of the American Geriatrics Society* 50, no. 3 (2002): 430-433.

99. Preshaw, P. M., A. L. Alba, D. Herrera, S. Jepsen, A. Konstantinidis, K. Makrilakis, and R. Taylor. "Periodontitis and diabetes: a two-way relationship." *Diabetologia* 55, no. 1 (2012): 21-31.
100. Nabi, S. U., A. R. Wani, O. S. Shah, and S. Dey. "Association of periodontitis and chronic kidney disease in dogs." *Cell* 91 (2014): 9906958601.
101. Bishop, Louis F. "The relationship between the cardiologist and the prosthodontist." *The Journal of Prosthetic Dentistry* 10, no. 5 (1960): 989-994.
102. Renner, R. P., B. C. Gomes, T. F. McNamara, M. L. Shakun, P. N. Baer, and D. Hackett. "Periodontal health, prosthodontic factors and microbial ecology of patients treated with overdentures--a 2 1/2-year report." *Quintessence international, dental digest* 15, no. 6 (1984): 645-652.
103. Eglitis, Ilze Irene, William F. Malone, Patrick D. Toto, and Rinert Gerhard. "The presence of immunoglobulin IgG and complement factor C3 in inflammatory papillary hyperplasia associated with maxillary dentures." *The Journal of prosthetic dentistry* 46, no. 2 (1981): 201-214.
104. Hultin, Margareta, Anders Gustafsson, Hadar Hallström, L-Å. Johansson, Anders Ekfeldt, and Björn Klinge. "Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis." *Clinical oral implants research* 13, no. 4 (2002): 349-358.
105. Silness, John. "Periodontal conditions in patients treated with dental bridges." *Journal of Periodontal Research* 5, no. 1 (1970): 60-68.
106. Yasui, Masako, Masahiro Ryu, Kaoru Sakurai, and Kazuyuki Ishihara. "Colonisation of the oral cavity by periodontopathic bacteria in complete denture wearers." *Gerodontology* 29, no. 2 (2012): e494-e502.
107. Tanaka, Junko, Masahiro Tanaka, and Takayoshi Kawazoe. "Longitudinal research on the oral environment of elderly wearing fixed or removable prostheses." *Journal of prosthodontic research* 53, no. 2 (2009): 83-88.

108. Marsh, P. D., R. S. Percival, and S. J. Challacombe. "The influence of denture-wearing and age on the oral microflora." *Journal of dental research* 71, no. 7 (1992): 1374-1381.

109. Glass, R. Thomas, Robert S. Conrad, James W. Bullard, Leigh B. Goodson, Naresh Mehta, Stanley J. Lech, and Zvi G. Loewy. "Evaluation of microbial flora found in previously worn prostheses from the Northeast and Southwest regions of the United States." *The Journal of prosthetic dentistry* 103, no. 6 (2010): 384-389.

110. Zhu, Xiao, Shaohai Wang, Yihai Gu, Xiaoyu Li, Hui Yan, He Yan, Shin-ichi Miyoshi, and Lei Shi. "Possible variation of the human oral bacterial community after wearing removable partial dentures by DGGE." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, no. 5 (2012): 2229-2236.

111. Passariello, Claudio, Monica Puttini, Alessandra Virga, and Pierangelo Gigola. "Microbiological and host factors are involved in promoting the periodontal failure of metaloceramic crowns." *Clinical oral investigations* 16, no. 3 (2012): 987-995.

112. Iinuma, T., Y. Arai, Y. Abe, M. Takayama, M. Fukumoto, Y. Fukui, T. Iwase et al. "Denture wearing during sleep doubles the risk of pneumonia in the very elderly." *Journal of dental research* (2014): 0022034514552493.

113. Sachdeo, Amit, Anne D. Haffajee, and Sigmund S. Socransky. "Biofilms in the edentulous oral cavity." *Journal of Prosthodontics* 17, no. 5 (2008): 348-356.

114. Velden, U., A. J. Winkelhoff, F. Abbas, and J. Graaff. "The habitat of periodontopathic micro-organisms." *Journal of Clinical Periodontology* 13, no. 3 (1986): 243-248.

115. Matsui, Miki, Naoyuki Chosa, Yu Shimoyama, Kentaro Minami, Shigenobu Kimura, and Mitsuo Kishi. "Effects of tongue cleaning on bacterial flora in tongue coating and dental plaque: a crossover study." *BMC oral health* 14, no. 1 (2014): 4.

