



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Branislava B. Stojković

**ZNAČAJ SALIVARNIH DEFENZINA I
KATELICIDINA U PROCENI RIZIKA ZA
NASTANAK KARIJESA KOD DECE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2020.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Branislava B. Stojković

**THE IMPORTANCE OF SALIVARY
DEFENSINS AND CATHELICIDIN FOR
CARIES RISK ASSESSMENT IN
CHILDREN**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2020.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Prof.dr Marija Igić, redovni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Naslov: **Značaj salivarnih defenzina i katelicidina u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece**

Rezime:

Cilj studije je bio ispitivanje značaja humanog α defenzina 1 (HNP-1), humanog β defenzina 2 (hBD-2) i humanog katelicidina (LL-37) nestimulisane pljuvačke kao karijes-rizik biomarkera u dečjem uzrastu.

Sprovedena jednogodišnja, prospektivna studija je obuhvatila predškolsku decu (N=250) i rane adolescente (N=213). Anketiranjem majki/staraoca prikupljeni su socio-demografski i podaci o zdravstvenom stanju i higijensko-dijetetskim navikama ispitanika. Kliničkim pregledom registrovano je stanje oralne higijene i zdravlja zuba ispitanika. Uzorkovana je nestimulisana pljuvačka za određivanje njene pH vrednosti, a kod 85 ispitanika predškolskog uzrasta i 85 ranih adolescenata i za određivanje koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37 upotrebom komercijalnih ELISA kitova. Nakon 12 meseci, ponovljenim pregledom registrovano je zdravlje zuba ispitanika, uz određivanje godišnjeg priraštaja karijesa.

Studija preseka je pokazala da koncentracija ispitivanih peptida korelira sa uzrastom dece i pH pljuvačke, ali ne i sa prisustvom karijesa, te studija nije utvrdila njihov značaj kao karijes rizik indikatora. U predškolskom uzrastu ovaj značaj su pokazali pol (p=0,021), starost majki (p=0,028), dužina dojenja (p=0,042), frekventnost unosa ugljenih hidrata (p=0,009), indeks oralne higijene (p=0,042), a u ranoj adolescenciji obrazovanje majke (p<0,001) i oca (p=0,002), indeks oralne higijene (p<0,001), frekventnost i dužina izvođenja oralne higijene (p=0,029, p<0,001). Logističkom regresionom analizom je utvrđeno da analizirani peptidi nemaju značaj pouzdanih prediktora karijesa. Multivarijantni model je pokazao da su u predškolskom uzrastu najznačajniji prediktori karijesa indeks oralne higijene (p=0,005) i odsustvo poseta stomatologu (p=0,014), a u ranoj adolescenciji pol (p=0,001) i varijable vezane za oralnu higijenu (p=0,044).

Utvrđivanje značaja salivarnih defenzina i katelicidina kao karijes-rizik biomarkera kod dece je kompleksno, budući da se koncentracija peptida može povezati sa faktorima, kao što su uzrast i pH pljuvačke na šta je studija ukazala, a verovatno i sa mnogim salivarnim komponentama sa kojima mogu da interaguju. Stoga bi pri utvrđivanju njihovog značaja kao karijes-rizik biomarkera bilo opravdano razmotriti primenu multimarker pristupa, pre nego analize njihove efikasnosti kao solo rizik-biomarkera. Bazirano na rezultatima studije, sociodemografske karakteristike i oralno-higijenske navike

ostaju važni karijes-rizik faktori u dečjem uzrastu, sugerišući značaj mehaničke kontrole dentalnog biofilma kao centralne karijes preventivne mere.

Naučna oblast:	Stomatologija
Naučna disciplina:	Preventivna i dečja stomatologija
Ključne reči:	Karijes, Defenzini, Katelicidin, Pljuvačka, Karijes rizik biomarkeri, Deca
UDK:	612.313:616.314-002-053.2 (043.3)
CERIF klasifikacija:	B 730
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Prof. dr Marija Igić, full profesor, Univeristy of Niš, Faculty of
Medicine

Title:

**The importance of Salivary Defensins and Cathelicidin for Caries
Risk Assessment in Children**

Abstract:

The study aimed to examine the significance of human α defensin 1 (HNP-1), human β defensin 2 (hBD-2) and human cathelicidin (LL-37) of unstimulated saliva as caries risk biomarkers in childhood.

A one-year, prospective study which included preschool children (N=250) and early adolescents (N=213) was conducted. Having interviewed the mothers/guardians of the subjects, socio-demographic data, data on the health status, oral hygiene, and dietary habits of the subjects were collected. The clinical examination recorded the state of oral hygiene and dental health of the subjects. Unstimulated saliva was sampled to determine its pH value, and in 85 preschool children and 85 early adolescents to determine the salivary level of HNP-1, hBD-2 and LL-37 using commercial ELISA kits. After 12 months, a repeated examination recorded the state of the dental health of the subjects, along with the determination of the annual caries increment.

A cross-sectional study showed that the concentration of the tested HNP-1, hBD-2, LL-37 correlated with the age of the children, and the salivary pH but not with the caries presence, so the study did not determine their significance as caries risk indicators. In preschool age, this significance was shown by gender ($p=0.021$), the age of the mother ($p=0.028$), length of breastfeeding ($p=0.042$), frequency of carbohydrate intake ($p=0,009$), and values of the oral hygiene index ($p=0.042$), that is, the level of education of the mother ($p<0.001$) and the father ($p=0.002$), oral hygiene index values ($p<0.001$), frequency ($p=0.029$) and length of performing oral hygiene ($p<0.001$) in early adolescence. The logistic regression analysis showed that the analysed peptides were not recognized as reliable caries predictors in childhood. The multivariate model showed that the most significant caries predictors in preschool children were the oral hygiene index ($p=0.005$) and the absence of dental visits ($p=0.014$), compared to gender ($p=0.001$) and variables related to oral hygiene ($p=0.044$) in early adolescence.

Determining the importance of salivary defensins and cathelicidin as caries risk biomarkers in childhood is complex, since their concentration may be related to certain factors, such as age and salivary pH which the study found, and probably with many salivary components that may interact with these peptides. Therefore, it could be considered justified to use a multimarker approach in determining

the importance of defensins and cathelicidin as caries risk biomarkers in children, rather than analyzing their efficacy as a solely risk biomarkers. Based on the results of the study, socio-demographic characteristics and oral-hygiene habits remain important caries risk factors in childhood, suggesting the importance of the mechanical control of dental biofilm as a central caries preventive measure.

Scientific Field:	Dentistry
Scientific Discipline:	Preventive and Paediatric Dentistry
Key Words:	Caries, Defensins, Cathelicidin, Saliva, Caries risk biomarkers, Children
UDC:	612.313:616.314-002-053.2 (043.3)
CERIF Classification:	B 730
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije je finansijski podržano i sprovedeno u sklopu Internog projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu „Kliničko i eksperimentalno ispitivanje stomatognatog sistema i savremenih terapijskih procedura”(evidencioni broj projekta 1114629-4/11), čije izvođenje ne bi bilo moguće bez pomoći i podrške velikog broja ljudi, kojima dugujem iskrenu i više nego protokolarnu zahvalnost.

*Doktorska disertacija je realizovana pod mentorstvom **prof. dr Marije Igić** kojoj dugujem veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, strpljenju i konstruktivnoj pomoći koje mi je pružila u najtežim danima realizacije disertacije.*

*Srdačnu zahvalnost dugujem **prof. dr Tatjani Jevtović Stoimenov** na nesebičnoj pomoći u procesu biohemijske analize uzoraka i interpretaciji rezultata.*

*Srdačno se zahvaljujem i uvažanim članovima Komisije, **doc. dr Oliveri Tričković Janjić, prof. dr Mirjani Ivanović i doc. dr Milošu Kostiću** za korisne savete i sugestije u realizaciji ove doktorske disertacije.*

Zadovoljstvo mi je što mogu da istaknem značaj podrške matičnog kolektiva Službe za Preventivnu i dečju stomatologiju Klinike za stomatologiju u Nišu tokom moje dosadašnje profesionalne karijere.

Posebnu zahvalnost dugujem kolektivu Službe za Preventivnu i dečju stomatologiju Doma zdravlja u Nišu, direktorima i stručnim službama predškolskih i školskih ustanova (OŠ „Kole Rašić“, OŠ „Stefan Nemanja“), koji su pristankom na učešće podržali realizaciju sprovedenog istraživanja.

Kolegama i koleginicama iz Naučno - istraživačkog Centra za Biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu dugujem zahvalnost na značajnoj pomoći u laboratorijskom radu i procesu biohemijske analize uzoraka.

Konačno, beskrajnu zahvalnost na istinski bezrezervnoj podršci i požrtvovanosti, ljubavi i strpljenju dugujem mojoj porodici, bratu, majci i ocu kojima ovaj rad i posvećujem.

Autor
U Nišu, septembra 2020.

"The noblest pleasure is the joy of understanding"

Leonardo da Vinci

Bratu i roditeljima

LISTA KORIŠĆENIH SKRAĆENICA

SZO	Svetska zdravstvena organizacija
G+	Gram pozitivne
G-	Gram negativne
IgA	Imunoglobulin klase A
IgG	Imunoglobulin klase G
IgM	Imunoglobulin klase M
HNP-1	Humani α defenzin 1
hBD-2	Humani β defenzin 2
LL-37	Humani katelicidin
k/K	Karijesni mlečni/karijesni stalni zub
e/E	Ekstrahovan mlečni/ekstrahovan stalni zub
p/P	Plombiran mlečni/plombiran stalni zub
OHI	Indeks oralne higijene
ki₀₁	Karijes indeks osoba dece predškolskog uzrasta određen na početku studije
ki₀₂	Karijes indeks osoba dece predškolskog uzrasta određen nakon godinu dana
KI₀₁	Karijes indeks osoba ranih adolescenata određen na početku studije
KI₀₂	Karijes indeks osoba ranih adolescenata određen nakon godinu dana
kiz₁	Karijes indeks zuba mlečne denticije dece predškolskog uzrasta određen na početku studije
kiz₂	Karijes indeks zuba mlečne denticije dece predškolskog uzrasta određen nakon godinu dana
KIz₁	Karijes indeks zuba u stalnoj denticiji ranih adolescenata određen na početku studije
KIz₂	Karijes indeks zuba u stalnoj denticiji ranih adolescenata određen nakon godinu dana
kip₁	Karijes indeks prosek u mlečnoj denticiji predškolske dece određen na početku studije
kip₂	Karijes indeks prosek u mlečnoj denticiji predškolske dece određen nakon godinu dana
KIp₁	Karijes indeks prosek u stalnoj denticiji ranih adolescenata određen na početku studije
KIp₂	Karijes indeks prosek u stalnoj denticiji ranih adolescenata određen nakon godinu dana

kips₁	Prosečan broj karijesnih površina mlečnih zuba dece predškolskog uzrasta određen na početku studije
kips₂	Prosečan broj karijesnih površina mlečnih zuba dece predškolskog uzrasta određen nakon godinu dana
KIps₁	Prosečan broj površina karijesnih stalnih zuba ranih adolescenata određen na početku studije
KIps₂	Prosečan broj površina karijesnih stalnih zuba ranih adolescenata određen nakon godinu dana
GPK	Godišnji priraštaj karijesa
KI	Površni karijes
KII	Duboki karijes
Kk	Komplikacije karijesa (pulpitis, gangrena, parodontitis)
AS±SD	Aritmetička sredina±standardna devijacija

SADRŽAJ

1. UVOD	13
2. PREGLED LITERATURE	15
2.1. Savremeno shvatanje etiopatogeneze karijesa	16
2.1.1. Definicija karijesa.....	16
2.1.2. Etiologija karijesa.....	16
2.1.2.1. Primarni faktori u etiologiji karijesa.....	17
2.1.2.2. Sekundarni faktori u etiologiji karijesa.....	19
2.1.3. Patogeneza karijesa.....	20
2.1.4. Uloga pljuvačke u etiopatogenezi karijesa	21
2.1.4.1. Salivarni antimikrobni proteini urođene imunosti	23
2.1.4.1.1. Katjonski antimikrobni peptidi	24
2.1.4.1.1.1. Defenzini i katelicidini	26
2.1.4.1.1.1.1. Struktura i distribucija humanih oralnih defenzina	26
2.1.4.1.1.1.2. Struktura i distribucija humanih oralnih katelicidina.....	28
2.1.4.1.1.1.3. Salivarna sekrecija defenzina i katelicidina	29
2.1.4.1.1.1.4. Uloga defenzina i katelicidina u biološkoj kontroli karijesa.	30
2.1.4.1.1.2. Histatini, staterini, adrenomedulin, azurocidin.....	31
2.1.4.2. Salivarni antimikrobni proteini stečene imunosti.....	31
2.2. Savremeni koncept u kliničkom pristupu karijesu	32
2.3. Procena rizika za nastanak karijesa.....	33
2.3.1. Utvrđivanje rizika za nastanak karijesa	33
2.3.2. Karijes rizik faktori- <i>karijes rizik indikatori i prediktori karijesa</i>	34
3. NAUČNO RADNA HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	39
4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	41
5. MATERIJAL I METODE.....	43
5.1. Dizajn studije i ispitanici.....	44
5.2. Prikupljanje podataka.....	45
5.2.1. Prikupljanje bazičnih podataka.....	45
5.2.1.1. Anketiranje majki/staraoca ispitanika	45
5.2.1.2. Klinički pregled ispitanika	45
5.2.1.2.1. Procena stanja zdravlja zuba.....	45
5.2.1.2.2. Procena stanja oralne higijene	46
5.2.1.3. Određivanje pH nestimulisane pljuvačke	46

5.2.1.4. Određivanje salivarne koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37	46
5.2.2. Praćenje promene karijes statusa ispitanika	49
5.3. Statistička obrada podataka.....	50
5.4. Institucije u kojima je istraživanje sprovedeno	51
6. REZULTATI.....	52
6.1. Rezultati studije preseka	53
6.1.1. Karakteristike ispitanika	53
6.1.2. Učestalost karijesa zuba ispitanika	53
6.1.3. Karijes rizik indikatori u dečjem uzrastu.....	57
6.1.3.1. Analiza značaja HNP-1, hBD-2, LL-37 i pH nestimulisane pljuvačke kao karijes rizik indikatora	57
6.1.3.2. Sociodemografske karakteristike i higijensko-dijeteske navike kao karijes rizik indikatori u dečjem uzrastu	64
6.2. Rezultati jednogodišnje studije praćenja.....	67
6.2.1. Godišnji priraštaj karijesa	67
6.2.2. Prediktori karijesa u dečjem uzrastu.....	71
6.2.2.1. Analiza karijes prediktivnog značaja HNP-1, hBD-2, LL-37 i pH nestimulisane pljuvačke.....	71
6.2.2.2. Karijes prediktivni značaj sociodemografskih karakteristika i higijensko-dijetetskih navika u dečjem uzrastu.....	72
7. DISKUSIJA.....	78
7.1. Koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke u dečjem uzrastu	80
7.2. Korelacija koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37 peptida i pH nestimulisane pljuvačke	82
7.3. Značaj HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke kao karijes rizik indikatora u dečjem uzrastu.....	84
7.4. Karijes prediktivni značaj HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke u dečjem uzrastu	86
7.5. Značaj HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke kao karijes rizik biomarkera u dečjem uzrastu.....	89
8. ZAKLJUČAK	91
9. LITERATURA	94
10. PRILOG	113
11. BIOGRAFIJA AUTORA.....	118
IZJAVE AUTORA	120

1. UVOD

Kao jedno od najučestalijih oralnih oboljenja, karijes širom sveta još uvek predstavlja veliki socio-ekonomski i javno-zdravstveni problem¹, zbog čega primarna prevencija ovog oboljenja ostaje imperativ stomatološke struke.

Suočavajući se sa karijesom i njegovim komplikacijama, čoveku je rano postalo jasno da je poznavanje uzroka nastanka karijesa nužan preduslov efikasne borbe protiv ovog oboljenja². Prva tumačenja su bila primitivna, ali su prateći razvoj civilizacije podlegla značajnim promenama. Prekretnicu u tumačenju etiopatogeneze karijesa označila je Miller-ova hemijsko-parazitarna teorija iz 1889. godine³. Iako je već tada sugerisana infektivna etiologija oboljenja, prvi direktni dokaz tome je tek 1960. godine dala studija Keyes-a⁴, inicirajući dalja istraživanja, koja su rasvetlila ulogu mikroorganizama u nastanku karijesa, i doprinela razumevanju etiopatogeneze ovog oboljenja. Danas se zna da je karijes kompleksno, progresivno, multikauzalno oboljenje, infektivne prirode, direktno zavisno od ishrane^{2,5}.

Razjašnjenje etiopatogeneze karijesa posledično je uslovalo i promenu u načinu borbe, pomerajući težište sa tradicionalnog hirurško-konzervativnog na preventivni pristup. Savremenim kliničkim pristupom karijesu, jasno je istaknut značaj procene rizika za nastanak karijesa kao bazičnog preduslova efikasne prevencije oboljenja⁶. Iako su identifikovane mnoge varijable koje mogu biti od značaja u proceni karijes rizika, istraživanja u ovoj oblasti su i dalje aktuelna i usmerena na identifikaciji takvih faktora koji će na jednostavan način omogućiti otkrivanje karijes rizičnog deteta pre pojave bolesti. Zbog infektivne prirode oboljenja, ovakve varijable između ostalog treba tražiti i među mnogobrojnim neimunoglobulinskim antimikrobnim proteinima pljuvačke, koji kao integralne komponente urođene imunosti učestvuju u odbrani domaćina od invazije kariogenim mikroorganizmima. Nedavno je sugerisano da bi u proceni karijes rizika dece od značaja mogli da budu defenzini i katelicidin pljuvačke⁷⁻⁹, katjonski antimikrobni peptidi koji složenim mehanizmom antimikrobnog dejstva doprinose biološkoj kontroli karijesa¹⁰. Međutim, u dostupnoj literaturi nema pouzdanih podataka o njihovoj efikasnosti kao karijes rizik biomarkera u dečjem uzrastu, zbog čega je to bio i osnovni cilj sprovedene jednogodišnje prospektivne studije u okviru ove doktorske disertacije.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Savremeno shvatanje etiopatogeneze karijesa

Karijes je jedno od deset najzastupljenijih oboljenja u dečjem uzrastu. U ranom detinjstvu, u zavisnosti od uzrasta i ispitivane populacije dece, njegova učestalost se kreće u rasponu od 2,1% u Švedskoj do 85,5% u pojedinim ruralnim delovima Kine^{11,12}, dok se u starijem školskom uzrastu i ranoj adolescenciji učestalost karijesa u mnogim delovima sveta kreće u rasponu od 60 do 90%^{1,13}. Prema još uvek aktuelnim podacima kod trogodišnjaka u Srbiji učestalost karijesa iznosi 30%, dvanaestogodišnjaka 86%, a kod petnaestogodišnjaka 88,7%, pri čemu svaki dvanaestogodišnjak u proseku ima 2,8, a svaki petnaestogodišnjak 5,56 stalnih karijesnih, ekstrahovanih, plombiranih zuba¹⁴.

2.1.1. Definicija karijesa

Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je 1972. godine karijes definisala kao „lokalizovani, posteruptivni patološki proces, praćen razmekšanjem tvrdih zubnih tkiva i stvaranjem šupljine u zubu“¹⁵. Tada je istaknuto da je bolest centripetalnog smera napredovanja, ireverzibilnog karaktera i da može usloviti komplikacije u pulpi, parodontalnim tkivima, ugrožavajući udaljena tkiva i organe, pa i sam život čoveka. Ubrzo je shvaćeno da je na ovaj način bila definisana karijesna lezija, koja predstavlja terminalni ishod karijesnog procesa i znak uznapredovale bolesti^{16,17}. Istraživanja koja su potom usledila dovela su do kompletnog rasvetljenja etiopatogeneze ovog oboljenja i promene u njegovoj definiciji. Prema savremenom shvatanju karijes predstavlja „multikauzalno, multifazno, reverzibilno oboljenje tvrdih zubnih tkiva, infektivne prirode direktno zavisno od ishrane“².

2.1.2. Etiologija karijesa

Karijes je transmisivno oboljenje koje nastaje kao rezultat interakcije kariogenih mikroorganizama i fermentabilnih ugljenih hidrata koja se tokom vremena odvija na površini zuba⁵. Zato *zub* kao domaćin, *mikroorganizmi* kao uzročnici i *ugljeni hidrati* kao supstrat u etiologiji karijesa imaju značaj primarnih faktora. Kako je vremenski period koji zub provede u kariogenoj sredini direktno proporcionalan verovatnoći da će doći do pojave karijesne lezije, ovim faktorima je pridodat i četvrti faktor-vreme⁶.

Osim primarnih, za nastanak, tok i progresiju karijesa od značaja su i brojni drugi faktori, koji imaju karakter sekundarnih faktora, čineći etiologiju ove bolesti multikauzalnom i prilično kompleksnom.

2.1.2.1. Primarni faktori u etiologiji karijesa

Faktor domaćin-zub: U karijesnom procesu zub se ponaša pasivno, zbog čega su mnogo značajnije promene sredine u kojima se on nalazi.

Faktor uzročnik-mikroorganizmi: Karijes pripada grupi oboljenja izazvanih dentalnim biofilmom¹⁸⁻²⁰. Dentalni biofilm (dentalni plak) je stečena, opalescentna naslaga, koja se taloži na svim površinama zuba. Njegovo formiranje je višefazni proces koji počinje taloženjem baznih gliokoproteina pljuvačke i stvaranjem dentalne pelikule, iza čega sledi inicijalna, a zatim i sekundarna kolonizacija mikroorganizmima praćena sazrevanjem dentalnog biofilma, koji se odvija između 7. i 9. dana od početka njegovog stvaranja. Dentalni biofilm predstavlja organizovanu mikrobiološko-ekološku zajednicu u kojoj se odvijaju brojni metaboločki procesi koji iniciraju nastanak karijesa, a čiji nosioci su kariogeni mikroorganizmi²¹. Procenjuje se da se u biofilmu nalazi oko 750 bakterijskih vrsti, ali više od 50% njih još uvek nije moguće izolovati i kultivisati standardnim tehnikama^{22,23}.

Postavljene su tri hipoteze o značaju biofilma za razvoj karijesnog procesa:

1. Hipoteza specifičnog dejstva biofilma koju je postavio Loesche²⁴ 1976. godine, po kojoj su od brojnih bakterijskih kolonija prisutnih u dentalnom biofilmu, za nastanak i razvoj karijesnog procesa odgovorne samo pojedine vrste;
2. Theilade-ova hipoteza nespecifičnog dejstva biofilma²⁵ iz 1986. godine, po kojoj je karijes posledica interakcije svih bakterijskih vrsti prisutnih u zajednici;
3. Ekološka hipoteza po Marsh-u iz 2003. godine²⁶, po kojoj karijes nastaje kao posledica poremećene ravnoteže između bakterijskih populacija biofilma usled promena u lokalnoj sredini.

Prema još aktuelnoj hipotezi specifičnog dejstva dentalnog biofilma, od brojnih detektovanih bakterijskih vrsti, za nastanak i progresiju karijesnog procesa odgovorne samo pojedine, u prvom redu *Streptococcus* spp, *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp²⁷.

Krucijalnu ulogu u etiopatogenezi karijesa imaju *Streptococcus mutans* vrste, na šta su 1976. godine ukazali Loesche i sar.²⁴. Smatraju se najkariogenijim bakterijama, pre svega *S. mutans* i *S. sobrinus* vrste^{18,21,28}, čiji kariogeni potencijal proizilazi iz sposobnosti da: (1) u prisustvu saharoze pod dejstvom glukozil transferaza sintetišu ekstracelularne polisaharide odgovorne za adheziju bakterija; (2) proizvode mlečnu kiselinu, odgovornu za demineralizaciju gleđi; (3) produkuju intracelularne polisaharide, energetska rezervu u slučaju deficita supstrata. Acidurične su, i mogu da opstanu i pri pH 4 zahvaljujući sposobnosti produkcije ATP-aza koje pomažu u redukciji intracelularne kiselosti. *S. mutans* može da pojača kolonizaciju bakterija u prisustvu saharoze, pokazujući veću aciduričnost u odnosu na druge streptokoke²⁹. Kolinizacija usne duplje *S. mutansom* počinje sa nicanjem zuba, i najintenzivnija je u između 19. i 31. meseca života koji su Caufield i sar. nazvali „prozor infektivnosti“³⁰. Ovaj mikroorganizam se najčešće prenosi vertikalnom transmisijom, ali je opisana i mogućnost horizontalne transmisije.

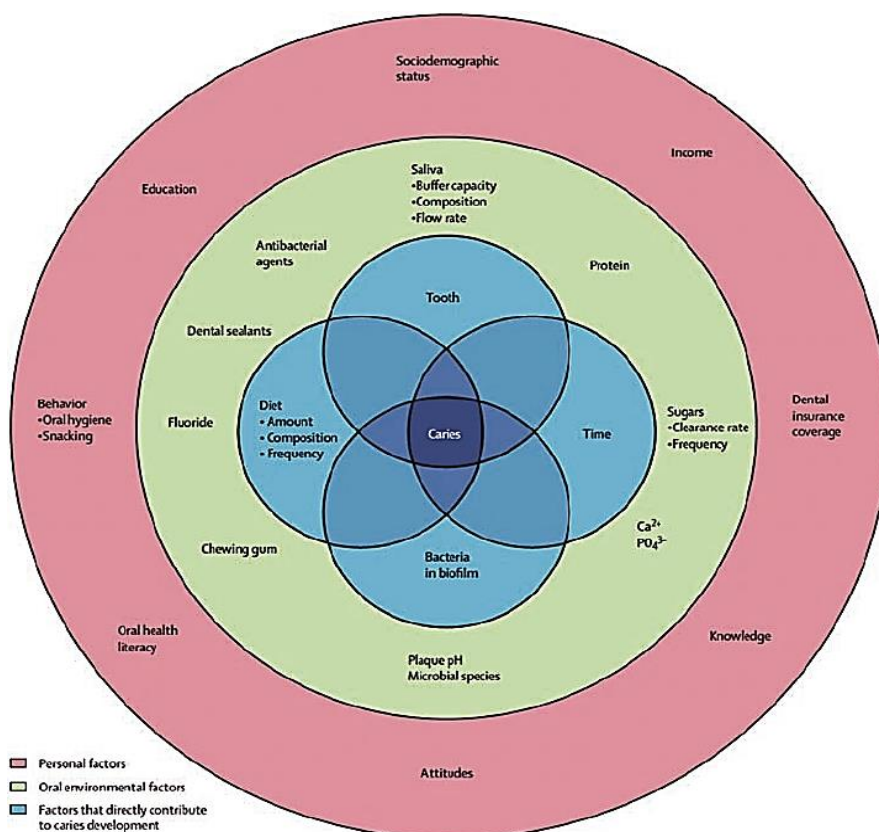
Lactobacillus vrste površinu zuba naseljavaju kasnije i metaboličkim aktivnostima doprinose procesu demineralizacije zuba²⁶. *Actinomyces* vrste se nalaze na površini eksponiranog korena zuba i u zreloom dentalnom biofilmu³¹. Ostali mikroorganizmi imaju manju adhezivnu sposobnost, ali su mnogi od njih ipak acidogeni i acidurični, čime doprinose procesu demineralizacije²⁸.

Istraživanja novijeg datuma su pokazala da dugotrajno dejstvo kisele sredine remeti ekološki sastav biofilma, dovodeći do nestanka bakterijskih vrsta koje ne mogu da prežive u kiseljoj sredini uz istovremeno razmnožavanje acidogenih i aciduričnih vrsti⁶. Li i sar.³² su kod osoba bez karijesa detektovali veći broj bakterijskih vrsti u odnosu na osobe sa aktivnim karijesom, što objašnjavaju time da mnoge bakterijske vrste nisu sposobne da prežive uslove niske pH sredine koja vlada u kariogenim plakama. Ovo ide u prilog ekološke hipoteze po kojoj nije bitno koje su bakterijske vrste prisutne u biofilmu, već kako se ponašaju u izmenjenim uslovima sredine kao što je promena pH, što je uslovalo preispitivanje aktuelne hipoteze specifičnog dejstva biofilma, i ukazalo na to da su patogenetski mehanizmi nastanka karijesa kompleksniji nego što se mislilo⁶.

Faktor supstrat-ishrana: Uloga mikroorganizama u direktnoj je zavisnosti od ishrane pre svega bogate saharozom, koja povećava stopu rasta kariogenih mikroorganizama i menja sastav oralne mikroflore, čime utiče na tok karijesnog procesa.

2.1.2.2. Sekundarni faktori u etiologiji karijesa

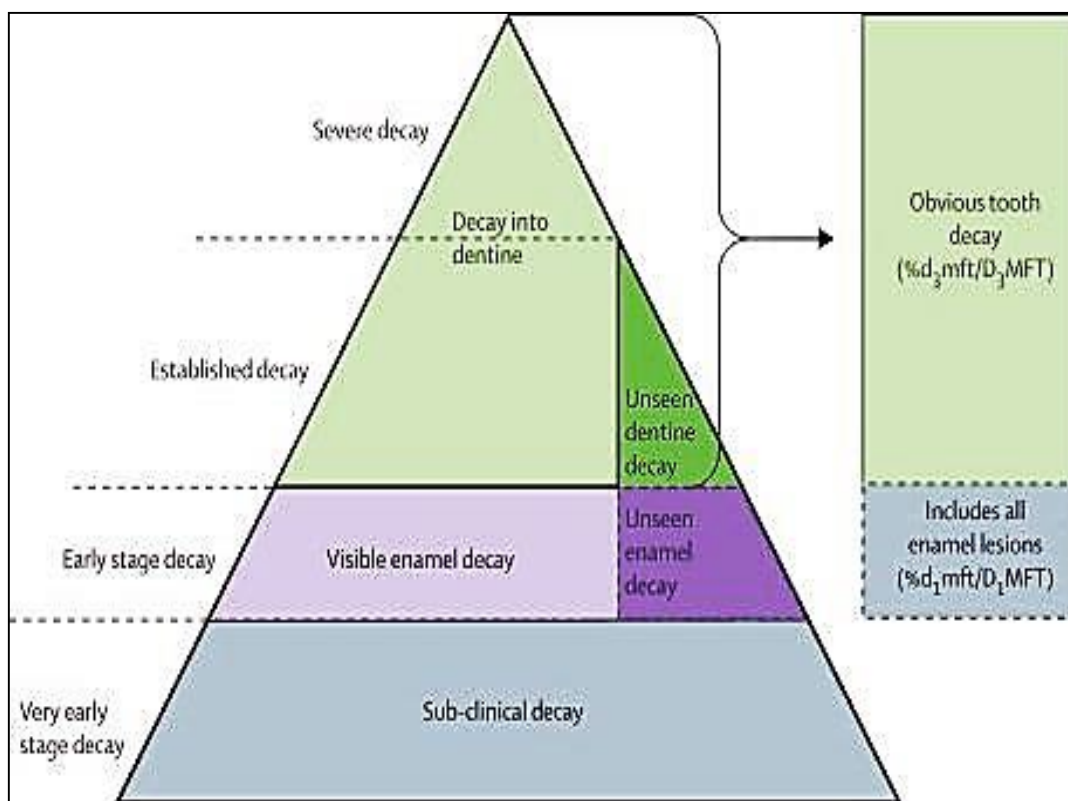
Sekundarni faktori u etiologiji karijesa mogu imati karakter favorizujućih ili odbrambenih faktora, i značajno mogu uticati na tok i progresiju karijesnog procesa. Mogu biti vezani za domaćina (sastav i struktura zuba, sastav i osobine pljuvačke, pol, nasleđe, trudnoća, dojenje, sistemske bolesti...), uzročnik (dentalni biofilm, oralna higijena) i/ili supstrat (sastav i osobine hrane, frekventnost unosa hrane...)^{2,33}. Mogu da potiču iz tzv. „oralnog okruženja“, kao što su faktori vezani za sastav i osobine pljuvačke, ili da pripadaju tzv. „personalnim“ faktorima poput sociodemografskih karakteristika, navika, ekonomskog statusa, psihološkog profila i sl., koji imaju indirektni uticaj na pojavu i tok karijesnog procesa (Slika 1)¹⁶.



Slika1. Ilustracija faktora odgovornih za nastanak i progresiju karijesa (Selwitz i sar.¹⁶)

2.1.3. Patogeneza karijesa

Karijes je progresivno oboljenje, čije se napredovanje kreće od subkliničkih promena na molekularnom nivou pa sve do lezija u dentinu, sa ili bez kavitacije (Slika 2).



Slika 2. Šematski prikaz razvoja karijesne lezije-Iceberg model (Selwitz i sar.¹⁶)

Karijesni proces se odvija u biosistemu pljuvačka-dentalni plak/biofilm-površina gleđi. Usled interakcije kariogenih mikroorganizama i fermentabilnih ugljenih hidrata, koja se odvija na površini zuba, dolazi do stvaranje slabih organskih kiselina koje uzrokuju pad pH vrednosti u plakovnom fluidu. Kada on padne ispod kritične vrednosti od 5,5, dolazi do rastvaranja kristala hidroksiapatita gleđi, izlaska jona Ca^{2+} i PO_4^{3-} i početne demineralizacije gleđi.

U tečnoj fazi između gleđi i plaka, pri neutralnoj pH, postoji ravnoteža između procesa de i remineralizacije. Tokom dana, ovi procesi se ciklično smenjuju i u uslovima njihove ravnoteže nema početka karijesnog procesa. Međutim, kada se u biosistemu

poremeti ravnoteža između patoloških i protektivnih faktora, odnosno kada se kompenzatorni mehanizmi, koji imaju za cilj da očuvaju zdravlje zuba, istroše, remeti se i ravnoteža između ovih procesa³⁴⁻³⁶. Tada počinju da preovladavaju demineralizacioni procesi praćeni pojačanim izlaskom jona sa površine gleđi uslovljavajući pojavu subpovršinske karijesne lezije-„bele mrlje“. Početna demineralizacija počinje na molekularnom nivou u kristalnoj strukturi gleđi i u ovoj fazi proces je reverzibilnog karaktera³⁷. Ukoliko se u biosistemu i na površini kristala nađe dovoljna koncentracija jona F^- , Ca^{2+} i PO_4^{3-} , oni će svojom adsorpcijom za površinu kristala inhibirati dalju demineralizaciju i istovremeno omogućiti proces remineralizacije³⁸. Ukoliko ne dođe do remineralizacije početne karijesne lezije, demineralizacioni proces se nastavlja uslovljavajući sve veći izlazak jona, i kako nema kompenzacije „izvučenih jona“, kristalna rešetka slabi i u jednom trenutku pod dejstvom mastikatornih sila dolazi do njenog pucanja i pojave kavitacije-kliničke manifestacije karijesnog procesa uz mogućnost njegovog daljeg napredovanja^{37,39}.

2.1.4. Uloga pljuvačke u etiopatogenezi karijesa

Pljuvačka (*Saliva*) je beličasta, penušava i viskozna tečnost otužnog mirisa i bez ukusa. Predstavlja mešavinu sekreta tri para velikih pljuvačnih žlezda, velikog broja malih pljuvačnih žlezdi usne duplje i gingivalne tečnosti. U procesu sekrecije, ultrafiltracijom krvne plazme najpre nastaje primarna pljuvačka, koja je izotonična sa krvnom plazmom. Ona prolazi kroz sistem sabirnih i odvodnih kanalića, u kojima dolazi do resorpcije i sekrecije sastojaka, stvarajući definitivnu pljuvačku koja se putem izvodnih kanala izliva u usnu duplju i mešajući se oralnim sekretima, bakterijama, ostacima hrane stvara mešovitu-celokupnu pljuvačku.

Sa aspekta biohemijskog sastava, porekla i vremena kada se luči, razlikuju se dva tipa pljuvačke: stimulisana i nestimulisana. Nestimulisana pljuvačka je u kvantitativnom pogledu u najvećoj meri produkt submandibularne žezde (65%). Njena pH varira u rasponu od 6,1 do 7,5. Stimulisana pljuvačka je gotovo u potpunosti proizvod sekrecije parotidnih pljuvačnih žlezdi i predstavlja neposredan odgovor na nadražaj. Njena pH vrednost se kreće u rasponu od 6,3 do 8.

Kako se karijesni proces odvija u biosistemu pljuvačka-biofilm/plak-površina gleđi, nedvosmisleno je da pljuvačka ima ogroman značaj u etiopatogenezi karijesa zbog čega joj se pripisuje i značaj esencijalnog faktora⁴⁰. Ovakav doprinos ostvaruje svojim fizičko-hemijskim svojstvima i sastavom.

Količina izlučene pljuvačke u toku 24 h varira. Dnevno se izluči 700–800 ml. Prosečna brzina lučenja nestimulisane pljuvačke iznosi 0,5 mL/min, a stimulisane 1-2 mL/min. Lučenje male količine, guste, viskozne pljuvačke se standardno povezuje sa većom prijemčivošću osobe na karijes.

Sastav pljuvačke je uslovljen većim brojem faktora kao što su tip pljuvačke, pol, doba dana, starost. U osnovi 99% pljuvačke čini voda, dok 1% čine komponente neorganske prirode (Ca, Na, K, Cl, fosfati, S, Mg, J, Br, NH₄, Cu i Fe) i organske prirode (proteini, ugljeni hidrati, masti, enzimi, vitamini i hormoni)⁴⁰.

Jedna od najznačajnijih uloga pljuvačke u etiopatogenezi karijesa je njena uloga u procesu remineralizacije, koja je u direktnoj zavisnosti od jonskog sastava pljuvačke i njihove salivarne koncentracije. Pljuvačka predstavlja prezasićeni rastvor kalcijuma i fosfata, ali i drugih jona, što predstavlja barijeru za proces demineralizacije i obezbeđuje proces remineralizacije. Precipitacijom minerala iz pljuvačke na površinu gleđi, ona postaje slabije rastvorljiva i otpornija na dejstvo kariogenih noksi.

Uloga pljuvačke u etiopatogenezi karijesa nije limitirana samo na njenoj remineralizacionoj funkciji, već ona svojim fizičkim, hemijskim i antibakterijskim svojstvima značajno utiče na karijesni proces.

Fizička uloga pljuvačke se ogleda u funkciji eliminacije ostataka hrane i lubrikantnoj ulozi. Osim toga, lipidi pljuvačke sprečavaju agregaciju i aglutinaciju oralnih bakterija, uključujući i kariogene patogene. Fizička uloga pljuvačke je u direktnoj vezi sa njenim viskozitetom koji je određen prisustvom mucina, salivarnog proteina.

Hemijska protektivna uloga pljuvačke se zasniva na njenom puferskom kapacitetu koji predstavlja sposobnost pljuvačke da se odupre promeni pH. Primarni puferski sistem pljuvačke čine bikarbonati, kao dominantni puferi stimulisane pljuvačke, i fosfati, koji predstavljaju dominantne pufere nestimulisane pljuvačke. Puferski sistem pljuvačke čine i proteini i urea, kao i salivarna amilaza i fluoridi koji čine tzv. preventivne pufere pljuvačke.

Protektivna uloga pljuvačke ogleda se i u njenim antibakterijskim svojstvima, i ostvaruje je uglavnom bazična-nestimulisana pljuvačka, komponentama organske prirode. Vodeću ulogu u ovoj aktivnosti imaju proteini, a u daleko manjoj meri i lipidi, koji učestvuju u zaštiti usne duplje od kolonizacije mikroorganizmima i sprečavaju poremećaj ravnoteže normalne oralne flore⁴¹.

Antibakterijska uloga pljuvačke je usmerena i na kariogene mikroorganizme, i može biti nespecifična i specifična². Nosioci nespecifične antibakterijske uloge pljuvačke su neimunoglobulinski antimikrobni proteini, dok su nosioci specifične antibakterijske uloge imunoglobulini pljuvačke.

2.1.4.1. Salivarni antimikrobni proteini urođene imunosti

Neimunoglobulinski antimikrobni proteini pljuvačke su integralne komponente urođene imunosti usne duplje i predstavljaju prvu liniju odbrane usne duplje od invazije mikroorganizmima. Klasifikovani su u šest funkcionalnih klasa i rangirani od malih katjonskih peptida do velikih aglutinirajućih proteina (Tabela 1).

Tabela 1. Funkcionalne klase neimunoglobulinskih antimikrobnih proteina pljuvačke (Gorr i Abdolhosseini ⁴²)

	Katjonski peptidi	Bakterijski aglutinini i adhezini	Helatori metalnih jona	Peroksidaze	Inhibitori proteaze	Aktivnost protiv zida bakterijske ćelije
1	Adrenomedulin	β -2-mikroglobulin	Kalgranulin A	Laktoperoksidaza	Cistatini	Lizozim C
2	Azurocidin	Fibronektin	Kalgranulin B	Salivarna peroksidaza		Peptidoglikani
3	Defenzini	Mucin 7	Laktoferrin	Mijeloperoksidaza		
4	Kalcitonin	Prolinom bogati protein	Laktotransferin			
5	Katelacidin	Salivarni aglutinini	Transferin			
6	Histatini	Surfaktant protein A	Psoriazin			
7	Staterin					
8	Neuropeptid Y					
9	Vazoaktivni peptid					
10	Supstanca P					

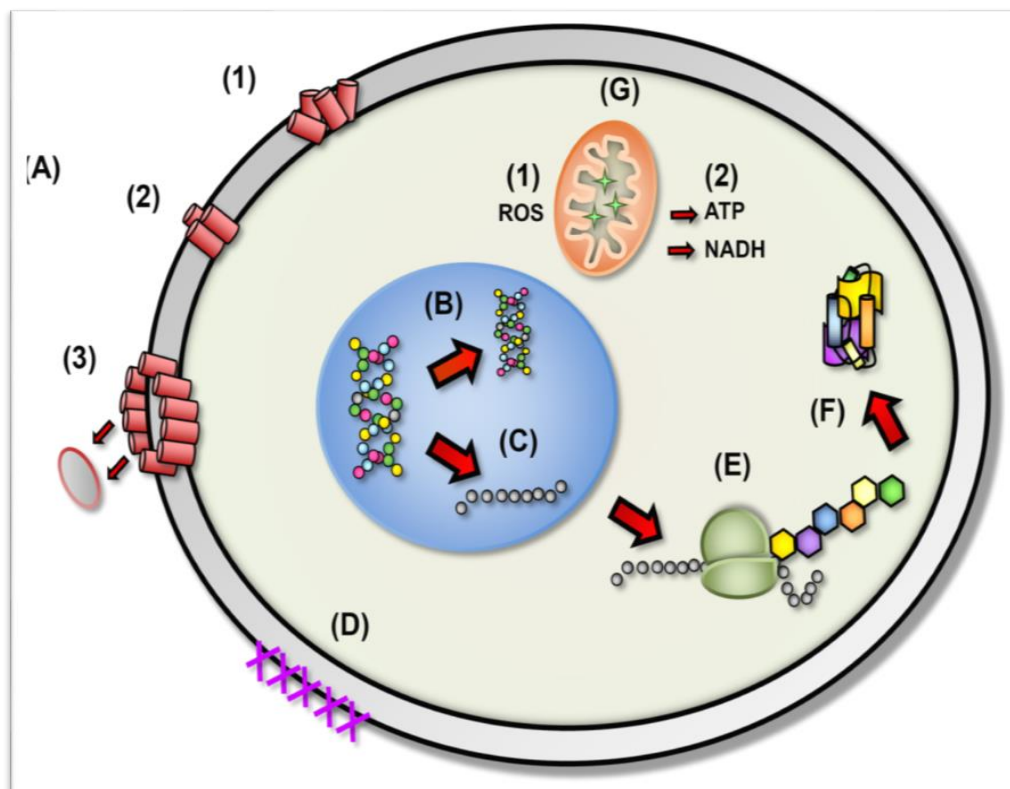
Svaka funkcionalna klasa ovih proteina ima specifičan mehanizam antimikrobnog dejstva. Helatori metalnih jona inhibiraju rast bakterija uklanjajući dvovalentne jone, dok peroksidaze katalizuju oksidaciju tiocijanatnih jona stvarajući baktericidni proizvod-hipotocijanat⁴³. Antimikrobno dejstvo mogu da ostvare samostalno ili međusobnim sinergističkim dejstvom⁴⁴.

2.1.4.1.1. Katjonski antimikrobni peptidi

Katjonski antimikrobni peptidi su mali peptidi izgrađeni iz 12 do 50 aminokiselina⁴⁵. Pri fiziološkim pH vrednostima sredine nosioci su pozitivnog naelektrisanja koje potiče od viška baznih (arginin, lizin, histidin) u odnosu na kisele amino-kiselinske rezidue⁴⁵⁻⁴⁸. Karakteriše ih trodimenzionalna amfifilna struktura, u kojoj su pozitivni i hidrofilni domeni koji stupaju u reakciju sa vodom ili negativno naelektrisanim reziduama, dobro odvojeni od hidrofobnih domena koji intereaguju sa lipidima⁴⁹. Mada pokazuju razlike u u 3-D strukturi, svi katjonski antimikrobni peptidi imaju slične fizičko-hemijske karakteristike⁵⁰.

Pokazuju sva tri vida antimikrobne zaštite (antibakterijsku, antivirusnu, antimikotičnu), ali je ona u usnoj duplji najviše usmerena na Gram pozitivne (G+) i Gram negativne (G-) bakterije, uključujući i kariogene i parodontopatogene bakterije^{51,52}. Bakterije ubijaju veoma brzo, delujući kao jaki baktericidi i/ili bakteristatici. Razlika između minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije ovih peptida je veoma mala⁴⁹, i shodno tome i razlika između njihovog bakteriostatskog i baktericidnog dejstva.

Kompletan mehanizam antibakterijskog dejstva ovih peptida još uvek nije dovoljno poznat. Antibakterijsko dejstvo ostvaruju direktnim delovanjem na bakterije, ali i sposobnošću da različitim mehanizmima stimulišu/moduliraju stečeni imuni odgovor. Direktnu antimikrobnu aktivnost, usmerenu na bakterije, ostvaruju ekstracelularnim i intracelularnim mehanizmom (Slika 3).



Slika 3. Šematski prikaz direktnog antibakterijskog dejstva katjonских antimikrobnih peptida (Peters i sar.⁵⁰): (A) – Narušavanje integriteta ćelijske membrane; (1)- slučajna insercija u membranu ćelije; (2)- poravnanje hidrofobnih sekvenci; (3) uklanjanje delova membrane i formiranje pora; (B)- Inhibicija sinteze DNK; (C)- Blokiranje sinteze RNK; (D)- Inhibicija enzima neophodnih za vezivanje za strukturne proteine ćelijskog zida; (E)-Inhibicija funkcije ribozoma i sinteze proteina; (F)- Blokiranje enzima neophodnih za pravilno pakovanje proteina; (G)- Ciljanje mitohondrija; (1) – inhibicija ćelijskog disanja i inhibicija formiranja ROS-a; (2)- poremećaj integriteta membrane mitohondrija i izlazak ATP i NADPH

U osnovi ekstracelularnog mehanizma delovanja stoji jaka elektrostatička privlačnost između katjonских antimikrobnih peptida i bakterijske ovojnice, usled čega oni stupaju u interakciju sa lipopolisaharidima G- bakterija i tehoičnom kiselinom G+ bakterija, kao i negativno naelektrisanom unutrašnjom membranom i G+ i G- bakterija. Nakon inicijalne interakcije dolazi do vezivanja katjonских antimikrobnih peptida za površinu membrane bakterija, agregacije peptida na membrani bakterija i formiranja kanala i transmembranskih pora uslovljavajući osmolizu i ćelijsku smrt^{51,53}. Opisana su tri modela formiranja pora (barrel-stave pore, thoroidal pore i carpet model)⁵⁴⁻⁵⁶. Antibakterijsko dejstvo ostvaruju i intracelularnim mehanizmima i to inhibicijom

intracelularnih procesa unutar bakterije pre svega inhibicijom enzimske aktivnosti i inhibicijom sinteze ćelijskog zida, DNK, RNK i proteina⁵³.