116. Cruz, Patrícia Costa, Ingrid Machado de Andrade, Amanda Peracini, Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin, Cláudia Helena Silva-Lovato, Raphael Freitas de Souza, and Helena de Freitas Oliveira Paranhos. "The effectiveness of chemical denture cleansers and

ultrasonic device in biofilm removal from complete dentures." *Journal of Applied Oral Science* 19, no. 6 (2011): 668-673.

117. Saiki, Randall K., David H. Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J. Scharf, Russell Higuchi, Glenn T. Horn, Kary B. Mullis, and Henry A. Erlich. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239, no. 4839 (1988): 487-491.

118. Boehnke Michael, Norman Arnheim, Honghua Li, and Francis S. Collins. "Fine-structure genetic mapping of human chromosomes using the polymerase chain reaction on single sperm: experimental design considerations." *American journal of human genetics* 45, no. 1 (1989): 21.

119. Van Belkum, A. L. E. X. "DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR." *Clinical Microbiology Reviews* 7, no. 2 (1994): 174-184.

120. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). (2012). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press.

121. Milićević, Radovan, Gavriilo Brajović, Nataša Nikolić-Jakoba, Branka Popović, Dušan Pavlica, Vojislav Leković, and Jelena Milašin. "Identification of periodontopathogen microorganisms by PCR technique." *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* 136, no. 9-10 (2008): 476-480.

122. Curtis, Michael A., Camille Zenobia, and Richard P. Darveau. "The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease." *Cell host & microbe* 10, no. 4 (2011): 302-306.

123. Falkow, Stanley, Pamela Small, Ralph Isberg, S. F. Hayes, and Dan Corwin. "A molecular strategy for the study of bacterial invasion." *Review of Infectious Diseases* 9, no. Supplement 5 (1987): S450-S455.

124. Silness, John, and Elisabeth Ohm. "Periodontal conditions in patients treated with dental bridges." *Journal of periodontal research* 9, no. 2 (1974): 121-126.

125. Van Der Weijden, Fridus, and Dagmar Else Slot. "Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence." *Periodontology 2000* 55, no. 1 (2011): 104-123.
126. Waerhaug, Jens. "The interdental brush and its place in operative and crown and bridge dentistry." *Journal of oral rehabilitation* 3, no. 2 (1976): 107-113.
127. Slot, D. E., C. E. Dörfer, and G. A. Van der Weijden. "The efficacy of interdental brushes on plaque and parameters of periodontal inflammation: a systematic review." *International journal of dental hygiene* 6, no. 4 (2008): 253-264.
128. Goel, Shruti, Stuti Mohan, and Krishna Arora. "Beauty Lies in the Eyes of the Beholder: An Age Related Prospective Study." *Journal of Orofacial & Health Sciences* 4, no. 3 (2013): 102-109.
129. Khalid, Abeer, and Carlos Quiñonez. "Straight, white teeth as a social prerogative." *Sociology of health & illness* (2015).
130. Hodges, Nathan. "The American Dental Dream." *Health communication* ahead-of-print (2014): 1-8.
131. Wainwright, J., and A. Sheiham. "An analysis of methods of toothbrushing recommended by dental associations, toothpaste and toothbrush companies and in dental texts." *British dental journal* 217, no. 3 (2014): E5-E5.
132. Laing, Emma, Paul Ashley, Daljit Gill, and Farhad Naini. "An update on oral hygiene products and techniques." *DENTAL UPDATE-LONDON-* 35, no. 4 (2008): 270.
133. Bergenholtz, Axel, Lennart B. Gustafsson, Nils Segerlund, Catharina Hagberg, and Per Nygaard Östby. "Role of brushing technique and toothbrush design in plaque removal." *European Journal of Oral Sciences* 92, no. 4 (1984): 344-351.
134. Divya, P. S., S. M. Bridges, C. P. J. McGrath, H. M. Wong, C. K. Y. Yiu, and T. K. F. Au. "Associations between Oral health literacy and oral health status." *Journal of Dental Research* 91, no. Special Issue C: abstract no. 168904 (2012).

135. White, D. A., G. Tsakos, N. B. Pitts, E. Fuller, G. V. A. Douglas, J. J. Murray, and J. G. Steele. "Adult Dental Health Survey 2009: common oral health conditions and their impact on the population." *British dental journal* 213, no. 11 (2012): 567-572.