Osim direktne antimikrobne aktivnosti, utvrđeno je da katjonski antimikrobni peptidi mogu da utiču i na stečeni imuni odgovor. Smatra se da mogu da stimulišu produkciju proinflamatornih citokina, imunoglobulina klase A i G (IgA, IgG) delujući kao hemoatraktanti za T ćelije, nezrele dendritične ćelije, B ćelije, neutrofile i makrofage čime pojačavaju stečenu imunost⁵⁷⁻⁵⁹.

Antimikrobnu aktivnost mogu da ostvare samostalno ili sinergističkim delovanjem sa ostalim antimikrobnim peptidima i proteinima. Osim antimikrobne, poseduju i antiinflamatornu i antikancersku ulogu⁴⁶.

Najznačajniji predstavnici funkcionalne klase katjonskih antimikrobnih peptida usne duplje su: defenzini, katelicidini, kalcitonin, histatini, staterini, adrenomedulin, azurocidin, supstanca P, neuropeptid Y, vazoaktivni intestinalni peptid (Tabela 1).

2.1.4.1.1.1. Defenzini i katelicidini

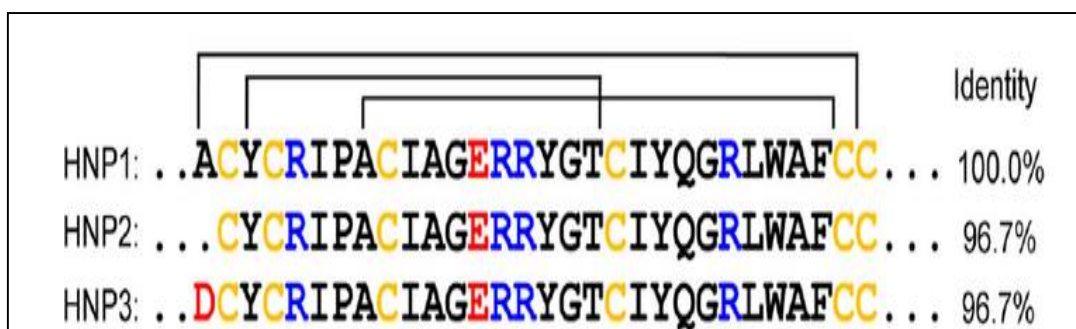
2.1.4.1.1.1.1. *Struktura i distribucija humanih oralnih defenzina*

Defenzini su mali niskomolekularni peptidi (3-5 kDa) β -naborane strukture, katjonske elektroforetske pokretljivosti, izgrađeni iz 12-50 aminokiselina. Okarakterisani su prisustvom 6 do 8 cisteinskih rezidua vezanih sa 3-4 intramolekularne disulfidne veze^{60,61}.

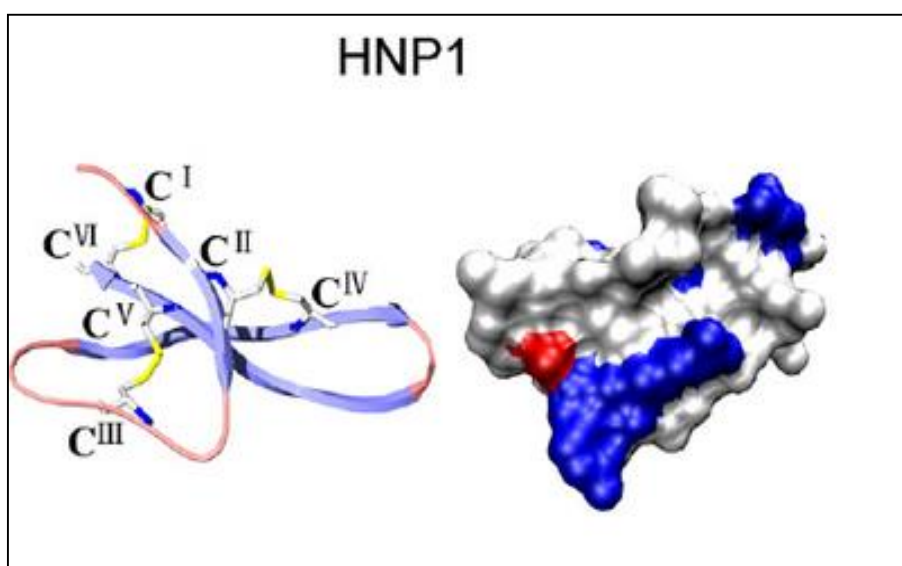
Od tri subfamilije defenzina (α , β i θ), u humanoj populaciji su izolovane samo dve- α i β defenzini⁶². Lokus za α i β defenzine je smešten na 8p21-23 hromozomima^{48,59,63}. U procesu sinteze α i β defenzina, najpre se stvara preprodefenzin, od koga se proteolizom odvaja N-terminalni, a ostaje C-terminalni-definitivni peptid katjonske elektroforetske pokretljivosti.

Klasični ili α defenzini su izgrađeni iz 29-35 aminokiselina. To su argininom bogati peptidi sa disulfidnim mostovima koji povezuju cisteinske residue (disulfidne veze 1-6, 2-4 i 3-5). Humani α defenzini su primarno eksprimirani u neutrofilima, zbog čega se nazivaju i humani neutrofilni peptidi (*human neutrophil peptides-HNP (engl.)*)⁴⁶, ali

moгу ih mogu eksprimirati i monociti, makrofagi, ćelije ubice, neki T i B limfociti, nezrele dendritične ćelije⁶⁴. U humanom organizmu identifikovano je 6 α -defenzina označenih kao humani α defenzin 1 (HNP 1), humani α defenzin 2 (HNP-2), humani α defenzin 3 (HNP-3), humani α defenzin 4 (HNP-4), humani α defenzin 5 (HNP-5) i humani α defenzin 6 (HNP-6). U usnoj duplji čovjeka identifikovani su samo mijeloidni α defenzini. Detektovani su u oralnim sekretima, pljuvački i gingivalnoj tečnosti, gdje 99% svih α defenzina čine HNP1-3, dok je koncentracija HNP-4 oko 100 puta manja. HNP1-3 su sličnog amino-kiselinskog sastava, pri čemu HNP-1 i HNP-3 sadrže po 30, a HNP-2 29 amino-kiselinskih rezidua^{48,59,65,66}. Slika 4 prikazuje aminokiselinski sastav HNP 1-3, a Slika 5 strukturu HNP-1.

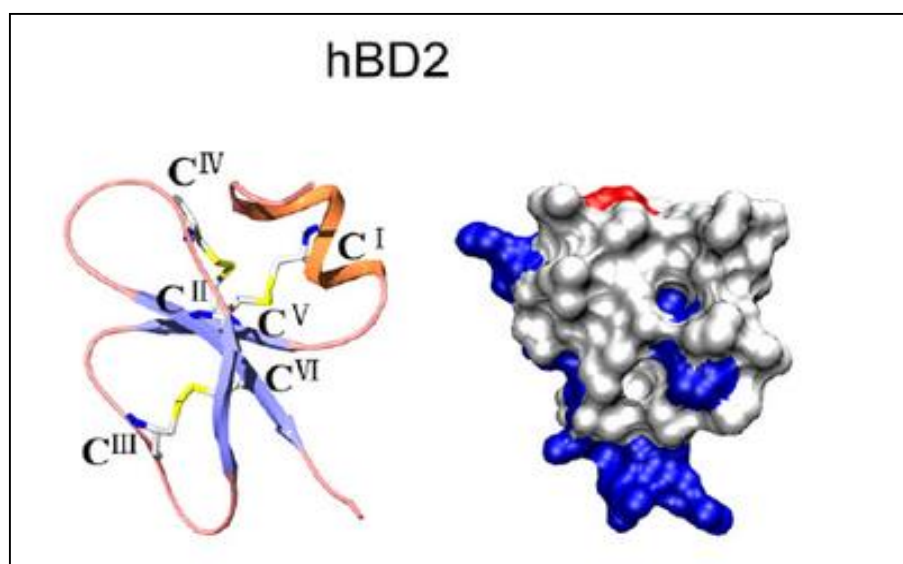


Slika 4. Amino-kiselinski sastav HNP-1, HNP- 2 i HNP-3 (Xie i sar.⁶⁶)



Slika 5. Struktura HNP-1 (Xie i sar.⁶⁶)

β -defenzini su kratki peptidi koji sadrže 41 aminokiselinu. Slično α defenzinima, poseduju β naboranu strukturu i sadrže cisteinske rezidue, ali se od α defenzina razlikuju po njihovom uparivanju (disulfidne veze 1-5, 2-4, 3-6). U usnoj duplji humane β defenzine (hBD) proizvode ćelije oralnog epitela i pljuvačnih žlezdi. Nakon oslobađanja oni dospevaju u oralne sekrete te mogu biti detektovani u pljuvački i gingivalnoj cervikalnoj tečnosti⁴⁸. U usnoj duplji detektovana su 4 humana β defenzina: humani β defenzin 1 (hBD-1), humani β defenzin 2 (hBD-2), humani β defenzin 3 (hBD-3) i humani β defenzin 4 (hBD-4). Sekretija hBD-1 je konstantna, dok sekretija hBD-2, hBD-3 i hBD-4 zavisi od stimulacije i pokazuje varijacije^{67,68}, pri čemu je u tkivima koncentracija hBD-4 daleko manja od koncentracije hBD-1, hBD-2 i hBD-3⁶⁵. U humanojoj oralnoj biologiji najveća pažnja je usmerena proučavanju bioloških funkcija hBD-2 (Slika 6).



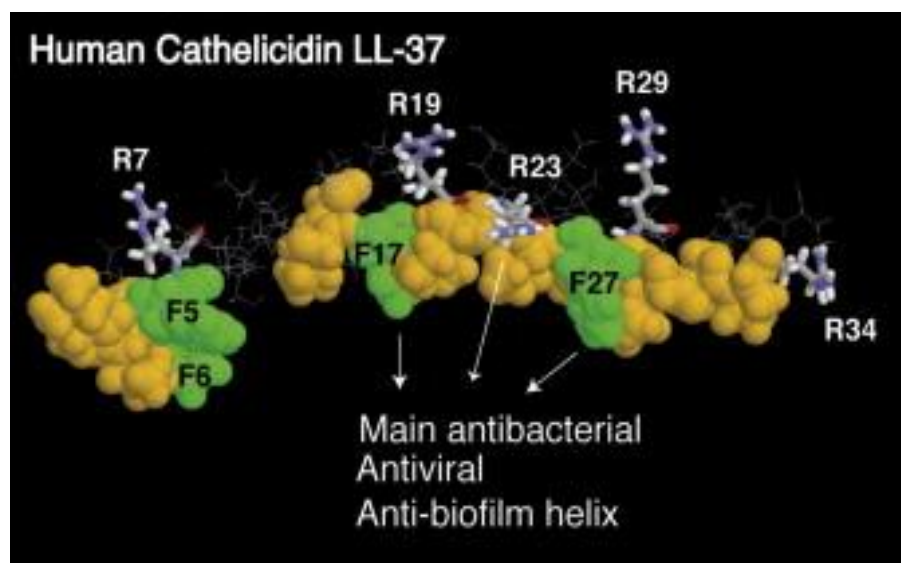
Slika 6. Struktura hBD-2 (Xie i sar.⁶⁶)

2.1.4.1.1.2. Struktura i distribucija humanih oralnih katelicidina

Katelicidini su mali, α spiralni katjonski peptidi, koji za razliku od defenzina ne sadrže amino-kiselinu cistein^{69,70}. Egzoni za katelicidin u humanom genomu se nalaze na 3p21 hromozomu⁷¹. U procesu sinteze katelicidina najpre se stvara proforma katelicidina, od koje se odvaja C terminalni peptid, i nastaje jedina biološki aktivna forma katelicidina

kod čoveka LL-37, koja je naziv dobila po prve dve rezidue (Leucin, Leucin) i tome što je izgrađena iz 37 amino-kiselina (Slika 7).

Oralni katelicidin LL-37 potiče od neutrofila, ali i ćelija oralnog epitela i pljuvačnih žlezdi. Prisustvo katelicidina LL-37 je detektovano u gingivalnoj tečnosti i celokupnoj pljuvački, ali ne i parotidnoj⁷².



Slika 7. Struktura humanog katelicidina LL-37(Wang i sar.⁷⁰)

2.1.4.1.1.3. Salivarna sekrecija defenzina i katelicidina

Ekspresija gena i salivarna sekrecija defenzina i katelicidina indukovana je bakterijskim i inflamatornim agensima i povredama⁴⁵, koji stimulišu oslobađanje proinflamatornih citokina (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8) koji sa svoje strane kompleksnim signalnim putevima stimulišu ekspresiju ovih antimikrobnih peptida i tako uvećavaju njihovu koncentraciju u pljuvački⁷³. Ekspresija ovih peptida u pljuvački je zavisna od mitogen aktiviranih protein kinaza (MAPK) i nuklearnog kappa faktora B (NF κ B) koji utiču na transkripciju gena⁷⁴.

Koncentracija defenzina i katelicidina u pljuvački pokazuje individualne varijacije, zbog čega je vrlo teško govoriti o normalnim-fiziološkim vrednostima salivarnog nivoa ovih peptida. Dosadašnja istraživanja su bila fokusirana uglavnom na

adultnu populaciju, te su podaci o nivou defenzina i katelicidina u pljuvački dece oskudni. Nedavno je istaknuto da nivo katelicidina LL-37 u pljuvački raste sa uzrastom dece⁸, dok za defenzine ovakvih podataka nema.

U dinamičnim sredinama, kao što je pljuvačka, koncentracija aktivnih formi defenzina i katelicidina, može biti uslovljena različitim faktorima, kao što su različiti joni, peptidi i proteini, pH sredine⁷⁵⁻⁷⁷. Istovremeno, ovi faktori iz okruženja mogu da utiču na antimikrobnu aktivnost peptida. Istaknuto je da je pH sredine važan modulator antimikrobne aktivnosti ovih peptida, ali za sada nema pouzadnih podataka kako se pH pljuvačke odražava na salivarnu koncentraciju i antimikrobnu aktivnost ovih peptida.

2.1.4.1.1.4. Uloga defenzina i katelicidina u biološkoj kontroli karijesa

Od svih kariogenih mikroorganizama na dejstvo defenzina i katelicidina najosetljiviji su *S. mutans* i *S. sobrinus*⁷⁸. S druge strane, od svih ovih peptida, najveću specifičnost delovanja usmerenu na *S. mutans*, pokazuje hBD-2, ali je pokazuju i svi α defenzini kao i LL-37 katelicidin⁵².

Dokazano je da defenzini i katelicidini imaju ulogu i u sprečavanju formiranja dentalnog biofilma⁴¹. Istraživanja pokazuju da količina antimikrobnih peptida domaćina može da utiče na kolonizaciju određenih mikroorganizama, koji uključuju i *S. mutans*⁹. Lokalizovana ekspresija hBD-2 u gingivalnim epitelnim ćelijama favorizuje hipotezu da se defenzini sintetišu kako bi učestvovali u odbrani od supragingivalnog, a ne subgingivalnog biofilma⁷⁹.

Osim uloge u sprečavanju formiranja biofilma, defenzini i katelicidin mogu da stimulišu i produkciju citokina, IgA, IgG, povezuju urođeni i stečeni imuni odgovor čime dodatno doprinose kontroli karijesa⁸⁰.

2.1.4.1.1.2. Histatini, staterini, adrenomedulin, azurocidin

Iako histatini prevashodno pokazuju antimikotično dejstvo, smatra se da i oni mogu da inhibiraju kariogene bakterije⁸¹.

Staterini remete kristalizaciju kalcijum fosfata i tako ostvaruju zaštitnu ulogu prilikom formiranja dentalnog plaka. Međutim rezultati istraživanja o povezanosti salivarne koncentracije staterina i prisustva karijesa su oprečni^{82,83}.

Adrenomedulin je zastupljen u gingivalnoj tečnosti, primarnoj i celokupnoj pljuvački i smatra se da su oralne epitelne ćelije značajan izvor ovog peptida⁸⁴. Azurocidin je prisutan u azurofilnim granulama neutrofila. Zbog visokog afiniteta prema lipopolisaharidima njihova antibakterjska uloga je usmerena pre svega na G- bakterije⁴³.

2.1.4.2. Salivarni antimikrobni proteini stečene imunosti

Za razliku od urođene imunosti koja posreduje u ranoj zaštiti od infekcije, stečena imunost se razvija sporije i obezbeđuje kasniju, ali efikasniju, odbranu od infekcije. Pored T ćelija, nosioci specifične antimikrobne zaštite su i imunoglobulini.

Iako je poznato da kariogeni mikroorganizmi stimulišu stvaranje specifičnih antitela, uloga humoralnog imunog odgovora u kontroli karijesa još uvek nije do kraja razjašnjena. Smatra se da najveći značaj imaju imunoglobulini klase A (IgA), i njihova dimerična forma- sekretorni IgA (s-IgA), ali i imunoglobulini klase G (IgG) i klase M (IgM). Uloga s-IgA u zaštiti od karijesa najverovatnije proizilazi iz njihove sposobnosti da kontrolišu rast oralne mikroflore, sprečavaju adheziju patogena, kao i sposobnosti da dezaktiviraju bakterijske enzime i toksine. Međutim, za sada dostupna literatura pokazuje oprečne i nejasne rezultate u pogledu povezanosti s-IgA i prisustva karijesa⁸⁵. Pojedini autori smatraju da su vrednosti s-IgA kod pacijenata prijemčivih karijesu niže zbog njihovog vezivanja za kariogene mikroorganizme, dok drugi smatraju da je porast s-IgA uslovljen imunskim odgovorom⁸⁵.

U pljuvački dece dokazano je prisustvo i antitela na *S. mutans*, ali njihova veza sa prirodnim imunitetom na karijes nije potpuno jasna⁸⁶.

2.2. Savremeni koncept u kliničkom pristupu karijesu

Tokom 20. veka konzervativna sanacija karijesnih zuba u cilju njihove retencije bila je imperativ stomatološke struke, a što je svakako predstavljalo ogroman pomak u odnosu na do tada primenjivanu terapijsku metodu-ekstrakciju zuba. Međutim, tokom ovog perioda epidemiološke studije su pokazivale da je karijes kod dece i dalje glavni uzrok bola i infekcija oralne regije, uzrokujući prerani gubitak zuba, koji za sobom povlači poremećaj funkcija celokupnog mastikatornog aparata, poremećaj socijalne interakcije dece, što uz ekonomsku komponentu značajno doprinosi narušavanju kvaliteta života dece, ali i njihovih čitavih porodica^{16,87-91}. Osim toga, prerani gubitak jednog ili većeg broja zuba narušava i dalji razvoj orofacijalne regije, kao i razvoj celokupnog organizma deteta. Ovakvi podaci su nedvosmisleno sugerisali na neophodnost promene pristupu u zbrinjavanju i borbi protiv ovog oboljenja tvrdih zubnih tkiva.

Promena u shvatanju etiopatogeneze karijesa, sa naglaskom na činjenicu da je karijes oboljenje progresivnog toka, u početnim fazama reverzibilnog karaktera, ukazala je na potrebu da karijes treba sagledati u potpunosti, kao jedan složen proces, a ne samo tretirati kavitaciju, koja predstavlja terminalni ishod karijesnog procesa. Konačno, promena u shvatanju etiopatogeneze karijesa, zajedno sa naučnim i tehnološkim dostignućima u oblasti dijagnostike karijesa i restaurativnih materijala dovela je do željenih promena u borbi protiv ovog oboljenja, pomerajući težište sa tradicionalnog konzervativnog na preventivni pristup^{6,92,93}.

Savremeni koncept u kliničkom pristupu karijesu temelji se na sledećim nivoima:

1. Procena rizika za nastanak karijesa uz individualizovanu prevenciju;
2. Rana dijagnostika početnih karijesnih lezija uz minimalnu invazivnu sanaciju karijesnih lezija;
3. Dijagnostika uznapredovalih lezija sa planom terapije koji uključuje restauraciju lezija i lečenje obolele pulpe;
4. Monitoring karijes rizik statusa pacijenta^{6,94}.

2.3. Procena rizika za nastanak karijesa

Procena rizika za nastanak karijesa se definiše kao proces utvrđivanja verovatnoće da će se kod neke osobe/populacione grupe, tokom određenog vremena, razviti nova karijesna lezija^{95,96}. Osnovni je preduslov razvoja efikasnih mera i strategija za primarnu prevenciju, ali i kontrolu bolesti, i sprovodi se sa ciljem rane identifikacije pojedinca i/ili populacione grupe u povećanom riziku, kako bi se karijes preventivne i profilaktičke mere sprovele pre pojave bolesti^{97,98}.

Značaj procene karijes rizika u prevenciji ove bolesti je dokazan mnogim studijama, ali ga najbolje ilustruju rezultati Axelsson-a i saradnika koji su 1993. godine, u jednoj oblasti Švedske, konstantnim određivanjem rizika za pojavu karijesa, uz odgovarajuću primenu preventivno-profilaktičkih mera i postupaka, uspeali da za dvanaest godina KIp dece snize sa 6,5 na 1⁹⁹.

2.3.1. Utvrđivanje rizika za nastanak karijesa

Proces procene rizika za nastanak karijesa obuhvata identifikaciju karijes rizik faktora, ispitivanje njihovog uticaja na zdravlje zuba i predviđanje progresije/stabilizacije karijesnog procesa praćenjem karijes incidencije^{39,96}.

Poslednjih decenija akcenat je stavljen na individualni preventivni pristup, i shodno tome na individualnu procenu karijes rizik pojedinca. Ovakav pristup je proizašao iz masovne primene fluorida, koja često maskira ulogu ostalih faktora u procesu procene karijes rizika, ali i činjenice da značaj mnogih faktora u velikoj meri zavisi i od uzrasta pacijenta, rase, etničke pripadnosti, kulturoloških navika pojedinca^{6,100}.

Sa aspekta primarne prevencije, mogućnost predviđanja pojave karijesa kod dece koja nisu obolela ima esencijalni značaj. Ovo predstavlja osnovu svih preventivnih stomatoloških programa širom sveta, u kojima je jasno istaknuto da procena rizika za nastanak karijesa treba da bude neizostavni deo procene celokupnog zdravlja dece i da je treba izvršiti u toku prve godine života, pre ili u vreme nicanja prvih zuba, a zatim je periodično ponavljati, jer je rizik za nastanak karijesa tokom vremena sklon promenama⁹⁵. Efikasnost procene karijes rizika u ogromnoj meri je uslovljena poznavanjem pouzadnih karijes rizik faktora.

2.3.2. Karijes rizik faktori-karijes rizik indikatori i prediktori karijesa

Karijes rizik faktori predstavljaju markere za koje je statističkim metodama dokazana povezanost sa pojavom/prisustvom bolesti¹⁰¹. Identifikacija faktora rizika, uzročno povezanih sa pojavom karijesa je od esencijalnog značaja za prevenciju bolesti, jer daje mogućnost kauzalnog dejstva. Međutim, postoje i rizik faktori koji nisu uzročno-posledično povezani sa karijesom, ali koji ipak mogu biti od značaja u prognozi bolesti.

Karijes rizik indikatorima se smatraju varijable za koje je u studijama preseka utvrđeno da se mogu dovesti u vezu sa karijesom, dok se *prediktorima karijesa* smatraju varijable čija je veza sa karijesom potvrđena longitudinalnim studijama¹⁰². Karijes indikatori mogu imati karakter prediktora karijesa ukoliko to longitudinalne studije dokažu, ali je takođe pokazano da to ne mora uvek nužno da bude slučaj. Studije praćenja daju pouzdanije tumačenje povezanosti faktora rizika i pojave karijesa u odnosu na studije preseka. Pouzdanim karijes rizik faktorom bi se mogla smatrati varijabla koja ima značaj indikatora karijes rizika i istovremeno pokazuje karijes prediktivni značaj.