136. Imai, Pauline H., Xiaoli Yu, and David MacDonald. "Comparison of interdental brush to dental floss for reduction of clinical parameters of periodontal disease: a systematic review." *Can J Dental Hygiene* 46, no. 1 (2012): 63-78.

137. Ashwath, Balachandran, Rajaraman Vijayalakshmi, Dayanathi Arun, and Vasanth Kumar. "Site-based plaque removal efficacy of four branded toothbrushes and the effect of dental floss in interproximal plaque removal: a randomized examiner-blind controlled study." *Quintessence international (Berlin, Germany: 1985)* 45, no. 7 (2013): 577-584.

138. Winterfeld, T., N. Schlueter, D. Harnacke, J. Illig, J. Margraf-Stiksrud, R. Deinzer, and C. Ganss. "Toothbrushing and flossing behaviour in young adults—a video observation." *Clinical oral investigations* 19, no. 4 (2015): 851-858.

139. Arora, Vikram, Pradeep Tangade, T. L. Ravishankar, Amit Tirth, Sumit Pal, and Vaibhav Tandon. "Efficacy of Dental Floss and Chlorhexidine Mouth Rinse as an Adjunct to Toothbrushing in Removing Plaque and Gingival Inflammation—A Three Way Cross Over Trial." *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR8*, no. 10 (2014): ZC01.

140. Judah, Gaby, Benjamin Gardner, and Robert Auger. "Forming a flossing habit: An exploratory study of the psychological determinants of habit formation." *British journal of health psychology* 18, no. 2 (2013): 338-353.

141. Sambunjak, Dario, Jason W. Nickerson, Tina Poklepovic, Trevor M. Johnson, Pauline Imai, Peter Tugwell, and Helen V. Worthington. "Flossing for the management of periodontal diseases and dental caries in adults." *The Cochrane Library* (2011).

142. Poklepovic, Tina, Helen V. Worthington, Trevor M. Johnson, Dario Sambunjak, Pauline Imai, Jan E. Clarkson, and Peter Tugwell. "Interdental brushing for the prevention and control of periodontal diseases and dental caries in adults." *The Cochrane Library* (2013).



143. Saha, Ashishtaru, Sudipto Dutta, Rana K. Varghese, Vinay Kharsan, and Anil Agrawal. "A survey assessing modes of maintaining denture hygiene among elderly patients." *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* 4, no. 3 (2014): 145.
144. Felton, David, Lyndon Cooper, Ibrahim Duqum, Glenn Minsley, Albert Guckes, Steven Haug, Patricia Meredith, Caryn Solie, David Avery, and Nancy Deal Chandler. "Evidence-Based Guidelines for the Care and Maintenance of Complete Dentures: A Publication of the American College of Prosthodontists." *Journal of Prosthodontics* 20, no. s1 (2011): S1-S12.
145. Samaranayake, L. P., and T. W. MacFarlane. "A retrospective study of patients with recurrent chronic atrophic candidosis." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 52, no. 2 (1981): 150-153.
146. Sakki, Tero K., Matti LE Knuuttila, Esa Läärä, and Sirpa S. Anttila. "The association of yeasts and denture stomatitis with behavioral and biologic factors." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 84, no. 6 (1997): 624-629.
147. O'Donnell, Lindsay E., Karen Smith, Craig Williams, Chris J. Nile, David F. Lappin, David Bradshaw, Margaret Lambert et al. "Dentures are a Reservoir for Respiratory Pathogens." *Journal of Prosthodontics* (2015).
148. Murakami, Mamoru, Yasuhiro Nishi, Katsura Seto, Yuji Kamashita, and Eiichi Nagaoka. "Dry mouth and denture plaque microflora in complete denture and palatal obturator prosthesis wearers." *Gerodontology* (2013).
149. Grant, Alan Archie, John R. Heath, and J. Fraser McCord. *Complete prosthodontics: problems, diagnosis and management*. London: Mosby Yearbook Europe, 1994, pp 193.
150. Gornitsky, Mervyn, Isabelle Paradis, German Landaverde, Anne-Marie Malo, and Ana Miriam Velly. "A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions." *Journal-Canadian Dental Association* 68, no. 1 (2002): 39-45.