Identifikacija karijes rizik faktora je složena, što proizilazi iz multikauzalne etiologije i kompleksnosti patogeneze oboljenja. Zato se smatra da sve varijable koje su direktno ili indirektno uključene u nastanak i razvoj karijesnog procesa mogu biti od značaja u oblasti procene rizika za nastanak karijesa. Do sada je identifikovano oko 106 potencijalnih karijes rizik faktora¹⁰³, koje su Fontana i sar.⁹⁵ klasifikovali na:

- **Kliničke**-prethodno karijes iskustvo ($\Sigma kep/KEP \geq 1$), gleđni defekti, ortodontske anomalije;
- **Biološke**-genetski uticaj, sastav i osobine dentalnog biofilma, sastav i osobine pljuvačke;
- **Sociodemografske i ekonomske**- pol, rasa, etnička pripadnost, ekonomski standard pojedinca, obrazovni profil, uslovi života;
- **Sredinske**-klima, izloženost fluoridima;
- **Bihevioralne** - temperament pojedinca, tip roditeljstva, higijensko-dijetetske navike;
- **Faktore vezane za roditelje/staraoce dece**, a koji mogu biti od značaja za procenu karijes rizika kod dece - karijes roditelja/staraoaca, navike roditelja.

Ove varijable su studijama preseka pokazale značaj karijes rizik indikatora, ali su longitudinalne studije ukazale na njihov različit karijes prediktivni značaj. Najviši karijes prediktivni nivo je pokazalo prethodno karijes iskustvo¹⁰⁴. Visok prediktivni značaj su pokazali i salivarni nivo *S. mutansa* i *Lactobacillus* spp., unos fluorida, sekrecija, pH i puferski kapacitet pljuvačke, sastav i ferikventnost unosa hrane, količina biofilma¹⁰⁵. Osim toga prediktivni značaj može imati i celokupni utisak koji pacijent ostavlja na stomatologa¹⁰⁶.

Prethodno karijes iskustvo je do sada pokazalo najviši karijes prediktivni nivo, zbog čega mu se pripisuje značaj najmoćnijeg prediktora budućeg karijesa¹⁰⁷. Istraživanja pokazuju da je karijes mlečnih zuba jedan od najjačih prediktora karijesa stalnih zuba^{108,109}. Iako se može u proceni karijes rizika koristiti kao jednostavna, brza, neinvazivna metoda, značaj prethodnog karijes iskustva u ovoj oblasti je dosta ograničen zbog potrebe da se karijes rizična osoba identifikuje pre pojave bolesti.

Salivarni nivo kariogenih mikroorganizama *S. mutansa* i *Lactobacillus* spp. može biti značajan prediktor budućeg karijesa. Salivarni nivo *S. mutansa* snažno je povezan sa pojavom karijesa kod dece i pokazuje visok nivo karijes prediktivnog značaja¹¹⁰⁻¹¹². S druge strane, u predikciji karijesa od značaja mogu biti i *Lactobacillus* spp. Istraživanjem je utvrđeno da godišnji priraštaj karijesa kod dece predškolskog uzrasta, kao i kod ranih adolescenata, pozitivno korelira sa salivarnim nivoom *Lactobacilla*¹¹³. Međutim povezanost salivarnog nivoa ovih mikroorganizama i karijesa još uvek je kontradiktorna. Kako nivo ovih mikroorganizama reflektuje acidogena stanja, on može da služi kao snažan indikator kariogene ishrane¹¹⁴.

Iako dentalni biofilm ima esencijalni značaj u etiologiji karijesa, u istraživanjima su dobijeni oprečni rezultati po pitanju povezanosti indeksa oralne higijene i prisustva karijesa, pri čemu pojedina istraživanja pokazuju da prisustvo naslaga na zubima kod nekih osoba nema veliki karijes prediktivni značaj^{5,108}.

Ishrana bogata kariogenim ugljenim hidratima je takođe jedan od esencijalnih faktora u etiologiji karijesa, ali njen značaj u dijagnostici karijes rizika često može da maskira učestala upotreba fluorida i redovna oralna higijena. Stoga je posmatranje ishrane kao solo karijes prediktora nepouzdan^{115,116}.

U oblasti primarne prevencije karijesa, posebno mesto zauzima primena fluorida zbog svog snažnog kariostatičnog efekta. Aktuelnim protokolom za primenu fluorida u prevenciji karijesa je istaknut značaj lokalne-egzogene primene kod dece uz konstantno prisustvo niskih koncentracija fluorida¹¹⁷. Međutim, u zonama nisko fluorisane vode za piće, uz lokalnu primenu fluorida, vodećim protokolom preporučuje se i dopunska, sistemska primena fluorida. Zbog snažnog kariostatičnog efekta, većina modela za procenu karijes rizika u obzir uzima i primenu fluorida prema važećem protokolu.

Varijable vezane za oralnu higijenu, ishranu i primenu fluorida često ne pokazuju visok karijes prediktivni značaj kao solo faktori. Stoga je preporuka gotovo svih udruženja preventivnih i dečjih stomatologa da se ove varijable nikada ne posmatraju odvojeno, već njihov značaj uvek treba razmatrati u kombinaciji.

Do sada sprovedena istraživanja pokazuju oprečne rezultate po pitanju značaja pH pljuvačke i njenog puferskog kapaciteta u predikciji karijesa. Uglavnom je studijama dokazana niska senzitivnost i visoka specifičnost karijes prediktivnog značaja puferskog kapaciteta pljuvačke¹¹⁴. Iako pojedine studije sugerišu na povezanost niske pH pljuvačke i karijes iskustva dece, postoji određen broj studija koje ovu konekciju negiraju^{113,118,119}.

Posebnu grupu veoma važnih karijes rizik faktora u dečjem uzrastu čine i sociodemografski i ekonomski faktori. Istraživanja pokazuju da devojčice iako generalno imaju bolju oralnu higijenu, imaju veću prevalenciju i incidenciju karijesa¹²⁰. U dečjem uzrastu od posebnog značaja su faktori vezani za roditelje, pre svega njihov obrazovni profil, kao i stanje njihovog oralnog zdravlja^{108,121–123}.

Nažalost, i pored velikog broja identifikovanih varijabli, nijedna od njih kao solo faktor nije pokazala značaj visoko pouzdanog prediktora karijesa, te se stepen predvidljivosti povećava kombinacijom većeg broja varijabli^{124,125}. Polazeći od navedenog, ekspertske grupe su kreirale gotove modele za procenu rizika za nastanak karijesa, čija je efikasnost testirana na različite populacione grupe^{126–128}. Značajan korak u tom smislu su napravili Bratthall i saradnici, koji su 1997. godine razvili Cariogram, kompjuterski program za procenu rizika za nastanak karijesa¹²⁹. Ovaj program uzima u obzir interakciju između individualno procenjenih faktora rizika za pojavu karijesa, i pruža grafički prikaz procenjenog karijes rizik profila osobe, što pored informativne ima i motivacionu ulogu za pacijenta.

Uzimajući u obzir navedeno, može se smatrati da je potreba za pouzdanim karijes rizik faktorom, koji može na jednostavan način da obezbedi ranu identifikaciju karijes rizične osobe, i dalje visoko aktuelna. U tom smislu posebno je istaknut značaj identifikacije različitih karijes rizik biomarkera. Prema definiciji, biomarkeri su biološki parametri koji se mogu kvantifikovati, a koji predstavljaju indikatore nekog patofiziološkog stanja¹³⁰.

Biomarkeri bi trebalo da budu neinvazivni, lako merljivi, i da se menjaju sa stepenom progresije bolesti. Postoji više vrsta biomarkera u odnosu na njihovu primenu¹³⁰. U oblasti dijagnostike karijes rizika od značaja su tzv. antecedentni biomarkeri, koji ukazuju na rizik nastanka bolesti.

Identifikacija pouzdanog karijes rizik biomarkera je višefazni proces. Nakon studija koje ukazuju na potencijalni značaj varijable kao karijes rizik biomarkera, sprovode se studije preseka u kojima se ispituju vrednosti biomarkera kod osoba sa i bez bolesti, i utvrđivanje njegovog značaja kao karijes rizik indikatora. Potom, se ispituje klinička povezanost biomarkera, iza čega se longitudinalnim studijama procenjuje prediktivna vrednost analiziranih varijabli i konačno određuje njihova efikasnost kao karijes rizik biomarkera, koji mogu imati kliničku odnosno rutinsku primenu.

Efikasne karijes rizik biomarkere u dečjem uzrastu treba tražiti među brojnim sastojcima pljuvačke, što proizilazi iz činjenice da se ona može koristiti kao medijum za praćenje sva tri primarna faktora u etiologiji karijesa, ali i njenog velikog značaja u etiopatogenezi ovog oboljenja koji realizuje svojim sastavom i svojstvima^{118,131}. Osim toga, pljuvačka je lako dostupna, lako se uzorkuje neinvazivnim metodama i lako transportuje što je od velikog značaja posebno u dečjem uzrastu.

Mnoge komponente pljuvačke bi mogle biti od značaja kao karijes rizik biomarkeri^{118,132}, ali je zbog infektivne prirode bolesti posebna pažnja usmerena na neimunoglobulinske antimikrobne proteine pljuvačke-esencijalne komponente urođene imunosti usne duplje^{118,133}. Nedavno je sugerisano, da bi u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece od značaja mogli da budu defenzini i katelicidini pljuvačke⁷⁻⁹, katjonski peptidi koji svojim antimikrobnim svojstvima doprinose biološkoj kontroli karijesa. Istraživanja pokazuju da najsnažnije antibakterijsko dejstvo usmereno na kariogene mikroorganizme, pre svega *S. mutans*, pokazuje hBD-2. Iako nešto slabije, ovo svojstvo

ispoljavaju i LL-37, kao i svi α defenzini koji pokazuju vrlo male razlike u antimikrobnim svojstvima, najverovatnije zbog minimalnih razlika u amino-kiselinskom sastavu. Međutim, i pored ukazivanja na njihov potencijalni značaj u oblasti dijagnostike karijes rizika, do sada sprovedene studije preseka nisu mogle da pruže pouzdane dokaze o njihovoj efikasnosti kao karijes rizik biomarkera, što nameće potrebu za longitudinalnim studijama kojima bi se verifikovao ovakav njihov značaj.

3. NAUČNO RADNA
HIPOTEZA
ISTRAŽIVANJA

Polazeći od navedenog, postavljena je sledeća hipoteza istraživanja:

H₀- Nulta hipoteza istraživanja

Katjonski antimikrobni peptidi, HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke nisu efikasni karijes rizik biomarkeri u dečjem uzrastu, i shodno tome ne mogu biti od značaja u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece.

H₁-Radna hipoteza istraživanja

Katjonski antimikrobni peptidi, HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke su efikasni karijes rizik biomarkeri u dečjem uzrastu, i shodno tome mogu biti od značaja u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece.

4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Za proveru navedene naučno radne hipoteze, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Odrediti koncentraciju HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke u dečjem uzrastu;
2. Ispitati povezanost koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke sa njenom pH vrednošću;
3. Ispitati HNP-1, hBD-2, LL-37 i pH nestimulisane pljuvačke, kao i sociodemografske karakteristike i dijetetske i oralno-higijenske navike kao karijes rizik indikatore u dečjem uzrastu;
4. Praćenjem godišnjeg priraštaja karijesa, ispitati karijes prediktivni značaj HNP-1, hBD-2, LL-37 i pH nestimulisane pljuvačke, kao i karijes prediktivni značaj sociodemografskih karakteristika, dijetetskih i oralno-higijenskih navika u dečjem uzrastu.

5. MATERIЈAL I METODE

5.1. Dizajn studije i ispitanici

Za realizaciju postavljenih ciljeva sprovedena je jednogodišnja, prospektivna studija, koja je obuhvatila pacijente Službe za Preventivnu i dečju stomatologiju Klinike za stomatologiju u Nišu, kao i pacijente predškolskih i školskih stomatoloških ambulanti Službe za Preventivnu i dečju stomatologiju Doma zdravlja u Nišu. Obuhvaćene su dve starosne grupe ispitanika:

- I- 250 ispitanika predškolskog uzrasta sa kompletiranom mlečnom denticijom, starosti 36-48 meseci (165 ispitanika sa svim zdravim zubima i 85 sa karijesnim, ekstrahovanim i/ili plombiranim zubima);
- II- 213 ranih adolescenata sa kompletiranom stalnom denticijom, starosti 11-13 godina (70 ispitanika sa svim zdravim zubima i 143 sa karijesnim, ekstrahovanim i/ili plombiranim zubima).

Studija nije obuhvatila ispitanike sa mešovitom denticijom zbog kompleksnosti procene učestalosti karijesa zuba u ovom razvojnem periodu. Selekcija ispitanika vršena je prema sledećim bazičnim kriterijumima: 1) zdravi ispitanici bez akutnih i hroničnih sistemskih bolesti u ličnoj anamnezi; 2) ispitanici od rođenja sa stalnim prebivalištem na teritoriji Grada Niša (višegodišnja prosečna koncentracija fluorida u vodi za piće iznosi $\leq 0,05$ mg/mL); 3) ispitanici bez strukturnih defekata na zubima; 4) ispitanici školskog uzrasta bez započete terapije fiksnim ortodontskim aparatom. Selekcija ispitanika je izvršena najpre na osnovu podataka iz zvaničnih registara i medicinske dokumentacije, a zatim na osnovu podataka dobijenih anketiranjem majki i kliničkim pregledom ispitanika.

Veličina uzorka, određena je na osnovu podataka o populaciji dece Nišavskog okruga uzrasta 36-48 meseci odnosno 11-13 godina, selektovanoj prema opisanim kriterijmima i prevalenciji karijesa ispitivanih uzrasta dece, sa nivoom pouzdanosti od 5% i snagom studije 80%. Veličina uzorka izračunata je metodom proporcije u EPI INFO STATCALC programu verzija 7.2.2.6. Minimalna izračunata veličina uzorka je 247 ispitanika starosti 36-48 meseci, i 180 ispitanika starosti 11-13 godina.

Roditelji ispitanika su dobili neophodne informacije i dali pisanu saglasnost za učešće dece u ovo istraživanje, koje je sprovedeno prema principima Helsinške deklaracije. Realizaciju istraživanja je odobrio Etički Komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Republika Srbija, odlukom broj 12-14532-2/3.

5.2. Prikupljanje podataka

Sprovedena studija bazirana je na podacima prikupljenima na početku studije (mart-maj 2017. godine za ispitanike predškolskog uzrasta odnosno oktobar-novembar 2017. za rane adolescente), i 12 meseci kasnije.

5.2.1. Prikupljanje bazičnih podataka

5.2.1.1. Anketiranje majki/staraoca ispitanika

Po dobijanju saglasnosti za učešće dece u istraživanje, majke/staraoci ispitanika su popunili anketne listove, kako bi se prikupili bazični socio-demografski podaci o ispitanicima (datum i mesto rođenja, pol, stalno prebivalište, stepen obrazovanja i starost roditelja), kao i podaci o zdravstvenom stanju, upotrebi lekova, oralno-higijenskim i navikama u ishrani ispitanika, upotrebi fluorida, posetama stomatologu. Modifikacijom modela anketa za utvrđivanje faktora rizika oralnog zdravlja dece, preporučenog od SZO¹³⁴, kreirani su anketni listovi, sa pitanjima prilagodjenim starosnim grupama ispitanika (Prilog 1, Prilog 2).

5.2.1.2. Klinički pregled ispitanika

Klinički pregled ispitanika izvršen je u stomatološkim ordinacijama Službe za preventivnu i dečju stomatologiju Klinike za stomatologiju Niš i stomatološkim ambulantama pri Domu zdravlja Niš, jedan sat nakon obroka i vremena predviđenog za oralnu higijenu.

5.2.1.2.1. Procena stanja zdravlja zuba

Stanje zdravlja zuba registrovano je “vizuelno-taktilnom“ metodom prema kriterijumima SZO za epidemiološka istraživanja¹³⁴, i iskazano Klein-Palmer-ovim kep/KEP sistemom¹³⁵.

5.2.1.2.2. Procena stanja oralne higijene

Stanje oralne higijene procenjeno je indeksom oralne higijene (OHI) po Greene-Vermilion-u ¹³⁶, za čije određivanje su korišćene površine šest zuba, reprezentativnih za celu denticiju. Standardno, u stalnoj denticiji merenje je vršeno na vestibularnim površinama zuba 16, 11, 26, 31 i oralnim površinama zuba 36 i 46, dok je mlečnoj denticiji prema Sowole-a i sar. ¹³⁷ merenje vršeno na vestibularnim površinama zuba 55, 51, 65, 71 i oralnim površinama zuba 75 i 85. Merenje je vršeno stomatološkom sondom na potpuno izniklim mlečnim/stalnim zubima. Način bodovanja prisustva naslaga prikazan je u Tabeli 2. Prosečan indeks mekih naslaga dobijen je sabiranjem vrednosti dobijenih za pojedinačne zube, a zatim je dobijeni zbir podeljen brojem pregledanih zuba.

Tabela 2. Kriterijumi za procenu indeksa oralne higijene po Green-Vermilion-u

Vrednost	Kriterijum
0	Nema mekih naslaga
1	Meke naslage pokrivaju do 1/3 površine zuba
2	Meke naslage pokrivaju od 1/3 do 2/3 površine zuba
3	Meke naslage pokrivaju više od 2/3 površine zuba

5.2.1.3. Određivanje pH nestimulisane pljuvačke

Uzorci nestimulisane pljuvačke uzeti su odmah nakon kliničkog pregleda ispitanika, ispljuvavanjem pljuvačke u sterilne tube. Određenom broju ispitanika predškolskog uzrasta uzimanje uzorka pljuvačke je vršeno sterilnim pipetama po Paster-u. Merenje pH pljuvačke izvršeno je odmah po uzorkovanju dovoljne količine pljuvačke pomoću digitalnog, portabl pH metra (*Hanna Instruments, USA*).

5.2.1.4. Određivanje salivarne koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37

Sa ciljem da se utvrdi značaj salivarnih HNP-1, hBD-2, LL-37 kao pouzadnih karijes rizik biomarkera, postavljeni su dodatni kriterijumi za selekciju ispitanika kojima je uzet uzorak nestimulisane pljuvačke za određivanje koncentracije ovih peptida: (1) da

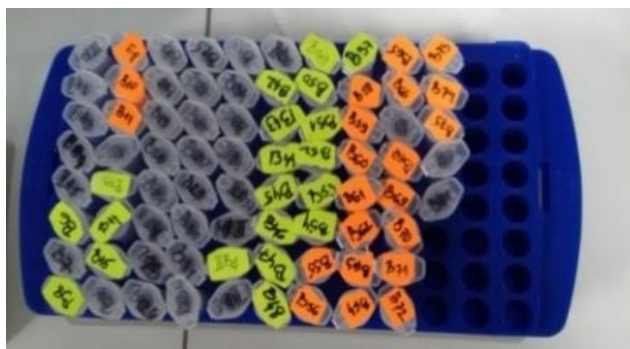
ispitanici nisu koristili antibiotike najmanje mesec dana pre početka studije; (2) ispitanici bez oboljenja mekih tkiva usne duplje; (3) ispitanici sa svim zdravim zubima; (4) ispitanici sa aktivnim, nesaniranim karijesom. Ispitanici sa ekstrahovanim i plombiranim zubima su isključeni iz ovog dela studije.

Prema zadatim kriterijumima, selektovano je ukupno 170 ispitanika: 85 ispitanika predškolskog uzrasta, i 85 ranih adolescenata. Prema karijes statusu, obe grupe ispitanika su podeljene na grupu dece bez karijesa ($k/K=0$; $N=35$) i grupu dece sa aktivnim, nesaniranim karijesom ($k/K \geq 1$; $N=50$).

Uzorkovanje nestimulisane pljuvačke kod ispitanika selektovanim prema dopunskim inkluzionim kriterijumima obavljeno je odmah nakon određivanja pH vrednosti pljuvačke ispljuvavanjem pljuvačke u sterilne tube, u trajanju od 5 do 10 minuta kako bi se sakupilo 2 ml nestimulisane pljuvačke. I u ovom slučaju je određenom broju ispitanika predškolskog uzrasta uzimanje uzorka pljuvačke vršeno sterilnim pipetama po Paster-u. Uzorci su čuvani na temperaturi od $+2^{\circ}\text{C}$, i maksimalno jedan sat od uzorkovanja transportovani u Naučno-istraživački centar za Biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu Srbija, na dalju analizu gde su centrifugirani na 10 000 rpm, na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 10 min. Supernatant je odvojen, a uzorci su podeljeni i zamrznuti na temperaturi od -82°C do sledeće faze (Slika 8 i 9).

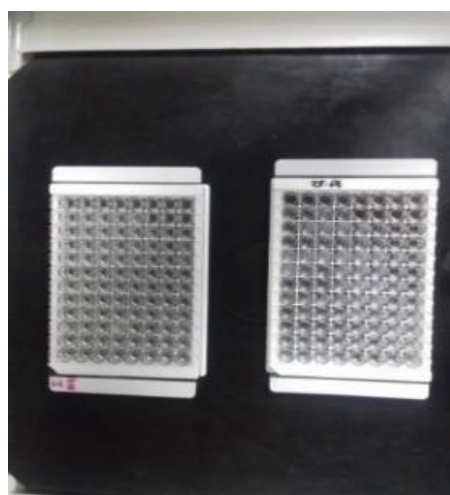


Slika 8. Sortirani uzorci nestimulisane pljuvačke grupe ispitanika predškolskog uzrasta



Slika 9. Sortirani uzorci nestimulirane pljuvačke ispitanika školskog uzrasta

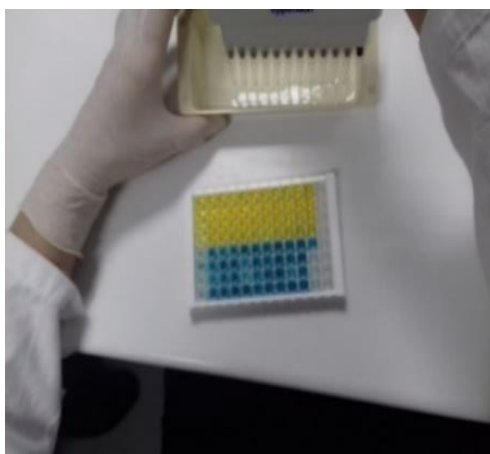
Koncentracija antimikrobnih peptida je određena enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), upotrebom komercijalnih ELISA kitova prema uputstvu proizvođača (Human alpha-Defensin 1- DuoSet ELISA, DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2, R&D System, Minneapolis, USA; Human β -Defensins 2 ELISA Kit, Cusabio Biotech, Houston, USA; Human LL-37 ELISA kit, HyCult Biotech, Uden, The Netherlands)(Slika 10, 11 i 12). Detekcioni rang za HNP-1 ELISA kit je bio 0.50 - 32 ng/mL, za hBD-2 ELISA kit 62.5 pg/mL - 4000 pg/mL, odnosno LL-37 ELISA kit 0.1 - 100 ng/mL. Koncentracija svih ispitivanih peptida je izražena u ng/mL.



Slika 10. Inkubacija uzoraka na temperaturi od 37⁰C



Slika 11. Mašinsko ispiranje uzoraka



Slika 12. Priprema uzoraka za očitavanje koncentracije ispitivanih peptida

5.2.2. Praćenje promene karijes statusa ispitanika

Nakon 12 meseci, ponovljen je sistematski stomatološki pregled ispitanika kojim je registrovano stanje zdravlja zuba, prema istoj dijagnostičkoj proceduri sa početka studije.

5.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je u statističkom paketu SPSS verzija 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Učestalost karijesa zuba na početku i na kraju studije izražena je: *statističkim indeksima* (karijes indeks osoba-kio/KIo, karijes indeks zuba-kiz/KIz), *indeksima i merama prosečnih vrednosti* (karijes indeks prosek- kip/KIp, prosečan broj karijesnih površina-kips/KIps), *pokazateljima strukture* (struktura kep/KEP-a). Godišnji priraštaj karijesa ispitanika (GPK) određen je direktnim praćenjem promena vrednosti kip/KIp indeksa.

U okviru deskriptivne statistike numerički podaci su prikazani merama centralne tendencije (srednja vrednost) i merama varijabiliteta (standardna devijacija).

U okviru analitičke statistike korišćene su metode za utvrđivanje značajnosti dobijenih razlika, kao i metode za testiranje povezanosti testiranih varijabli. Poređenje numeričkih vrednosti između ispitanika je u zavisnosti od distribucije dobijenih podataka vršeno Studentovim t-testom odnosno Mann-Whitney testom, dok je poređenje kategorijskih varijabli u zavisnosti od distribucija dobijenih podataka vršeno χ^2 ili McNamer testom. Poređenje između tri i više grupa izvršeno je Kruskal-Wallis testom kod heterogenih nizova. Upoređivanje frekvencija dobijenih podataka izvršeno je χ^2 testom. Međusobna povezanost potencijalnih faktora karijes rizika, kao i njihova povezanost sa ispitivanim nezavisnim varijablama testirane su Pirsonovim koeficijentom proste linearne korelacije. Potencijalni karijes prediktivni značaj varijabli analiziran je na osnovu godišnjeg priraštaja karijesa, i testiran je linearnom i logističkom regresionom analizom. Kalibracija multivarijablinog modela testirana je Hosmer-Lemeshow testom. Nulta hipoteza testirana je sa nivoom značajnosti $p < 0.05$.

5.4. Institucije u kojima je istraživanje sprovedeno

Istraživanje je obavljeno u sledećim institucijama:

1. U stomatološkoj ordinaciji Službe za Preventivnu i dečju stomatologiju Klinike za stomatologiju Niš;
2. U stomatološkim ambulantom Službe za Preventivnu i dečju stomatologiju Doma zdravlja Niš pri predškolskim ustanovama, i stomatološkim ambulantom pri osnovnim školama OŠ „Kole Rašić“, OŠ „Stefan Nemanja“;
3. U Naučno-istraživačkom centru za Biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Republika Srbija.

6. REZULTATI

6.1. Rezultati studije preseka

6.1.1. Karakteristike ispitanika

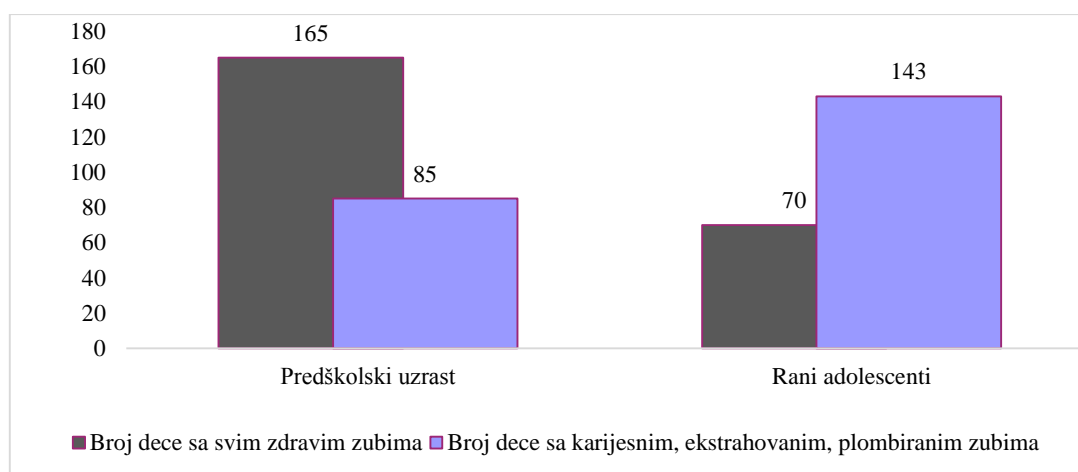
Sprovedena jednogodišnja studija je obuhvatila ukupno 463 ispitanika: 250 ispitanika predškolskog uzrasta, starosti 36-48 meseci i 213 ranih adolescenata, starosti 11-13 godina. Ispitanici predškolskog uzrasta su tokom studije imali kompletiranu mlečnu denticiju, bez započete fiziološke smene mlečnih zuba, dok su rani adolescenti tokom cele studije imali kompletiranu stalnu denticiju. Obe starosne grupe su ujednačene u odnosu na pol ispitanika ($p=0,315$). Polne i starosne karakteristike ispitanika prikazane su u Tabeli 3.

Tabela 3. Polna i starosna struktura ispitanika

Ispitanici	N	Ženski pol N (%)	Muški pol N (%)	Prosečna starost AS±SD
Predškolski uzrast (36-48 meseci)	250	121(48,4%)	129(51,6%)	40,9±4,3 meseci
Rani adolescenti (11-13 godina)	213	114(53,5%)	99(46,5%)	12,54±0,56 godina

6.1.2. Učestalost karijesa zuba ispitanika

U obe starosne grupe ispitanika registrovane su uglavnom visoke vrednosti ispitivanih parametara učestalosti karijesa, statistički je značajno veća kod ranih adolescenata (Grafikon 1, Tabela 4)



Grafikon 1. Učestalost karijesa zuba u ispitivanim grupama dece

Tabela 4. Vrednosti indeksa učestalosti karijesa zuba u ispitivanim grupama dece

Indeksi učestalosti karijesa zuba	Predškolski uzrast	Rani adolescenti	p-vrednost ¹
kio₁/KIo₁ %	34,0%	70,9%	<0,001
kiz₁/KIz₁ %	10,3%	14,52%	<0,001
kip₁/KI_{p1} (AS±SD)	1,95±3,71	4,06±3,54	<0,001 ²
kips₁/KI_{ps1} (AS±SD)	4,06±3,54	5,88±6,35	<0,001 ²

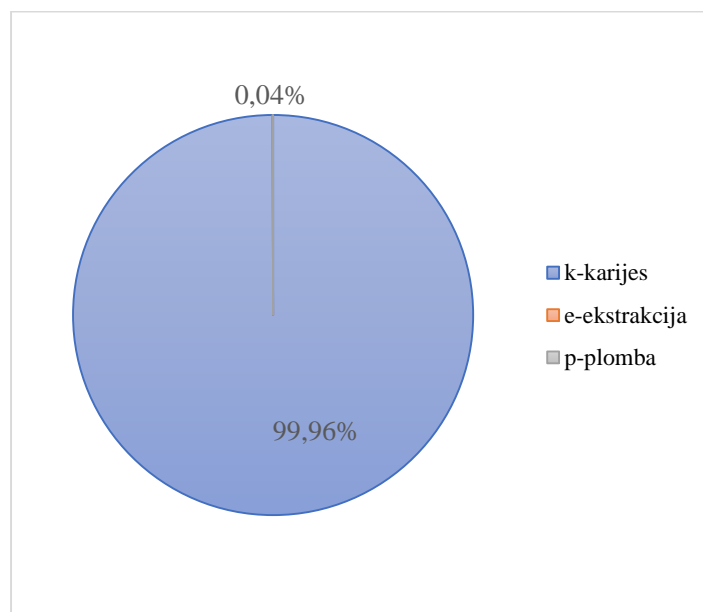
¹χ² test; ²Mann-Whitney test

U obe starosne grupe ispitanika registrovana je nepovoljna struktura kep/KEP-a, sa izuzetno visokom zastupljenošću aktivnog karijesa (Tabela 5, Grafikoni 2 i 3).

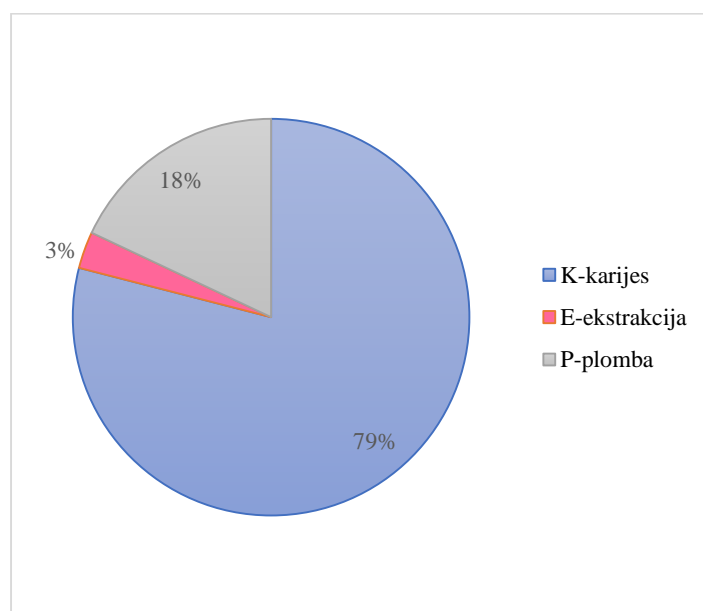
Tabela 5. Učestalost karijesnih, ekstrahovanih i plombiranih zuba u ispitivanim grupama

	Predškolski uzrast		Rani adolescenti		p-vrednost ¹
	N	%	N	%	
Broj dece sa karijesnim zubima	85	34,0%	143	67,1%	<0,001 ¹
Prosečan broj zuba sa karijesom (AS±SD)	5,7±4,4		4,8±2,9		
Min-Max broj zuba sa karijesom	1-20		1-15		
Broj dece sa ekstrahovanim zubima	0	0,0%	20	9,4%	
Prosečan broj ekstrahovanih zuba (AS±SD)	/		1,4±0,8		
Min-Max broj ekstrahovanih zuba	/		1-4		
Broj dece sa plombiranim zubima	1	0,04%	60	28,2%	
Prosečan broj plombiranih zuba (AS±SD)	/		2,6±1,7		
Min-max broj plombiranih zuba	/		1-9		

¹χ² test

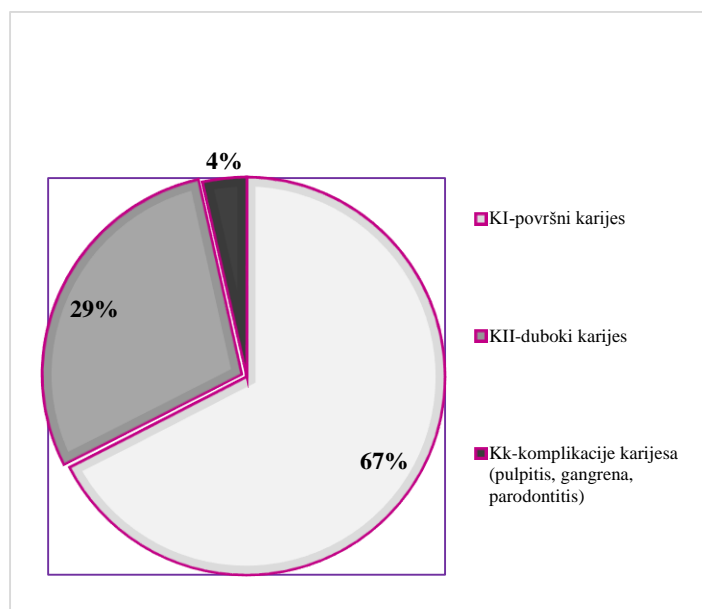


Grafikon 2. Struktura kep-a ispitanika predškolskog uzrasta

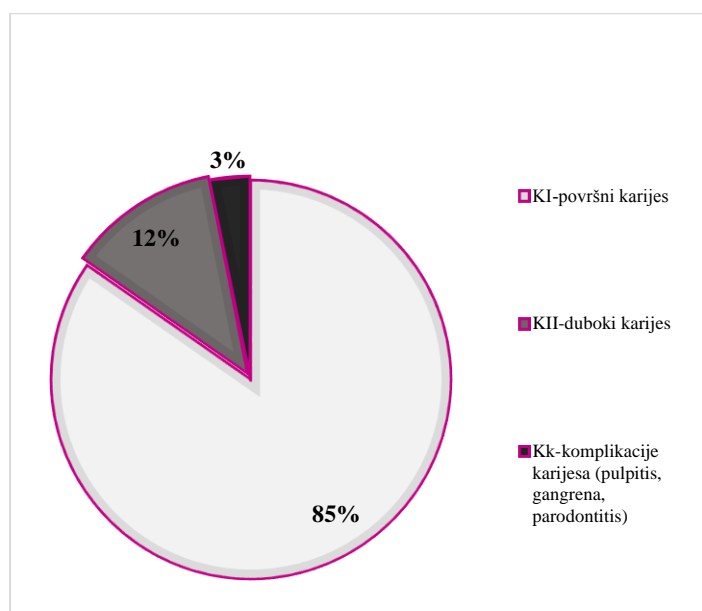


Grafikon 3. Struktura KEP-a ranih adolescenata

U pogledu stepena progresija karijesa, u obe grupe ispitanika dominira prisustvo površnog u odnosu na duboki i komplikacije karijesa (Grafikoni 4 i 5).



Grafikon 4. Stepen progresije karijesa u grupi ispitanika predškolskog uzrasta



Grafikon 5. Stepen progresije karijesa kod ranih adolescenata

6.1.3. Karijes rizik indikatori u dečjem uzrastu

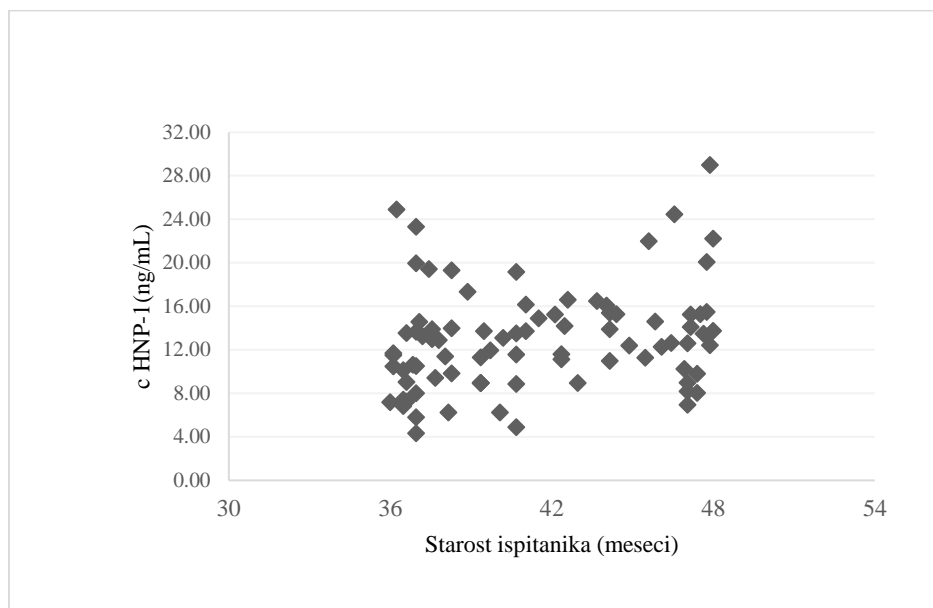
6.1.3.1. Analiza značaja HNP-1, hBD-2, LL-37 i pH nestimulisanе pljuvačke kao karijes rizik indikatora

Bazične demografske i kliničke karakteristike ispitanika kod kojih je ispitivan salivarni nivo peptida, prikazane su u Tabeli 6. Prisustvo karijesa je ujednačeno u odnosu na starost ($p=0,336$) i pol ispitanika ($p=0,401$ odnosno $p=0,059$).

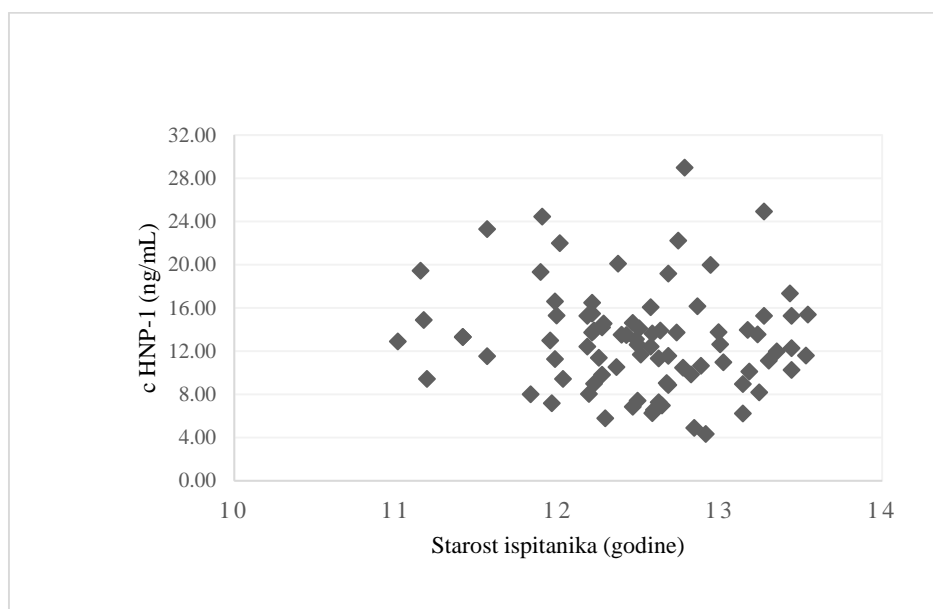
Tabela 6. Bazične demografske i kliničke karakteristike ispitanika

Uzrast ispitanika	N	Starost (AS±SD)	kip/KIP=0 (N; AS±SD)	kip/KIP≥1 (N; AS±SD)
Predškolski uzrast	85	41,22±4,49 meseci	35; 0,00±0,00	50; 7,00±4,73
Rani adolescenti	85	12,47±0,60 godina	35; 0,00±0,00	50; 6,04±2,84

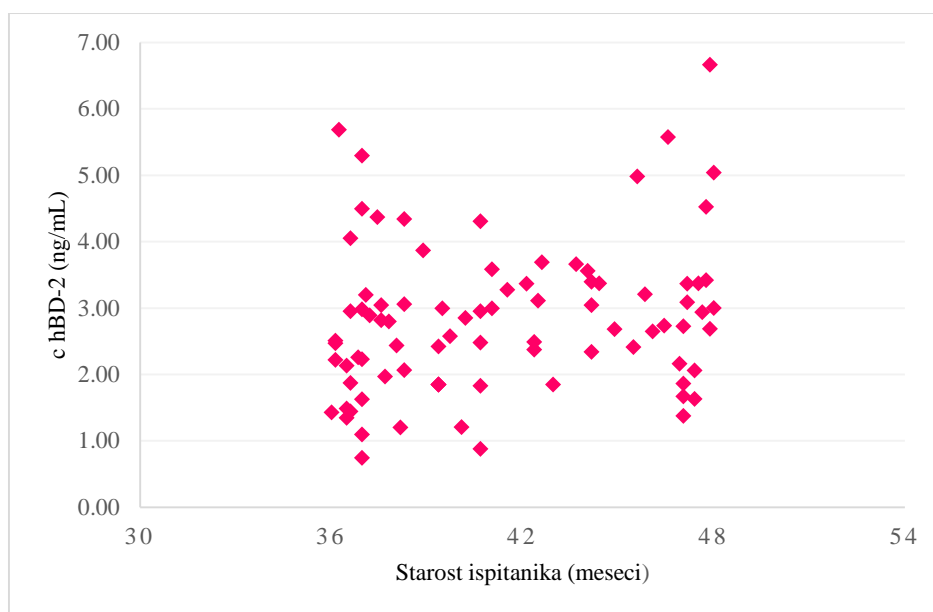
Ispitivani antimikrobni peptidi, HNP-1, hBD-2 i LL-37, su detektovani u uzorcima svih 170 selektovanih ispitanika (Grafikoni 6,7,8,9,10 i 11).



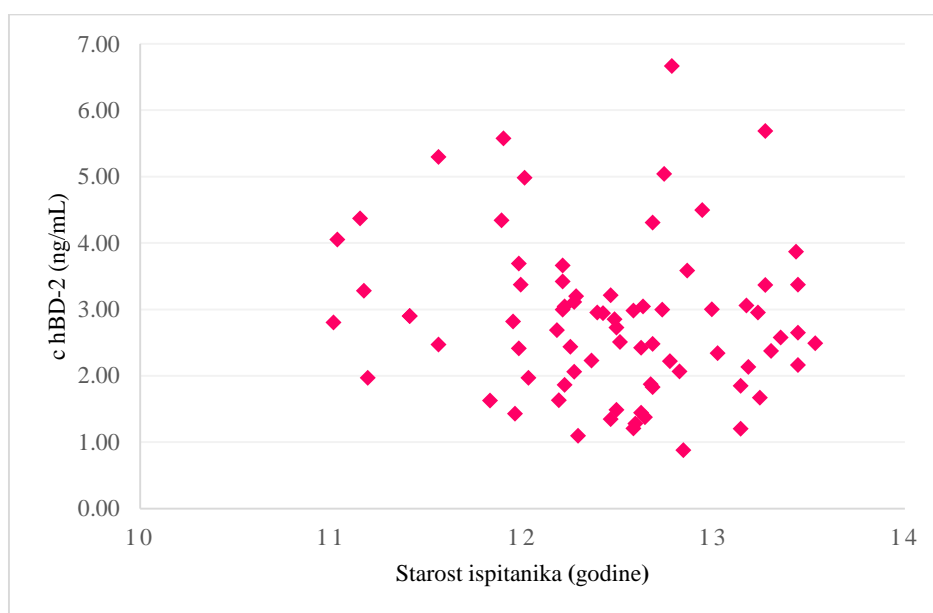
Grafikon 6. Distribucija koncentracija HNP-1 nestimulisanе pljuvačke kod ispitanika predškolskog uzrasta



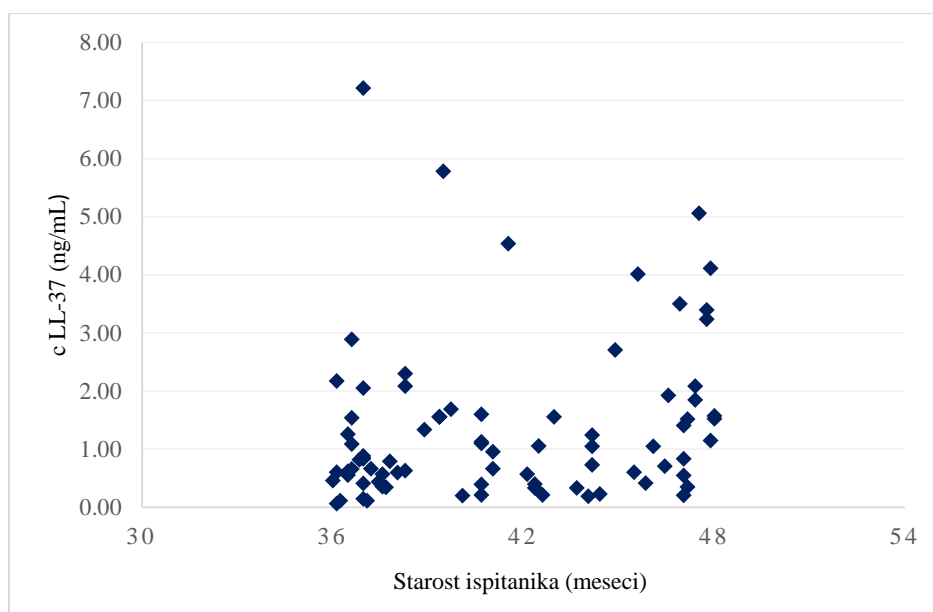
Grafikon 7. Distribucija koncentracija HNP-1 nestimulisanе pljuvačke kod ispitivanih ranih adolescenata



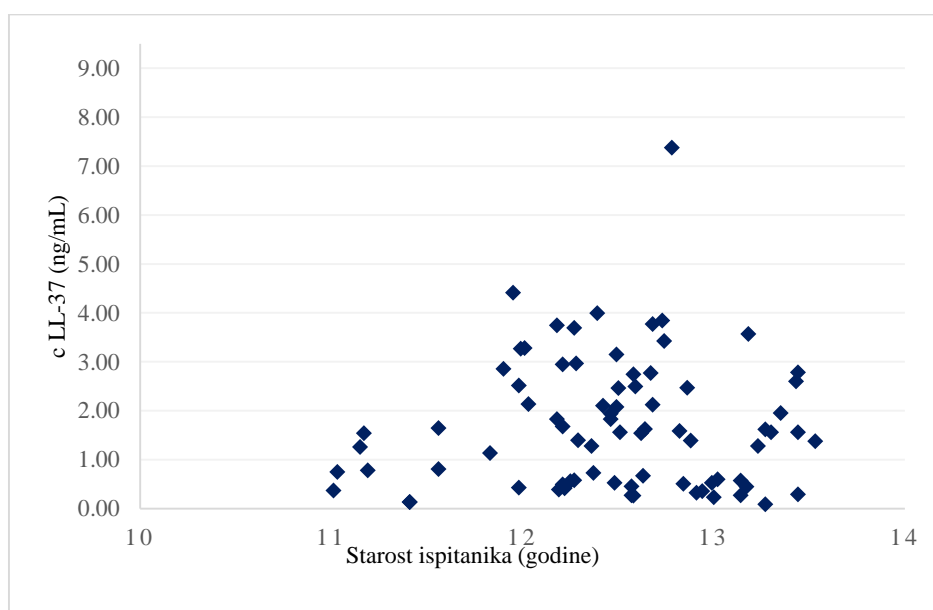
Grafikon 8. Distribucija koncentracija hBD-2 nestimulisane pljuvačke kod ispitanika predškolskog uzrasta



Grafikon 9. Distribucija koncentracija hBD-2 nestimulisane pljuvačke kod ispitanika ranih adolescenata



Grafikon 10. Distribucija koncentracija LL-37 nestimulisane pljuvačke kod ispitanika predškolskog uzrasta



Grafikon 11. Distribucija koncentracija LL-37 nestimulisane pljuvačke kod ispitanika ranih adolescenata

Prosečna koncentracija HNP-1 nestimulisanе pljuvačke je značajno veća kod ispitanika predškolskog uzrasta ($p < 0,001$), dok je koncentracija hBD-2 značajno veća kod ispitivanih ranih adolescenata ($p = 0,005$). Salivarni nivo LL-37 je veći kod ranih adolescenata, ali bez statističke značajnosti u odnosu na mlađu grupu ispitanika (Tabela 7).