151. Loomer, Peter M. "Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases." *Periodontology 2000* 34, no. 1 (2004): 49-56.
152. Slots J, Rams TE. Methods for the study of oral microorganisms. In: Slots J, Taubman MA. editors. Contemporary oral microbiology. St Louis: Mosby Year Book; 1992. p. 275-82.
153. Savitt, E. D., M. N. Strzempko, K. K. Vaccaro, W. J. Peros, and C. K. French. "Comparison of Cultural Methods and DNA Probe Analyses for the Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in Subgingival Plaque Samples\*." *Journal of periodontology* 59, no. 7 (1988): 431-438.
154. Slots, Jørgen. "Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation." *Oral microbiology and immunology* 1, no. 1 (1986): 48-55.
155. Olsen, I., C. O. Solberg, and S. M. Finegold. "A primer on anaerobic bacteria and anaerobic infections for the uninitiated." *Infection* 27, no. 3 (1999): 159-165.
156. Paster, Bruce J., Ingar Olsen, Jørn A. Aas, and Floyd E. Dewhirst. "The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites." *Periodontology 2000* 42, no. 1 (2006): 80-87.
157. Amann, Rudolf I., Wolfgang Ludwig, and Karl-Heinz Schleifer. "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." *Microbiological reviews* 59, no. 1 (1995): 143-169.
158. Handelsman, Jo. "Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms." *Microbiology and molecular biology reviews* 68, no. 4 (2004): 669-685.
159. Rappé, Michael S., and Stephen J. Giovannoni. "The uncultured microbial majority." *Annual Reviews in Microbiology* 57, no. 1 (2003): 369-394.
160. Reiman, David A. "The identification of uncultured microbial pathogens." *Journal of Infectious Diseases* 168, no. 1 (1993): 1-8.

161. Relman, David A. "The search for unrecognized pathogens." *Science* 284, no. 5418 (1999): 1308-1310.
162. Wade, William. "Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections." *Journal of the Royal Society of Medicine* 95, no. 2 (2002): 81-83.
163. Marsh, Philip D., Annette Moter, and Deirdre A. Devine. "Dental plaque biofilms: communities, conflict and control." *Periodontology 2000* 55, no. 1 (2011): 16-35.
164. Vartoukian, Sonia R., Richard M. Palmer, and William G. Wade. "Strategies for culture of 'unculturable' bacteria." *FEMS microbiology letters* 309, no. 1 (2010): 1-7.
165. Ezzo, Paul J., and Christopher W. Cutler. "Microorganisms as risk indicators for periodontal disease." *Periodontology 2000* 32, no. 1 (2003): 24-35.
166. Salvador, Sergio L., Salam A. Syed, and Walter J. Loesche. "Comparison of three dispersion procedures for quantitative recovery of cultivable species of subgingival spirochetes." *Journal of clinical microbiology* 25, no. 11 (1987): 2230-2232.
167. Tanner, A. C., M. N. Strzempko, C. A. Belsky, and G. A. McKinley. "API ZYM and API An-Ident reactions of fastidious oral gram-negative species." *Journal of clinical microbiology* 22, no. 3 (1985): 333-335.
168. Boutaga, Khalil, Arie Jan Winkelhoff, Christina MJE Vandenbroucke-Grauls, and Paul HM Savelkoul. "Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 45, no. 2 (2005): 191-199.
169. Riggio, M. P., A. Lennon, and K. M. Roy. "Detection of *Prevotella intermedia* in subgingival plaque of adult periodontitis patients by polymerase chain reaction." *Journal of periodontal research* 33, no. 6 (1998): 369-376.
170. Eick, Sigrun, and Wolfgang Pfister. "Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples." *Journal of clinical periodontology* 29, no. 7 (2002): 638-644.

171. Boutaga, Khalil, Arie Jan van Winkelhoff, Christina MJE Vandenbroucke-Grauls, and Paul HM Savelkoul. "Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples." *Journal of clinical microbiology* 41, no. 11 (2003): 4950-4954.
172. Conrads, Georg, Marina C. Claros, Diane M. Citron, Kerin L. Tyrrell, Vreni Merriam, and Ellie JC Goldstein. "16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, no. 2 (2002): 493-499.
173. Kuboniwa, M., A. Amano, K. R. Kimura, S. Sekine, S. Kato, Y. Yamamoto, N. Okahashi, T. Iida, and S. Shizukuishi. "Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes." *Oral microbiology and immunology* 19, no. 3 (2004): 168-176.
174. Koseki, T., I. Ishikawa, M. Umeda, and Y. Benno. "Characterization of oral treponemes isolated from human periodontal pockets." *Oral microbiology and immunology* 10, no. 5 (1995): 271-277.
175. Jervøe-Storm, P-M., M. Koltzsch, W. Falk, A. Dörfler, and S. Jepsen. "Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples." *Journal of clinical periodontology* 32, no. 7 (2005): 778-783.
176. Riggio, M. P., T. W. Macfarlane, D. Mackenzie, A. Lennon, A. J. Smith, and D. Kinane. "Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples." *Journal of Periodontal Research* 31, no. 7 (1996): 496-501.
177. Siqueira, José F., and Isabela N. Rôças. "PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens." *Journal of dentistry* 31, no. 5 (2003): 333-339.