Tabela 7. Prosečne vrednosti salivarne koncentracije HNP-1, hBD-2, LL-37 antimikrobnih peptida u ispitivanim grupama dece

Antimikrobni peptid	AS±SD	p-vrednost ¹
HNP-1 (ng/mL)		
Predškolski uzrast	15,48±2,87	<0,001
Rani adolescenti	12,97±1,14	
hBD-2 (ng/mL)		
Predškolski uzrast	2,21±1,48	0,005
Rani adolescenti	2,84±1,14	
LL-37 (ng/mL)		
Predškolski uzrast	1,34±1,69	0,231
Rani adolescenti	1,57±1,77	

¹Mann-Whitney test;

Registrovane vrednosti pH nestimulisanе pljuvačke su statistički značajno veće kod ispitanika predškolskog uzrasta u odnosu na rane adolescente ($p < 0,001$) (Tabela 8).

Tabela 8. Vrednosti pH nestimulisanе pljuvačke ispitanika

pH pljuvačke	N (%)	AS±SD	p-vrednost ¹
Predškolski uzrast	127 (50,8)	7,26±0,44	<0,001
Rani adolescenti	213 (100%)	7,01±0,39	

¹ t test

Vrednosti ispitivanih parametara pljuvačke su ujednačene u odnosu na pol ispitanika. Kod dečaka su registrovane veće vrednosti pH nestimulisanе pljuvačke i salivarnog nivoa analiziranih defenzina i katelicidina, ali bez značajne razlike u odnosu na devojčice (Tabela 9).

Tabela 9. Vrednosti ispitivanih parametara pljuvačke u odnosu na pol ispitanika

Salivarni parametar	Pol		p-vrednost ¹
	Muški	Ženski	
pH pljuvačke	7,21±0,36	7,14±0,40	0,223 ²
HNP-1(ng/mL)	13,99±4,84	12,88±5,36	0,081
hBD-2(ng/mL)	2,57±1,25	2,48±1,46	0,551
LL-37(ng/mL)	1,48±1,81	1,44±1,74	0,138

¹Mann-Whitney test; ² t test

Vrednosti koncentracije ispitivanih defenzina i katelicidina nestimulisane pljuvačke su veće kod ispitanika sa aktivnim-nesaniranim karijesom, ali bez statističke značajnosti u odnosu na ispitanike sa svim zdravim zubima (Tabela 10).

Tabela 10. Vrednosti salivarnih parametara u odnosu na prisustvo karijesa ispitanika

Salivarni parametar	Bez karijesa	Prisutan karijes	p-vrednost ¹
	($\Sigma k/K=0$) AS \pm SD	($\Sigma k/K\geq 1$) AS \pm SD	
pH pljuvačke			
Predškolski uzrast	7,26 \pm 0,44	7,26 \pm 0,43	0,977 ²
Rani adolescenti	7,06 \pm 0,48	6,98 \pm 0,32	0,411
HNP-1 (ng/mL)			
Predškolski uzrast	15,11 \pm 2,94	15,79 \pm 2,82	0,143
Rani adolescenti	12,72 \pm 4,42	13,15 \pm 5,01	0,644
hBD-2 (ng/mL)			
Predškolski uzrast	2,03 \pm 1,50	2,46 \pm 1,44	0,208
Rani adolescenti	2,76 \pm 1,06	2,89 \pm 1,20	0,571
LL-37 (ng/mL)			
Predškolski uzrast	1,26 \pm 1,41	1,46 \pm 2,05	0,862
Rani adolescenti	1,16 \pm 1,12	1,85 \pm 2,07	0,128

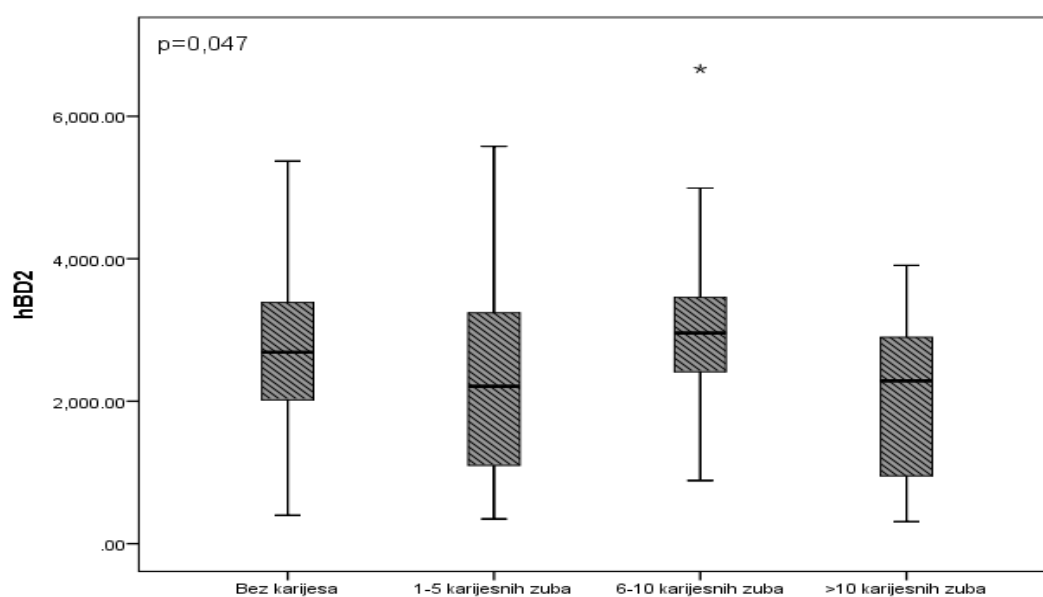
¹Mann-Whitney test; ²t-test;

Vrednosti koncentracije ispitivanih antimikrobnih peptida nestimulisane pljuvačke pokazuju varijacije u odnosu na broj zuba sa aktivnim karijesom i broj površina zuba zahvaćenih karijesom (kips/KIps indeks) (Tabela 11, Tabela 12). Međutim, statistički značajna razlika utvrđena je samo za vrednost koncentracija hBD-2 u odnosu na broj karijesnih zuba ($p=0,047$), i to između ispitanika sa 6-10 zuba sa karijesom i pacijenata sa >10 zuba sa karijesom ($p=0,018$) (Tabela 11) (Grafikon 12).

Tabela 11. Koncentracija ispitivanih antimikrobnih peptida pljuvačke u odnosu na broj karijesnih zuba ispitanika

Antimikrobni peptid	Ukupan broj karijesnih zuba; broj ispitanika				p-vrednost ¹
	0; N=70	1-5; N=44	6-10; N=40	>10; N=16	
HNP-1 (ng/mL)	13,89 \pm 3,89	14,58 \pm 4,60	13,77 \pm 4,56	14,43 \pm 4,10	0,885
hBD-2 (ng/mL)	2,76 \pm 1,13	2,38 \pm 1,41	2,94 \pm 1,21 ²	2,04 \pm 1,15	0,047
LL-37(ng/mL)	1,34 \pm 1,66	1,56 \pm 1,47	1,47 \pm 2,11	1,62 \pm 1,79	0,596

¹ Mann-Whitney test 6-10 zuba sa karijesom u odnosu na >10 karijesnih zuba; ² Kruskal-Wallis test;



Grafikon 12. Vrednosti salivarne koncentracije hBD-2 u odnosu na broj zuba sa aktivnim karijesom

Tabela 12. Koncentracija ispitivanih antimikrobnih peptida pljuvačke u odnosu na broj karijesnih površina

Antimikrobni peptid	Kategorije kips/KIps indeksa				p-vrednost ¹
	0	1-10	11-20	21-30	
HNP-1(ng/mL)	12,72±4,41	13,48±5,60	11,03±4,08	12,52±1,37	0,615
hBD-2(ng/mL)	2,76±1,06	3,06±1,26	2,36±0,98	2,72±0,32	0,426
LL-37(ng/mL)	1,19±1,10	1,98±2,33	1,42±1,10	1,74±0,52	0,524

¹Kruskal-Wallis test

Korelacionom analizom je utvrđena obrnuta (negativna) povezanost pH nestimulisane pljuvačke i starosti ispitanika ($r=-0,396$, $p<0,001$) (Tabela 13). Obrnuta povezanost je utvrđena i između pH nestimulisane pljuvačke i salivarnog nivoa HNP-1, hBD-2 i LL-37 ($r=-0,287$, $p=0,013$; $r=-0,227$, $p=0,003$; $r=-0,165$, $p=0,032$ - za svaki ispitivani peptid ponaosob)(Tabela 13).

Statistički značajna direktna (pozitivna) povezanost postoji između starosti ispitanika i salivarnog nivoa hBD-2 ($r=0,217$, $p=0,004$), dok salivarna koncentracija HNP-1 statistički značajno obrnuto korelira sa uzrastom ispitanika ($r=-0,311$, $p<0,001$). Salivarna koncentracija HNP-1 značajno pozitivno korelira sa salivarnom koncentracijom LL-37 ($r=0,207$, $p=0,008$) i hBD-2 ($r=0,454$, $p<0,001$)(Tabela 13).

Korelacionom analizom nije utvrđena povezanost salivarne koncentracije HNP-1, hBD-2, LL-37 sa prisustvom karijesa u ispitivnim grupama dece (Tabela 13).

Tabela 13. Pearson-ova korelacija salivarne koncentracije antimikrobnih peptida i uzrasta, pH pljuvačke, karijesa zuba ispitanika

Parametar		HNP-1	hBD-2	LL-37	pH	k	K
Uzrast	r	-0,311	0,217	0,075	-0,396	0,105	0,218
	p	<0,001	0,004	0,333	<0,001	0,338	0,045
k	r	0,041	0,061	0,169	-0,098		
	p	0,724	0,581	0,123	0,370		
K	r	-0,081	-0,080	0,105	-0,123		
	p	0,465	0,466	0,339	0,263		
pH	r	-0,287	-0,227	-0,165			
	p	0,013	0,003	0,032			
LL-37	r	0,207	0,139				
	p	0,008	0,071				
hBD-2	r	0,454					
	p	<0,001					

r-koeficijent proste linearne korelacije; p-vrednost;

Korelacionom analizom nije utvrđena povezanost između ukupne koncentracije ispitivanih peptida i karijesa mlečnih/stalnih zuba (Tabela 14).

Tabela 14. Pearson-ova korelaciona analiza kombinacije salivarnih koncentracija antimikrobnih peptida i prisustva karijesa dece

	k		K	
	r	p	r	p
HNP-1, hBD-2	0,120	0,587	0,081	0,465
HNP-1, LL-37	0,103	0,672	0,165	0,326
hBD-2, LL-37	0,183	0,248	0,163	0,330
HNP-1, hBD-2, LL-37	0,155	0,620	0,165	0,326

r-koeficijent proste linearne korelacije, p-vrednosti

6.1.3.2. Sociodemografske karakteristike i higijensko-dijeteske navike kao karijes rizik indikatori u dečjem uzrastu

Analiza povezanosti karijes iskustva ($\Sigma \text{kep} \geq 1$) dece predškolskog uzrasta sa sociodemografskim karakteristikama i higijensko-dijetetskim navikama dece, pokazuje da su u predškolskom uzrastu najznačajniji karijes rizik indikatori pol ($p=0,021$), starost majki ($p=0,028$), dužina dojenja ($p=0,042$), visoka frekventnost unosa rafiniranih ugljenih hidrata ($p<0,001$) i visoke vrednosti indeksa oralne higijene (OHI) ($p=0,009$). Po pitanju povezanosti frekventnosti dnevnih obroka i karijes iskustva dece ovog uzrasta

utvrđena je granična p vrednost od 0,051. Deca ovog uzrasta sa ukupnim kep-om ≥ 1 statistički češće imaju izabranog stomatologa, i značajno češću posetu stomatologu u odnosu na decu sa svim zdravim zubima (Tabela 15).

Tabela 15. Sociodemografske karakteristike i higijensko-dijeteske navike u odnosu na karijes iskustvo ispitanika predškolskog uzrasta

Parametar	Karijes iskustvo				p-vrednost ¹
	Bez karijes iskustva $\Sigma kep=0$		Sa karijes iskustvom $\Sigma kep \geq 1$		
	N	%	N	%	
Pol					
Muški	76	46,1	53	62,4	0,021
Ženski	89	53,9	32	37,6	
Starost majki (AS\pmSD god,)	35,21 \pm 4,57		33,73 \pm 4,12		0,028²
Starost očeva (AS\pmSD god,)	37,62 \pm 5,13		36,88 \pm 4,21		0,139 ²
Obrazovanje majki	N	%	N	%	
≤ 12 godina	44	26,7	31	36,5	0,145
> 12 godina	121	73,3	54	63,5	
Obrazovanje očeva					
≤ 12 godina	75	45,5	38	44,7	1,000
> 12 godina	90	54,5	47	55,3	
Dužina dojenja u mesecima (AS\pmSD)	9,67 \pm 6,44		11,34 \pm 6,59		0,042²
Prosečan broj dnevnih obroka (AS\pmSD)	4,64 \pm 0,86		4,73 \pm 1,04		0,051 ²
Frekventnost unosa rafiniranih UH					
< 1 dnevno	59	35,8	28	32,9	0,009
1 dnevno	70	46,1	27	31,8	
≥ 2 dnevno	30	18,2	30	35,3	
OHI (AS\pmSD)	0,90 \pm 0,35		1,37 \pm 0,40		$< 0,001$²
Frekventnost izvođenja oralne higijene					
< 1 dnevno	10	6,1	7	8,2	0,325
1 dnevno	104	63,0	59	69,4	
≥ 2 dnevno	51	30,9	19	22,4	
Upotreba suplemenata sa fluoridima (da)	4	2,4	7	8,2	0,072
Izabrani stomatolog					
Državna sektor	46	27,9	42	49,4	0,004
Privatni sektor	32	19,4	11	12,9	
Ne	87	52,7	32	37,6	
Godišnji broj poseta stomatologu					
Jednom	59	35,8	23	27,1	$< 0,001$
2-4 puta	20	12,1	24	28,2	
Više od 5 puta	6	3,6	13	15,3	
Nijednom	80	48,5	25	29,4	

¹ χ^2 test; ² Mann-Whitney test

Značaj karijes rizik indikatora u periodu rane adolescencije su pokazali obrazovanje majki ($p < 0,001$) i očeva ≤ 12 godina ($p = 0,002$), visoke vrednosti indeksa oralne higijene (OHI) ($p < 0,001$), niska frekventnost i kraće vreme izvođenja oralne higijene ($p = 0,029$ odnosno $p < 0,001$). Rani adolescenti sa ukupnim KEP-om ≥ 1 statistički češće imaju izabranog stomatologa, u odnosu na decu ovog uzrasta sa svim zdravim zubima (Tabela 16).

Tabela 16. Sociodemografske karakteristike i higijensko-dijeteske navike u odnosu na karijes iskustvo ispitivanih ranih adolescenata

Parametar	Karijes iskustvo				p-vrednost ¹
	Bez karijes iskustva $\Sigma_{kep=0}$		Sa karijes iskustvom $\Sigma_{kep \geq 1}$		
	N	%	N	%	
Pol					
Muški	31	50,8	68	44,7	0,514
Ženski	30	49,2	84	55,3	
Starost majki (AS±SD)	41,98±3,16		41,03±3,59		0,614
Starost očeva (AS±SD)	43,05±3,45		43,54±4,01		0,871
Obrazovanje majke					
≤ 12 godina	29	47,5	113	74,3	<0,001
> 12 godina	32	52,5	39	25,7	
Obrazovanje oca					
≤ 12 godina	25	41,0	98	64,9	0,002
> 12 godina	36	59,0	53	35,1	
Prosečan broj dnevnih obroka (AS±SD)	4,85±1,00		4,57±1,01		0,051 ²
Frekventnost unosa rafiniranih UH					
< 1 dnevno	21	34,4	59	38,8	0,777
1 dnevno	12	19,7	31	20,4	
≥ 2 dnevno	28	45,9	62	40,8	
OHI (AS±SD)	0,81±0,46		1,26±0,54		<0,001²
Frekventnost izvođenja oralne higijene					
< 1 dnevno	2	3,3	16	10,5	0,029
1 dnevno	18	29,5	61	40,1	
≥ 2 dnevno	41	67,2	75	49,3	
Dužina izvođenja oralne higijene					
< 1 min	4	6,6	38	25,0	<0,001
1-2 min	32	52,5	86	56,6	
> 2 min	25	41,0	28	18,4	
Upotreba suplemenata sa fluoridima	4	2,4	6	7,1	0,152
Izabrani stomatolog					
Državni sektor	42	68,9	78	51,3	0,029
Privatni sektor	6	9,8	37	24,3	
Ne	13	21,3	37	24,3	
Godišnji broj poseta stomatologu					
Jednom	22	36,1	47	30,9	0,568
2-4 puta	21	34,4	49	32,2	
Više od 5 puta	8	13,1	34	22,4	
Nijednom	10	16,4	22	14,4	

¹ χ^2 test; ² Mann-Whitney test

6.2. Rezultati jednogodišnje studije praćenja

6.2.1. Godišnji priraštaj karijesa

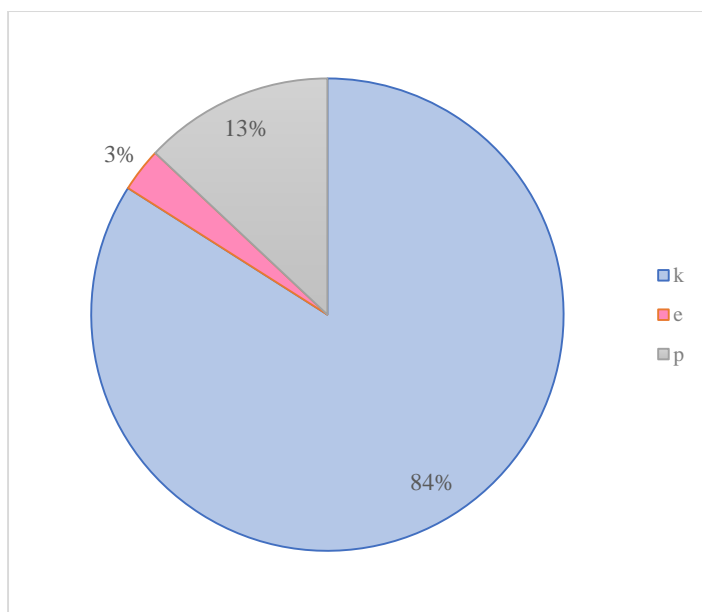
Godinu dana nakon početka studije, u obe starosne grupe ispitanika registrovano je statistički značajno povećanje svih ispitivanih parametara učestalosti karijesa (Tabela 17).

Tabela 17. Vrednosti indeksa učestalosti karijesa na početku i na kraju studije

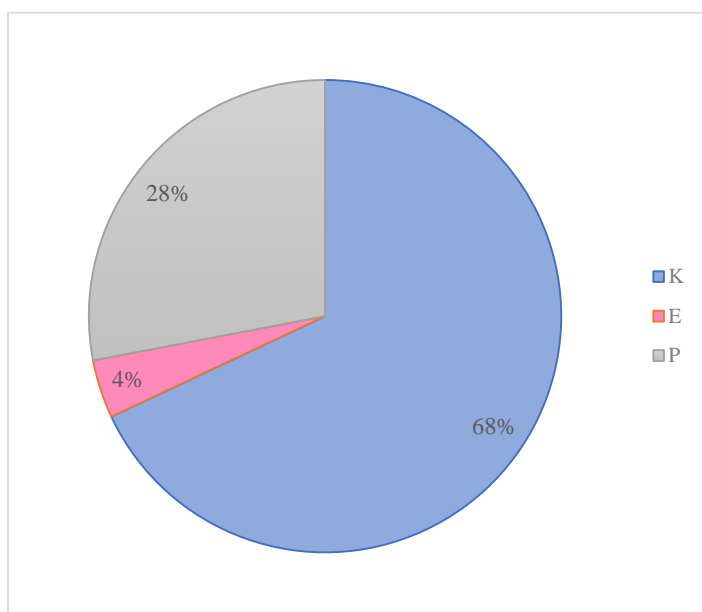
Parametri prevalencije karijesa	Predškolski uzrast	p-vrednost	Rani adolescenti	p-vrednost ¹
ki ₀₁ /KI ₀₁	34,0%	<0,001	70,9%	<0,001
ki ₀₂ /KI ₀₂	82,2%		81,7%	
kiz ₁ /KIz ₁	10,3%	<0,001	14,59%	<0,001
kiz ₂ /KIz ₂	16,7%		19,7%	
kip ₁ /KI _{p1}	1,95±3,71	<0,001 ²	4,06±3,54	<0,001 ²
kip ₂ /KI _{p2}	3,41±4,38		5,51±4,44	
kips ₁ /KI _{ps1}	2,98±6,52	<0,001 ²	5,88±6,35	<0,001 ²
kips ₂ /KI _{ps2}	5,45±8,30		8,28±1	

¹ χ^2 test, ² Wilcoxon test

I pored značajnog porasta broja saniranih zuba, u obe ispitivane grupe dece struktura kep/KEP-a je ostala nepovoljna (Grafikoni 13 i 14), uz povećanje u progresiji karijesa, ali uglavnom bez statističke značajnosti (Tabela 18).



Grafikon 13. Struktura kep-a ispitanika predškolskog uzrasta nakon godinu dana



Grafikon 14. Struktura KEP-a ispitivanih ranih adolescenata nakon godinu dana

Tabela 18. Progresija karijesa u ispitivanim grupama dece na početku i na kraju studije

Stepen progresije karijesa	Predškolski uzrast	p-vrednost ¹	Rani adolescenti	p-vrednost ¹
KI ₁	69%	0,027	85%	0,300
KI ₂	53%		81%	
KII ₁	27%	0,071	12%	0,534
KII ₂	39%		15%	
Kk ₁	4%	0,233	3%	0,700
Kk ₂	8%		4%	

¹ χ^2 test

Povećanje broja karijesnih, ekstrahovanih i/ili plombiranih zuba registrovano je kod 49,2% ispitanika predškolskog i 56,3% ispitivanih ranih adolescenata, bez značajne razlike između ispitivanih starosnih grupa dece (Tabela 19).

Tabela 19. Porast broja kep/KEP zuba tokom studijskog perioda

	Predškolski uzrast		Rani adolescenti		p-vrednost ¹
	N	%	N	%	
Bez porasta broja kep/KEP zuba	127	50,8	93	43,7	0,150
Sa porastom broja kep/KEP zuba	123	49,2	120	56,3	

¹ χ^2 test

U predškolskom uzrastu, porast broja karijesnih, ekstrahovanih i/ili plombiranih zuba registrovan je kod 38,8% ispitanika koja su na početku studije bila sa svim zdravim zubima, kao i kod 61,2% ispitanika, na početku studije sa prethodnim karijes iskustvom ($kep \geq 1$). Kod ispitivanih ranih adolescenata, porast broja karijesnih, ekstrahovanih i/ili plombiranih zuba registrovan je kod 14,6 % ispitanika bez prethodnog karijes iskustva, kao i kod 85,4% ispitanika sa prethodnim karijes iskustvom (Tabela 20).

Tabela 20. Povećanje učestalosti karijesa zuba ispitanika u odnosu na prethodno karijes iskustvo

Prethodno karijes iskustvo	Predškolski uzrast				Rani adolescenti			
	Porast broja kep zuba				Porast broja KEP zuba			
	Ne		Da		Ne		Da	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Bez prethodnog karijes iskustva	111	100	54	38,8	44	100,0	26	15,38
Sa prethodnim karijes iskustvom	0	0,0	85	61,2	0	0,0	143	84,62
p-vrednost¹	p<0,001				p<0,001			

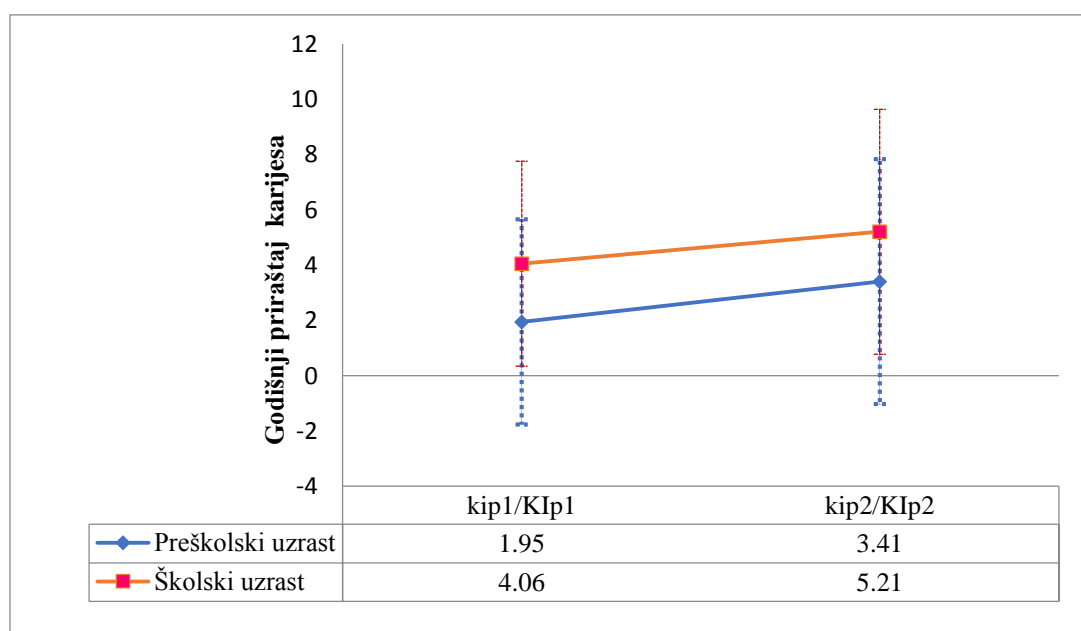
¹McNemar test

Distribucija povećanja broja karijesnih, ekstrahovanih i/ili polombiranih zuba tokom studijskog perioda od godinu dana prikazana je u Tabeli 21.

Tabela 21. Distribucija broja novodijagnostikovanih karijesnih, ekstrahovanih i/ili plombiranih zuba nakon godinu dana

	Predškolski uzrast		Rani adolescenti	
	N	%	N	%
0	127	50,8	93	43,7
1	27	10,8	39	18,3
2	36	14,4	33	15,5
3	20	8,0	22	10,3
4	22	8,8	13	6,1
≥ 5	18	7,2	13	6,1
Ukupno	250	100,0	213	100,0
AS±SD	1,46±2,00		1,15±1,81	

Analizom je utvrđeno da godišnji priraštaj karijesa kod ispitanika predškolskog uzrasta iznosi 1,46, a kod ranih adolescenata 1,15 (Grafikon 15).



Grafikon 15. Godišnji priraštaj karijesa u ispitivanim grupama dece

6.2.2. Prediktori karijesa u dečjem uzrastu

6.2.2.1. Analiza karijes prediktivnog značaja HNP-1, hBD-2, LL-37 i pH nestimulisane pljuvačke

U obe starosne grupe ispitanika vrednosti pH nestimulisane pljuvačke i koncentracija HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke nisu pokazale statistički značajnu povezanost u odnosu na porast učestalosti karijesa zuba tokom studijskog perioda od godinu dana (Tabela 22, Tabela 23).

Tabela 22. Vrednosti HNP-1, hBD-2, LL-37 i pH nestimulisane pljuvačke u odnosu na porast učestalosti karijesa zuba kod ispitanika predškolskog uzrasta

Parametar	Povećan broj kep zuba	Nepromenjen broj kep zuba	p-vrednost ¹
pH pljuvačke (AS±SD)	7,37±0,31	7,26±0,27	0,117 ²
HNP-1 ng/mL (AS±SD)	13,57±5,59	14,78±4,79	0,196
hBD-2 ng/mL (AS±SD)	2,03±1,48	2,50±1,45	0,124
LL-37 ng/mL (AS±SD)	1,44±1,87	1,18±1,36	0,399

¹Mann-Whitney test; ²t test

Tabela 23. Vrednosti HNP-1, hBD-2, LL-37 i pH nestimulisane pljuvačke u odnosu na porast učestalosti karijesa zuba kod ranih adolescenata

Parametar	Povećan broj KEP zuba	Nepromenjen broj KEP zuba	p-vrednost ¹
pH pljuvačke (AS±SD)	6,94±0,34	7,07±0,30	0,702 ²
HNP-1 ng/mL (AS±SD)	12,69±5,61	13,02±3,78	0,376
hBD-2 ng/mL (AS±SD)	2,84±1,30	2,84±0,91	0,554
LL-37 ng/mL (AS±SD)	1,74±2,03	1,35±1,30	0,569

¹ Mann-Whitney test; ² t test

Univarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da u predškolskom uzrastu dece ispitivani antimikrobni peptidi i pH nestimulisane pljuvačke nemaju značaj nezavisnih prediktora karijesa (Tabela 24), dok je kod ranih adolescenata samo pH nestimulisane pljuvačke pokazala ovaj značaj (Tabela 25).

Tabela 24. Potencijalni karijes prediktivni značaj ispitivanih peptida i pH nestimulisane pljuvačke u predškolskom uzrastu
(univarijantna logistička regresiona analiza)

Potencijalni prediktori karijesa	OR	95%CI	p-vrednost
pH	3,383	0,709-16,150	0,126
HNP-1	0,954	0,871-1,045	0,308
hBD-2	0,800	0,591-1,085	0,151
LL-37	1,107	0,833-1,470	0,484

OR – unakrsni odnos, 95% CI – 95% interval poverenja

Tabela 25. Potencijalni karijes prediktivni značaj ispitivanih peptida i pH nestimulisane pljuvačke ranih adolescenata
(univarijantna logistička regresiona analiza)

Potencijalni prediktori karijesa	OR	95%CI	p-vrednost
pH	0,270	0,076-0,962	0,043
HNP-1	0,986	0,903-1,077	0,752
hBD-2	1,002	0,686-1,464	0,991
LL-37	1,145	0,875-1,498	0,322

OR – unakrsni odnos, 95% CI – 95% interval poverenja

6.2.2.2. Karijes prediktivni značaj sociodemografskih karakteristika i higijensko-dijetetskih navika u dečjem uzrastu

Kod ispitanika predškolskog uzrasta godišnji priraštaj karijesa je značajno veći kod dece sa predhodnim karijes iskustvom ($p < 0,001$), zatim kod dece koja su duže dojena ($p = 0,005$), koja češće konzumiraju rafinisane ugljene hidrate ($p = 0,0014$), kao i kod dece sa višim vrednostima OHI ($p < 0,001$), i nižom frekventnošću izvođenja oralne higijene ($p = 0,042$) (Tabela 26).

Tabela 26. Sociodemografske i higijensko-dijetetske karakteristike u odnosu na porast učestalosti karijesa kod ispitanika predškolskog uzrasta

Analizirani parametar	Povećan broj kep zuba		Nepromenjen broj kep zuba		p-vrednost ¹
	N	%	N	%	
	123	49,8	127	50,8	
Prethodno karijes iskustvo					
Ne (kep=0)	54	43,9	111	87,4	<0,001
Da (kep≥1)	69	56,1	16	12,6	
kip(AS±SD)	123	2,84±3,67	127	1,09±3,57	<0,001²
kips index (AS±SD)	123	4,41±7,02	127	1,59±5,70	<0,001²
Pol					
Muški	71	57,7	58	45,7	0,075 ³
Ženski	52	42,3	69	54,3	
Obrazovanje majke					
≤12 godina	36	29,3	39	30,7	0,912 ³
>12 godina	87	70,7	88	69,3	
Obrazovanje oca					
≤12 godina	52	42,3	61	48,0	0,431 ³
>12 godina	71	57,7	66	52,0	
Prosečna dužina dojenja (meseći)	123	11,50±6,94	127	9,02±5,87	0,005²
Prosečan broj dnevnih obroka	123	4,67±0,91	127	4,66±0,94	0,922 ²
Frekventnost unosa rafiniranih UH					
< 1 dnevno	44	35,8	43	33,9	0,014³
1 dnevno	41	33,3	62	48,8	
≥ 2 dnevno	38	30,9	22	17,3	
OHI (AS±SD)	123	1,27±0,41	127	0,86±0,34	<0,001²
Frekventnost pranja zuba					
< 1 dnevno	5	4,1	12	9,4	0,042³
1 dnevno	89	72,4	74	58,3	
≥ 2 dnevno	29	23,6	41	32,3	
Godišnji broja poseta stomatolog					
Jednom	45	36,6	37	29,1	0,021³
2-4 puta	27	22,0	17	13,4	
Više od 5 puta	12	9,8	7	5,5	
Nijednom	39	31,7	66	52,0	

¹χ² test; ² Mann-Whitney test; ³McNemar test;

Univarijanta logistička regresiona analiza pokazuje da su u ovom uzrastu najznačajniji nezavisni prediktori karijesa: dužina dojenja (OR 1,063, p=0,003), OHI (OR 19,219, p<0,001) i odsustvo poseta stomatologu (OR 0,481, p=0,015)(Tabela 27).

Tabela 27. Potencijalni nezavisni prediktori karijesa u predškolskom uzrastu (univarijantna logistička regresiona analiza)

Potencijalni prediktori karijesa	OR	95%CI	p-vrednost
Muški pol	0,616	0,373-1,015	0,057
Obrazovanje majke ≤12 godina	1,071	0,623-1,840	0,804
Obrazovanje oca ≤12 godina	1,262	0,766-2,079	0,361
Dužina dojenja	1,063	1,021-1,107	0,003
Broj obroka	1,016	0,776-1,330	0,908
Unos rafiniranih ugljenih hidrata			
1 dnevno	0,646	0,363-1,150	0,138
> 1 dnevno	1,688	0,862-3,307	0,127
OHI	19,219	8,161-45,263	<0,001
Frekventnost izvođenja oralne higijene ≥2 dnevno	0,647	0,370-1,131	0,127
Godišnji broj poseta stomatologu			
Jednom	Referentna kategorija		
2-4 puta	1,306	0,619-2,755	0,484
Više od 5 puta	1,410	0,504-3,943	0,513
Nijednom	0,481	0,266-0,868	0,015

OR – unakrsni odnos, 95% CI – 95% interval poverenja

Multivarijantni model, kojim su uključeni parametri pljuvačke, sociodemografske, dijetetske i oralno-higijenske karakteristike ispitanika pokazuje da su najznačajniji prediktori karijesa u predškolskom uzrastu vrednosti OHI i odsustvo poseta stomatologu. Povećanje OHI za jednu jedinicu povećava šansu za dobijanje karijesa za 60%. Model je dobro kalibrisan (Hosemer-Lemeshow test $p > 0,05$) (Tabela 28).

Tabela 28. Potencijalni prediktori karijesa u predškolskom uzrastu
(multivarijantni model)

Potencijalni prediktori karijesa	OR	95%CI	p-vrednost
pH	8,960	0,736-109,061	0,086
HNP-1	0,926	0,817-1,049	0,228
hBD-2	0,907	0,598-1,375	0,646
LL-37	1,197	0,863-1,661	0,281
Muški pol	0,924	0,279-3,061	0,897
Obrazovanje majke ≤12 godina	3,939	0,684-22,676	0,125
Obrazovanje oca ≤12 godina	0,625	0,136-2,880	0,547
Dužina dojenja	1,019	0,928-1,118	0,696
Broj obroka	1,095	0,551-2,175	0,796
Unos rafiniranih ugljenih hidrata			
≤1 dnevno	10,249	0,907-115,800	0,060
≥2 dnevno	2,580	0,179-37,260	0,487
OHI	7,755	1,835-32,777	0,005
Frekventnost izvođenja oralne higijene ≥2 dnevno	0,561	0,291-1,083	0,075
Godišnji broj poseta stomatologu			
Jednom	Referentna kategorija		
2-4 puta	0,514	0,060-4,425	0,544
Više od 5 puta	0,251	0,036-1,767	0,165
Nijednom	0,136	0,028-0,665	0,014

OR – unakrsni odnos. 95% CI – 95% interval poverenja, Hosmer-Lemeshow test p=0,286

Kod ranih adolescenata godišnji priraštaj karijesa je značajno veći kod ispitanika sa prethodnim karijes iskustvom ($p < 0,001$), kod ispitanika ženskog pola ($p = 0,007$), ispitanika čije su majke nižeg stepena obrazovanja ($p = 0,028$), kao i kod ispitanika sa višim vrednostima OHI i niskom frekventnišću izvođenja oralne higijene ($p = 0,046$) (Tabela 29).

Tabela 29. Sociodemografske i higijensko-dijetetske karakteristike u odnosu na porast učestalosti karijesa ranih adolescenata

Analizirani parametar	Povećan broj KEP zuba		Nepormenjen broj KEP zuba		p-vrednost
	N	%	N	%	
	120	56,3	93	43,7	
Prethodno karijes iskustvo					
Ne (KEP=0)	26	21,7	35	37,6	<0,001 ¹
Da (KEP ≥1)	94	78,3	58	62,4	
Pol					
Muški	46	38,3	53	57,0	0,007²
Ženski	74	61,7	40	43,0	
KIp indeks (AS±SD)	120	4,5±3,6	93	3,4±3,4	0,032²
KIPs index (AS±SD)	120	6,94±6,94	93	4,51±5,20	0,008²
Obrazovanje majke					
≤12 godina	88	73,3	54	58,1	0,028²
>12 godina	32	26,7	39	41,9	
Obrazovanje oca					
≤12 godina	73	61,3	50	53,8	0,332 ²
>12 godina	46	38,7	43	46,2	
Prosečan broj dnevnih obroka(AS±SD)	4,72±1,01		4,56±1,00		0,250 ²
Frekventnost unosa rafiniranih UH					
< 1 dnevno	42	35,0	38	40,9	0,482 ²
1 dnevno	23	19,2	20	21,5	
≥ 2 dnevno	55	45,8	35	37,6	
OHI (AS±SD)	120	1,21±0,55	93	1,02±0,55	0,014²
Frekventnost pranja zuba					
< 1 dnevno	11	9,2	9	9,7	0,046²
1 dnevno	53	44,2	26	28,0	
≥ 2 dnevno	58	46,7	58	62,4	
Dužina pranja zuba					
<1 min	26	21,7	16	17,2	0,166 ²
1-2 min	70	58,3	48	51,6	
>2 min	24	20,0	29	31,2	

¹ McNemar test ; ² Mann-Whitney test;

Univarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da su u ranoj adolescenciji najznačajniji nezavisni prediktori budućeg karijesa pol (OR 2,132, p=0,007), niži stepen obrazovanja majke (OR 1,986, p=0,020), OHI (OR 1,886, p=0,015), frekventnost održavanja oralne higijene (OR 0,565, p=0,042) (Tabela 30).

Tabela 30. Potencijalni nezavisni prediktori karijesa u periodu rane adolescencije (univarijantna logistička regresiona analiza)

Potencijalni prediktor	OR	95%CI	p-vrednost
Ženski pol	2,132	1,228-3,699	0,007
Obrazovanje majke ≤12 godina	1,986	1,115-3,538	0,020
Obrazovanje oca ≤12 godina	0,733	0,423-1,270	0,268
Broj obroka	1,168	0,892-1,528	0,259
Frekventnost unosa rafiniranihUH			
1 dnevno	1,040	0,495-2,187	0,917
≥2 dnevno	1,422	0,772-2,617	0,258
OHI	1,886	1,130-3,14	0,015
Frekventnost izvođenja oralna higijene ≥2 dnevno	0,565	0,325-0,980	0,042
Dužina pranja			
< 1 min	Referentna kategorija		
1 -2min	0,897	0,436-1,849	0,769
>2	0,509	0,223-1,162	0,109

OR – unakrsni odnos, 95% CI – 95% interval poverenja

Multivarijantnom logističkom regresionom analizom je utvrđeno da su statistički najznačajniji prediktori budućeg karijesa ženski pol, indeks oralne higijene i frekventnost pranja zuba korigovan za sve ostale parametre u modelu. Ženski pol povećava šansu za pojavu karijesa za skoro tri puta (OR 2.908). Povećanje OHI za jednu jedinicu kod ove populacije povećava šansu za pojavu karijesa 76% (OR 1.764). Frekventnost pranja zuba je protektivni faktor (OR 0.519) i za skoro 2 puta smanjuje šansu za pojavu novog karijesa. Model je dobro kalibrisan (Hosemer-Lemeshow test $p > 0.05$) (Tabela 31).

Tabela 31. Potencijalni prediktori karijesa u periodu rane adolescencije (multivarijantna logistička regresiona analiza)

Potencijalni prediktor	B	OR	95%CI		p-vrednost
			Donja granica	Gornja granica	
pH pljuvačke	-1,281	0,278	0,041	1,882	0,189
HNP-1	-	0,000	0,000	30,264	0,688
	20,437				
hBD-2	85,109	9169167	0,000	47,231	0,688
LL-37	0,127	1,135	0,830	1,552	0,428
Ženski pol	1,067	2,908	1,575	5,369	0,001
OHI	0,567	1,764	1,015	3,065	0,044
Obrazovanje majke	-0,599	0,549	0,265	1,140	0,108
Obrazovanje oca	-0,006	0,994	0,494	2,001	0,987
Prosečan broj dnevnih obroka	0,284	1,328	0,984	1,792	0,063
Frekventnost izvođenja oralne higijene	-0,656	0,519	0,274	0,984	0,044
Konstanta	-2,222	0,108			0,035

B koeficijent regresije; OR – unakrsni odnos; 95% CI- 95% interval poverenja

7. DISKUSIJA

Karijes je najučestalije progresivno oboljenje tvrdih zubnih tkiva u dečjem uzrastu, kompleksne i multikauzalne etiologije. Epidemiološki podaci pokazuju da karijes još uvek predstavlja veliki dentalni, medicinski, socijalni, ekonomski i javno-zdravstveni problem, zbog čega primarna prevencija ovog oboljenja ostaje imperativ stomatološke struke, ali i celokupne društvene zajednice. Nažalost, univerzalno i jednostavno karijes preventivno rešenje još uvek ne postoji¹²⁶, te procena rizika za nastanak karijesa ostaje osnovni preduslov efikasne prevencije bolesti i bazični je korak u savremenom kliničkom pristupu upravljanja karijesnim procesom⁹⁷.

Efikasnost procene rizika za nastanak karijesa u ogromnoj meri je uslovljena poznavanjem pouzadnih karijes rizik faktora. Zbog polivalentnog karaktera bolesti, identifikovano je preko 100 karijes rizik faktora, klasifikovanih na biološke, kliničke, bihevioralne i druge faktore, čija efikasnost u dijagnostici karijes rizika zavisi od uzrasta, rase, kulturoloških navika osobe i drugih faktora^{100,103}.

Identifikovati dete u karijes riziku pre pojave bolesti predstavlja osnovu svakog preventivnog stomatološkog programa. Kako nijedna varijabla, kao solo faktor nije pokazala značaj apsolutno pouzdanog karijes rizik faktora, istraživanja u ovoj oblasti su i dalje visoko aktuelna i u velikoj meri fokusirana na utvrđivanju salivarnog karijes rizik biomarkera, koji će na jednostavan i efikasan način omogućiti ranu identifikaciju karijes rizične osobe.

Do sada je analizirana efikasnost mnogih komponenti pljuvačke kao karijes rizik biomarkera kod dece^{95,118}. Zbog infektivne prirode karijesa, sugerisano je da bi ovaj značaj u dečjem uzrastu mogli da imaju i mnogi salivarni antimikrobni proteini urođene imunosti¹²⁷. U tom smislu, poslednjih desetak godina je posebno istaknut značaj defenzina i katelicidina pljuvačke, moćnih antibiotika urođene imunosti usne duplje. Ovakva sugestija je bazirana na rezultatima studija preseka, kojima su pojedini autori ukazali na moguću povezanost salivarnog nivoa ovih antimikrobnih peptida sa karijesom i u skladu sa time sugerisali na njihov mogući značaj u oblasti dijagnostike karijes rizika^{7-9,57}. Pravilno tumačenje efikasnosti nekog karijes rizik biomarkera zahteva adekvatno

vreme praćenja, zbog čega prospektivne studije daju pouzdanije rezultate u odnosu na studije preseka. Nažalost, za sada gotovo i da nema prospektivnih studija koje bi verifikovale značaj pomenutih peptida kao pouzdanih karijes rizik biomarkera i time dale dugo očekivani doprinos u ovoj važnoj oblasti karijesologije. Upravo iz tog razloga sprovedena je jednogodišnja prospektivna studija sa ciljem da ispita efikasnost defenzina (HNP-1, hBD-2) i katelicidina LL-37 kao karijes rizik biomarkera u dečjem uzrastu. Studijom je ispitivan značaj pomenutih peptida nestimulisane pljuvačke, zbog njihovog dokazanog jakog baktericidnog dejstva usmerenog na kariogene mikroorganizme, prevashodno *S. mutans*^{43,51,52}. U cilju dobijanja pouzdanih podataka o značaju ovih peptida u proceni rizika za nastanak karijesa u dečjem uzrastu, razmatrana su dva uzrasta dece sa različitim denticijama odnosno deca predškolskog uzrasta sa kompletiranom mlečnom denticijom i rani adolescenti sa kompletiranom stalnom denticijom.

7.1. Koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke u dečjem uzrastu

Studija je utvrdila da u dečjem uzrastu koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke pokazuju individualne varijacije. Dobijeni rezultat je u skladu sa literaturnim podacima¹³⁹, i može se smatrati očekivanim rezultatom, budući da na salivarnu ekspresiju ovih peptida uz genetske faktore, utiču infektivni i inflamatorni agensi, široko zastupljeni u usnoj duplji⁴⁶.

Vrednosti salivarnog nivoa HNP-1 peptida registrovane ovom studijom nije moguće komparirati sa literaturnim podacima, budući da je s jedne strane većina dosadašnjih studija bila fokusirana na adultnu populaciju, a da je s druge strane u većini ovih studija upotrebom komerijalnih ELISA kitova procenjivan salivarni nivo istovremeno, za sva tri humana α defenzina (HNP1-3), zbog njihove veoma male razlike u amino-kiselinskom sastavu.