178. Loesche, W. J., D. E. Lopatin, J. Stoll, N. Van Poperin, and Ph P. Hujoel. "Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard?." *Journal of clinical microbiology* 30, no. 2 (1992): 418-426.

179. Ashimoto, A., C. Chen, I. Bakker, and J. Slots. "Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions." *Oral microbiology and immunology* 11, no. 4 (1996): 266-273.

180. Sakamoto, Mitsuo, Yasuo Takeuchi, Makoto Umeda, Isao Ishikawa, and Yoshimi Benno. "Rapid Detection and Quantification of Five Periodontopathic Bacteria by Real-Time PCR." *Microbiology and immunology* 45, no. 1 (2001): 39-44.

181. Zalkind, Maya M., Osnat Keisar, P. N. I. N. A. EVER-HADANI, Rodika Grinberg, and Michael N. Sela. "Accumulation of Streptococcus mutans on Light-Cured Composites and Amalgam: An In Vitro Study." *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 10, no. 4 (1998): 187-190.

182. Steinberg, Doron, and Shahar Eyal. "Early formation of Streptococcus sobrinus biofilm on various dental restorative materials." *Journal of dentistry* 30, no. 1 (2002): 47-51.

183. Tanner, Johanna, Colin Robinson, Eva Söderling, and Pekka Vallittu. "Early plaque formation on fibre-reinforced composites in vivo." *Clinical oral investigations* 9, no. 3 (2005): 154-160.

184. Satou, J., A. Fukunaga, A. Morikawa, I. Matsumae, N. Satou, and H. Shintani. "Streptococcal adherence to uncoated and saliva-coated restoratives." *Journal of oral rehabilitation* 18, no. 5 (1991): 421-429.

185. Kawai, K., and M. Urano. "Adherence of plaque components to different restorative materials." *Operative dentistry* 26, no. 4 (2001): 396-400.

186. Tanner, Johanna, Pekka K. Vallittu, and Eva Söderling. "Adherence of Streptococcus mutans to an E-glass fiber-reinforced composite and conventional restorative materials used in prosthetic dentistry." *Journal of biomedical materials research* 49, no. 2 (2000): 250-256.

187. Bollenl, Curd ML, Paul Lambrechts, and Marc Quirynen. "Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature." *Dental Materials* 13, no. 4 (1997): 258-269.
188. Teughels, Wim, Nele Van Assche, Isabelle Sliepen, and Marc Quirynen. "Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development." *Clinical oral implants research* 17, no. S2 (2006): 68-81.
189. Abuzar, Menaka A., Suman Bellur, Nancy Duong, Billy B. Kim, Priscilla Lu, Nick Palfreyman, Dharshan Surendran, and Vinh T. Tran. "Evaluating surface roughness of a polyamide denture base material in comparison with poly (methyl methacrylate)." *Journal of oral science* 52, no. 4 (2010): 577-581.
190. Dhir, Gunjan, David W. Berzins, Virendra B. Dhuru, A. Raj Periathamby, and Andrew Dentino. "Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion." *Journal of Prosthodontics* 16, no. 6 (2007): 465-472.
191. Imirzalioglu, Pervin, Ozgul Karacaer, Burak Yilmaz, and Ilknur Ozmen MSc. "Color stability of denture acrylic resins and a soft lining material against tea, coffee, and nicotine." *Journal of Prosthodontics* 19, no. 2 (2010): 118-124.
192. Park, Sang E., Maggie Chao, and P. A. Raj. "Mechanical properties of surface-charged poly (methyl methacrylate) as denture resins." *International journal of dentistry* 2009 (2009).
193. Nishioka, Masamichi, Yoshihisa Yamabe, Kunihiro Hisatsune, and Hiroyuki Fujii. "Influence of polishing of denture base resin and metal surfaces on wettability with water and saliva." *Dental materials journal* 25, no. 1 (2006): 161-165.
194. Gomes, Ana Sofia, Benedita Sampaio-Maia, Mário Vasconcelos, P. A. Fonesca, and H. Figueiral. "In situ evaluation of the microbial adhesion on a hard acrylic resin and a soft liner used in removable prostheses." *The International journal of prosthodontics* 28, no. 1 (2014): 65-71.

195.Hahnel, Sebastian, Martin Rosentritt, Ralf Bürger, and Gerhard Handel. "Adhesion of Streptococcus mutans NCTC 10449 to artificial teeth: an in vitro study." *The Journal of prosthetic dentistry* 100, no. 4 (2008): 309-315.

196.Bremer, Felicia, Sebastian Grade, Philipp Kohorst, and Meike Stiesch. "In vivo biofilm formation on different dental ceramics." *Quintessence international (Berlin, Germany: 1985)* 42, no. 7 (2010): 565-574.

197.Manicone, Paolo Francesco, Pierfrancesco Rossi Iommetti, and Luca Raffaelli. "An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications." *Journal of dentistry* 35, no. 11 (2007): 819-826.

198.Moura, J. S., E. M. C. X. Lima, AF Paes Leme, A. A. Del Bel Cury, C. P. M. Tabchoury, and J. A. Cury. "Effect of luting cement on dental biofilm composition and secondary caries around metallic restorations in situ." *OPERATIVE DENTISTRY-UNIVERSITY OF WASHINGTON*- 29 (2004): 509-514.

199. Avila, Maria, David M. Ojcius, and Özlem Yilmaz. "The oral microbiota: living with a permanent guest." *DNA and cell biology* 28, no. 8 (2009): 405-411.

200. Al-Ahmad, Ali, Dominik Roth, Martin Wolkewitz, Margit Wiedmann-Al-Ahmad, Marie Follo, Petra Ratka-Krüger, Daniela Deimling, Elmar Hellwig, and Christian Hannig. "Change in diet and oral hygiene over an 8-week period: effects on oral health and oral biofilm." *Clinical oral investigations* 14, no. 4 (2010): 391-396.

201. König, K. G. "Diet and oral health." *International Dental Journal* 50, no. 3 (2000): 162-174.

202. Sofou, A., T. Larsen, N-E. Fiehn, and B. Öwall. "Contamination level of alginate impressions arriving at a dental laboratory." *Clinical oral investigations* 6, no. 3 (2002): 161-165.

203. Powell, G. Lynn, Robert D. Runnells, Barbara A. Saxon, and Brian K. Whisenant. "The presence and identification of organisms transmitted to dental laboratories." *The Journal of prosthetic dentistry* 64, no. 2 (1990): 235-237.

204. Agostinho, Alessandra Marçal, Paula Regina Miyoshi, Nelson Gnoatto, Helena de Freitas Oliveira Paranhos, Luciene Cristina de Figueiredo, and Sérgio Luiz Salvador. "Cross-contamination in the dental laboratory through the polishing procedure of complete dentures." *Brazilian dental journal* 15, no. 2 (2004): 138-143.
205. Williams, David Wynne, N. Chamary, Michael Alexander Oxenham Lewis, Paul J. Milward, and Robert McAndrew. "Microbial contamination of removable prosthodontic appliances from laboratories and impact of clinical storage." *British dental journal* 211, no. 4 (2011): 163-166.
206. Wakefield, Charles W. "Laboratory contamination of dental prostheses." *The Journal of prosthetic dentistry* 44, no. 2 (1980): 143-146.
207. Williams, H. N., W. A. Falkler, and J. F. Hasler. "Acinetobacter contamination of laboratory dental pumice." *Journal of dental research* 62, no. 10 (1983): 1073-1075.
208. Kahn, Robert C., Michael V. Lancaster, and William Kate. "The microbiologic cross-contamination of dental prostheses." *The Journal of prosthetic dentistry* 47, no. 5 (1982): 556-559.
209. Leung, Ralph L., and Steven E. Schonfeld. "Gypsum casts as a potential source of microbial cross-contamination." *The Journal of prosthetic dentistry* 49, no. 2 (1983): 210-211.
210. Žilinskas, Juozas, Jonas Junevičius, Agnė Ramonaitė, Alvydas Pavilonis, Alvydas Gleiznys, and Jurgina Sakalauskienė. "Viability changes: Microbiological analysis of dental casts." *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 20 (2014): 932.