Registrovane vrednosti salivarnog nivoa hBD-2 su uglavnom u skladu sa vrednostima utvrđenim u dečjem uzrastu od strane drugih autora^{7,9,140}. Nasuprot ovome, studijom su registrovane značajno manje vrednosti salivarnog nivoa LL-37 katelicidina, u odnosu na do sada registrovane vrednosti salivarnog nivoa ovog peptida u dečjem

uzrastu^{7,8,140}, a najpribližnije su vrednostima koje je registrovala grupa švedskih autora¹⁴¹. Moguće je da uzrok ovih odsupanja, treba tražiti i u činjenici da se ekspresija LL-37 u pljuvački osim sa genetskim, infektivnim i inflamatornim, može dovesti u vezu i sa drugim faktorima. Sugerisano je da bi jedan od takvih faktora mogao da bude i vitamin D zajedno sa UVB zracima neophodnim za njegovu sintezu^{141,142}. Ovo bi istovremeno moglo da bude deo objašnjenja varijacija u salivarnom nivou ovog peptida registrovanog kod dece različitih geografskih lokaliteta^{7,8,140,141,143}, ali su svakako potrebne dalje studije da to i potvrde.

Podaci iz dostupne literature pokazuju da nivo pojedinih antimikrobnih peptida u pljuvački raste sa uzrastom dece, dok drugi peptidi adultni nivo dostižu već u ranom detinjstvu¹⁴⁴. Za defenzine i katelicidine potpuno preciznih ovakvih podataka za sada nema, ali bazirano na rezultatima ove studije uzrast dece se može smatrati faktorom koji utiče na salivarni nivo ispitivanih peptida nestimulisane pljuvačke.

Studijom je utvrđena značajna obrnuta (negativna) povezanost koncentracije HNP-1 nestimulisane pljuvačke sa uzrastom dece. S obzirom na poreklo ovog peptida, njegova veća koncentracija u pljuvački predškolske dece najverovatnije proizilazi iz fiziološki većeg broja neutrofila u krvi dece ovog uzrasta, budući da koncentracija defenzina pljuvačke (uključujući i HNP-1) pozitivno korelira sa brojem neutrofila u krvi¹⁴⁵, a da sama pljuvačka predstavlja ultrafiltrat krvne plazme. Nasuprot ovome, utvrđeno je da su vrednosti koncentracije hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke veće u grupi ranih adolescenta, ali je statistička značajnost utvrđena samo za hBD-2. Verovatno je da u osnovi ove pozitivne korelacije stoji konstantna promena oralne mikroflore tokom detinjstva¹⁴⁶, koja konstantno stimuliše efektorne mehanizme urođene imunosti usne duplje uslovljavajući porast nivoa peptida u pljuvački sa uzrastom dece. Ovo se u prvom redu odnosi na hBD-2 koji potiče samo od ćelija oralnog epitela, za razliku od LL-37 pljuvačke koji vodi poreklo i od neutrofila. Za hBD-2 dobijeni rezultat je nemoguće komparirati, jer u dostupnoj literaturi ovakvih podataka nema. S druge strane, za LL-37 dobijeni rezultat je u skladu sa sugestijama pojedinih autora^{8,147}.

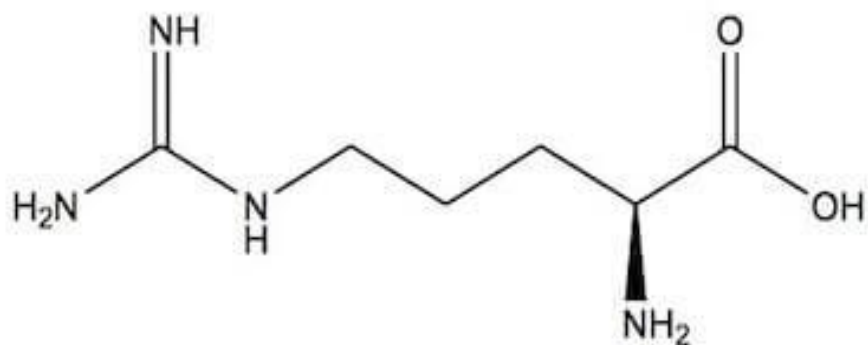
7.2. Korelacija koncentracije HNP-1, hBD-2 i LL-37 peptida i pH nestimulisane pljuvačke

Jedan od najjačih modulatora antimikrobne aktivnosti katjonskih antimikrobnih peptida, kojima priadaju defenzini i katelicidini, je pH sredine⁷⁵. Međutim, i pored poznavanja ove činjenice u dostupnoj literaturi za sada ne postoje konkretni podaci o mogućem uticaju pH pljuvačke na salivarni nivo ovih peptida i kako bi se to eventualno moglo da odrazi na njihovu antimikrobnu aktivnost.

Rezultati sprovedene studije su pokazali da je koncentracija aktivnih formi ispitivanih defenzina i katelicidina obrnuto proporcionalna pH vrednosti nestimulisane pljuvačke. Kako je ovo prva studija koja je ispitivala ovu korelaciju, dobijeni rezultat nije moguće komparirati, ali njemu u prilog je činjenica da LL-37 nije detektovan u visoko baznoj, parotidnoj, pljuvački, čija pH ide i do 8⁷².

Precizan mehanizam ove korelacije nije jasan. Kao što je istaknuto, defenzini i katelicidin su pozitivno naelektrisani peptidi, okarakterisani prisustvom disulfidnih mostova i amfifilnom strukturom, u kojoj su pozitivno naelektrisani i hidrofилni dobro odvojeni od hidrofobnih domena. Zahvaljujući takvoj strukturi, ovi peptidi mogu da reaguju sa mikrobnim membranama, naročito onima koje su negativno naelektrisane, uslovljavajući osmolizu i bakterijsku smrt- što predstavlja bazični mehanizam biološkog dejstva ovih peptida¹⁰. Međutim, zbog svog naelektrisanja, vrlo je verovatno da oni mogu da stupe u interakciju i sa drugim komponentama pljuvačke^{46,118}.

Dobijeni po pitanju ove korelacije se može dobrim delom pripisati i činjenici da su defenzini i katelicidin peptidi bogati argininom. Arginin je bazna amino-kiselina. To je bipolarni molekul, istovremeno i sa pozitivnim i sa negativnim grupama (Slika 13). Zbog toga se defenzinima i katelicidinima pljuvačke mogu pripisati i puferska svojstva, što bi mogao da bude još jedan mehanizam kojim doprinose održanju oralne homeostaze. Međutim, bazirano na samo ovom rezultatu nije moguće precizirati njihov potencijalni puferski kapacitet, zbog čega su neophodna dalja istraživanja u ovoj oblasti.



Slika 13. Strukturna formula arginina¹⁴⁸

Obrnuta povezanost salivarnog nivoa ispitivanih peptida i pH nestimulirane pljuvačke sugerira da je koncentracija aktivnih formi ovih antimikrobnih peptida, a samim tim i njihova antimikrobna aktivnost, veća u kiselj sredini. Ovo je od velikog značaja, s obzirom da se patološki procesi u usnoj duplji, uključujući i karijesni proces, odigravaju upravo u kiselj sredini. Ovi peptidi mogu iz pljuvačke da migriraju u dentalni biofilm niske pH vrednosti, gde mogu da ispolje svoje baktericidno dejstvo usmereno na kariogene mikroorganizme i dovedu do nestanka određenih bakterijskih vrsta neotpornih na kiselu sredinu. Osim toga, ovo bi moglo da ide u prilog nespecifičnoj hipotezi dejstva dentalnog biofilma u etiologiji karijesa²⁶, ali su svakako neophodna dalja istraživanja da ovo i potvrde.

Studijom utvrđena obrnuta korelacija salivarnog nivoa ispitivanih peptida i pH pljuvačke doprinosi boljem razumevanju fiziologije i bioloških funkcija ovih peptida, istovremeno inicirajući dalja istraživanja, tim pre, ako se u obzir uzme moguća primena ovih peptida u terapijske svrhe, uključujući i primenu u terapiji karijesa²⁸. Zato je u budućim studijama neophodno utvrditi u kojoj meri se pH salivarnog medijuma može odraziti na antimikrobnu aktivnost peptida usmerenu na kariogene mikroorganizme, kao i pri kojoj pH vrednosti ovakve sredine je njihova antimikrobna aktivnost najveća, i suprotno tome pri kojoj pH sredine oni gube svoja antimikrobna svojstva.

7.3. Značaj HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisanе pljuvačke kao karijes rizik indikatora u dečjem uzrastu

Sprovedenom studijom je utvrđeno da je u obe starosne grupe ispitanika salivarna koncentracija HNP-1, hBD-2 i LL-37 veća u grupi dece sa aktivnim, nesaniranim karijesom, ali bez statističke značajnosti u odnosu na decu sa svim zdravim zubima.

U obe starosne grupe ispitanika, studijom preseka nije utvrđena statistički značajna povezanost salivarnog nivoa testiranih peptida i karijesa. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Phattarataratip i sar.¹⁴⁰, a za LL-37 i sa rezultatima Tao i sar.⁵⁷. Nasuprot ovim, Davidopoulou i sar.⁸ su utvrdili da su vrednosti salivarnog nivoa LL-37 niže kod dece sa svim zdravim zubima u odnosu na decu sa aktivnim/nesaniranim karijesom. Kod dece predškolskog uzrasta Colombo i sar.⁷ su utvrdili slabu pozitivnu povezanost kep indeksa i salivarnog nivoa hBD-2 i LL-37, dok su Jurczak i sar.⁹ utvrdili da salivarni nivo hBD-2 statistički značajno korelira sa progresijom karijesa ranog detinjstva. U dosadašnjim istraživanjima dobijeni oprečni rezultati, u pogledu ove korelacije, delimično se mogu pripisati različitim definisanjem grupe dece sa karijesom (na osnovu kep/KEP indeksa ili na osnovu samo karijes aktiviteta). U ovoj studiji, u cilju dobijanja što validnijih rezultata, grupu dece sa karijesom činila su deca samo sa aktivnim karijesom, uz maksimalno nastojanje da se isključe stanja koja bi mogla da utiču na dobijene rezultate (komplikacije karijesa, plombe, ekstrakcije). Iako je očekivano suprotno, studijom nije utvrđena povezanost koncentracije HNP-1, hBD-2, LL-37 nestimulisanе pljuvačke sa prisustvom karijesa, kao ni povezanost sa brojem karijesnih površina (Tabela 11, Tabela 12). Takođe, studijom nije utvrđena povezanost ukupne koncentracije ispitivanih peptida, i/ili njihove kombinacije sa prisustvom karijesa dece.

Karijes je kompleksno, multikauzalno oboljenje infektivne prirode. Nakon kolonizacije usne duplje kariogenim mikroorganizmima dolazi do oslobađanja proinflamornih citokina (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8) koji kompleksnim signalnim putevima stimulišu ekspresiju antimikrobnih HNP-1, hBD-2 i LL-37 peptida u pljuvački^{149–151}. Shodno tome, može se smatrati da nivo ovih salivarnih antimikrobnih peptida više korelira sa salivarnim nivoom kariogenih mikroorganizama, nego sa

prisutnim karijesnim lezijama kao krajnjim simptomom karijesnog procesa, na šta je nedavno i sugerisano¹⁵². Studije pokazuju da salivarni nivo HNP-1, hBD-2 i LL-37 peptida pozitivno korelira sa salivarnim nivoom kariogenih bakterija, u prvom redu *S. mutans* za koji je pokazano da je od velikog značaja u proceni rizika za nastanak karijesa^{7,147}. Zbog toga je očekivano da salivarni nivo ovih peptida može imati značaj karijes rizik indikatora, što ova studija to nažalost nije potvrdila.

Iako studija nije pokazala korelaciju salivarnog nivoa ispitivnih peptida sa prisustvom karijesa, dobijeni rezultat ne negira i/ili umanjuje njihov značaj u biološkoj kontroli karijesa. Za to postoji nekoliko objašnjenja: 1) baktericidna/bakteriostatska aktivnost peptida je usmerena i na kariogene bakterije⁵¹; 2) stimulišu stečeni imuni odgovor i pojačavaju produkciju IgA i IgG⁵⁹; 3) učestvuju u prevenciji formiranja dentalnog biofilma⁶⁷; 4) antimikrobnu aktivnost ispoljavaju samostalno, ali i/ili sinergistički međusobno ili sa drugim antimikrobnim proteinima⁴⁶. Zbog svega navedenog, ovim peptidima se najveći značaj pripisuje u inicijalnoj fazi karijesnog procesa. Sa time u vezi, istaknut je potencijalni značaj ovih peptida u tretmanu dentalnog karijesa, ali i njihov mogući značaj u preventivnoj stomatologiji^{153,154}.

Baktericidno svojstvo ostvaruju direktnim dejstvom, ekstracelularnim i intracelularnim mehanizmima, ali sposobnošću da utiču na stečeni imuni odgovor i pojačaju njegov uticaj. Međutim, različite salivarne komponente, poput mucina, visoke koncentracije NaCl, monovalentnih i dvovalentnih jona, mogu da stupe u interakciju sa ovim peptidima i da inhibiraju antimikrobnu aktivnost peptida, direktno se odražavajući na njihov salivarni nivo^{46,76,156}. Zato je veoma važno da se prilikom ispitivanja povezanosti nivoa ovih peptida sa prisustvom karijesa, u obzir uzmu i drugi parametri kao što je jonski sastav pljuvačke, njen viskozitet, koncentracija mucina, ali i koncentracije drugih antimikrobnih proteina pljuvačke.

Kako studijom nije utvrđena povezanost salivarnog nivoa HNP-1, hBD-2 i LL-37 sa prisustvom karijesa dece, može se smatrati da ovi peptidi nemaju značaj karijes rizik indikatora u dečjem uzrastu.

U predškolskom uzrastu sa karijes iskustvom dece značajno su povezani muški pol, starost majki, dužina dojenja, frekventnost unosa rafiniranih ugljenih hidrata, visoke vrednosti indeksa oralne higijene dece, zbog čega se mogu smatrati značajnim karijes

rizik indikatorima u dečjem uzrastu. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa do sada dostupnim literaturnim podacima^{88,157–167}. Posebno je interesantno da je studija pokazala da je dužina dojenja značajan karijes rizik indikator u ovom uzrastu, s obzirom na još uvek kontradiktorne podatke po pitanju njegovog značaja za pojavu karijesa kod dece^{88,168–170}.

U ranoj adolescenciji sa karijes iskustvom dece značajno su povezani stepen obrazovanja roditelja, visoke vrednosti indeksa oralne higijene, frekventnost i dužina pranja zuba. I ovi rezultati su u skladu sa nalazima mnogih autora^{102,171–173}. Interesantno da je da dobijeni rezultati pokazuju da navike u ishrani nemaju značaj karijes rizik indikatora u ovoj starosnoj grupi dece.

U obe starosne grupe ispitanika varijable vezane za oralnu higijenu (vrednosti indeksa oralne higijene, odnosno frekventnost i dužina izvođenja pranja zuba) su pokazale značaj karijes rizik indikatora. Mada je sugerisano da značaj ovih varijabli ne bi trebalo posmatrati izolovano od navika u ishrani i primene fluorida, njegov značaj kao solo karijes rizik indikatora svakako nije zanemarljiv i od ogromnog je značaja u svakodnevnom kliničkom radu. Posebno je interesantno to što je studija pokazala da je indeks oralne higijene u obe starosne grupe dece pokazao značaj indikatora karijes rizika. Ovakav rezultat sugerise na značaj redovnosti i učestalosti pranja zuba u proceni karijes rizika, ali i pravilnosti tehnike pranja zuba koju deca, i njihovi roditelji često ne primenjuju na pravilan i adekvatan način.

7.4. Karijes prediktivni značaj HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke u dečjem uzrastu

Kao što je istaknuto, karijes je visoko rasprostranjeno oralno oboljenje u dece, čija učestalost raste sa njihovim uzrastom, što je potvrdila i sprovedena studija. U obe starosne grupe dece, registrovano je statistički značajno povećanje učestalosti karijesa, uz visoke vrednosti godišnjeg priraštaja karijesa.

Kod ispitanika predškolskog uzrasta godišnjih priraštaj karijesa iznosi 1,46 kep zuba, dok je kod ranih adolescenata registrovan godišnji priraštaj karijesa od 1,15 KEP zuba. Dobijene vrednosti su u skladu sa Republičkim prosekom, po kome svako dete u

Srbiji tokom perioda od godinu dana u proseku dobije 1-2 karijesna, ekstrahovana i/ili plombirana zuba¹⁷⁴.

Registrovana visoka prevalencija karijesa na početku studije, uz visok godišnji priraštaj karijesa kod ispitanika predškolskog uzrasta i ranih adolescenata potvrđuju da oba ispitivana uzrasta predstavljaju visoko karijes rizične periode, zbog čega je potreba za identifikacijom pouzdanih prediktora karijesa i dalje neophodna.

Do sada je u svim razvojnim fazama dečjeg uzrasta najviši karijes prediktivni značaj pokazalo prethodno karijes iskustvo^{104,175-178}, međutim, kao što je istaknuto ono nije od velikog značaja u oblasti primarne prevencije karijesa. Zato je ova studija bila fokusirana na ispitivanju prediktivnog značaja varijabli koje mogu identifikovati dete u riziku, pre kliničke manifestacije bolesti.

Primarno, studija je bila fokusirana na karijes prediktivni značaj HNP-1 i hBD-2 i LL-37 peptida nestimulisane pljuvačke, koji kao esencijalne komponente urođene imunosti usne duplje doprinose biološkoj kontroli karijesa. Studijom praćenja je ispitivana korelacija salivarnog nivoa pomenutih peptida sa porastom karijesa i njihov mogući karijes prediktivni značaj, sa ciljem da se oni potvrde kao efikasni karijes rizik biomarkeri u dečjem uzrastu, što bi napravilo ogroman pomak u dijagnostici karijes rizika, a posledično i u oblasti primarne prevencije karijesa. Nažalost, studijom ovaj njihov značaj nije potvrđen. Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatima studije Simon Sora-a i saradnika, koji su pokazali da ispitivani HNP 1-3 defenzini i katelicidin LL-37 nemaju značaj prediktora karijesa kod dece predškolskog uzrasta¹⁵². Kako je ovo prva studija koja je značaj peptida u predikciji karijesa ispitivala kod ranih adolescenata, dobijeni rezultat je nemoguće komparirati za ovaj uzrast dece, ali je on svakako u skladu sa sada jedinom studijom koje je ovo ispitivala kod dece predškolskog uzrasta. Međutim, kako je ovo prvi put da je nekom studijom analiziran karijes prediktivni značaj hBD-2 peptida, dobijene rezultate nije moguće komparirati.

Rezultati ove studije pokazuju da su u dečjem uzrastu sociodemografske karakteristike i oralno-higijenske navike dece i dalje važni prediktori karijesa.

U predškolskom uzrastu značaj nezavisnih prediktora karijesa pokazali su dužina dojenja, vrednosti indeksa oralne higijene i odsustvo poseta stomatologu. Najveći karijes prediktivni značaj su pokazali vrednosti indeksa oralne higijene i odsustvo poseta

stomatologu. Prema sprovedenoj studiji povećanje indeksa oralne higijene za jednu jedinicu povećava šansu za dobijanje karijesa za 60%. Dobijeni rezultati su u najvećoj meri u skladu sa podacima iz dostupne literature^{95,160,179,180}, uz napomenu da je predškolski uzrast dinamičan razvojni period okarakterisan brojnim razvojnim i drugim promenama deteta, što za sobom povlači i različitu efikasnost karijes rizik faktora u karijes rizik dijagnostici u različitim razvojnim fazama. Osim toga, u ovom uzrastu deca u najvećoj meri zavise od svojih roditelja. Stoga je vrlo verovatno da prediktivni značaj mogu imati i mnogi faktori vezani za roditelje koji nisu analizirani ovom studijom.

U periodu rane adolescencije značaj nezavisnih prediktora karijesa su pokazali pol, nizak stepen obrazovanja majki, vrednosti indeksa oralne higijene, frekventnost pranja zuba i pH nestimulisane pljuvačke. U ovom uzrastu najveći karijes prediktivni značaj su uz pol pokazale i varijable vezane za oralnu higijenu. Dobijeni rezultati su uglavnom u skladu sa nalazima drugih autora, koji su karijes prediktivni značaj varijabli često ispitivali studijama preseka, ili retrospektivnim studijama^{102,108,171,181}.

Nizak obrazovni profil majki pokazao je značajnu karijes prediktivnu važnost, što je u skladu s rezultatima drugih autora^{102,108} koji to objašnjavaju nedovoljnim razumevanjem značaja oralnog zdravlja majki nižeg obrazovnog profila i nesposobnošću davanja adekvatnih saveta deci u pogledu očuvanja njihovog oralnog zdravlja. Interesantno je da je studija pokazala da niska pH pljuvačke može imati značaj nezavisnog prediktora karijesa, i pored u dostupnoj literaturi prilično oprečnih rezultata¹¹⁸.

Pol i varijable vezane za oralnu higijenu ranih adolescenata su pokazale najveći prediktivni značaj. Devojčice imaju tri puta veću šansu za pojavu karijesa, što verovatno proizilazi iz ranije erupcije stalnih zuba kod devojčica u odnosu na dečake i njihove duže izloženosti kariogenim noksama¹²⁰. Učestalost pranja zuba je preventivni faktor i deca koja peru zube dva ili više puta dnevno imaju dvostruko manju šansu da razviju karijes. Prediktivnu važnost pokazao je i indeks oralne higijene, što ukazuje da je pored pravilnosti i učestalosti, za predviđanje karijesa važna i tehnika pranja zuba. Zanimljivo je da uprkos suštinskom značaju ishrane u etiologiji karijesa, navike u ishrani ranih adolescenata nisu pokazale prediktivni značaj, što je verovatno zbog činjenice da je njihova prediktivna važnost često maskirana upotrebom fluorida i higijenskim navikama dece¹¹⁵.

7.5. Značaj HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke kao karijes rizik biomarkera u dečjem uzrastu

U obe starosne grupe ispitanika, sprovedenom studijom nije utvrđena povezanost koncentracija HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke sa prisustvom karijesa, što sugeriše da ispitivani antimikrobni peptidi pljuvačke nemaju značaj karijes rizik indikatora u dečjem uzrastu. S druge strane, u obe starosne grupe dece studijom nije utvrđena ni povezanost koncentracije ovih peptida sa godišnjim priraštajem karijesa, a logistička regresiona analiza je pokazala da ispitivani HNP-1, hBD-2 i LL-37 nisu pokazali značaj pouzdanih prediktora karijesa. Stoga, na osnovu ovako dobijenih rezultata mogla bi se prihvatiti nulta hipoteza, odnosno da ispitivani defenzini i katelicidin nestimulisane pljuvačke nisu pouzdani karijes rizik biomarkeri u dečjem uzrastu, te da nisu od značaja u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece.

Kako za sada nema dovoljno longitudinalnih studija koje su analizirale značaj defenzina i katelicidina, ali i drugih antimikrobnih proteina pljuvačke, kao karijes rizik biomarkera u dečjem uzrastu, dobijene rezultate je teško komparirati.

Međutim, i pored prihvatanja nulte hipoteze, njihov mogući značaj u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece ne treba odbaciti. Pre svega, značaj antimikrobnih HNP-1, hBD-2 i LL-37 analiziran je jednogodišnjom studijom praćenja, što se može smatrati kratkim vremenskim periodom i jednim od glavnih ograničenja sprovedene studije. S druge strane, analiza značaja HNP-1 hBD-2 i LL-37 kao karijes rizik biomarkera u dečjem uzrastu nije tako jednostavna. Ovo proizilazi iz činjenice da salivarni nivo ovih peptida u dečjem uzrastu pokazuje individualne varijacije. S druge strane u dinamičnom salivarnom medijumu, salivarni nivo ovih peptida se može dovesti u vezu sa mnogim faktorima. To potvrđuju i rezultati sprovedene studije koji pokazuju korelaciju salivarnog nivoa ovih peptida sa uzrastom dece, ali i to da koncentracija aktivnih formi ispitivanih peptida zavisi od pH pljuvačke. Osim toga, vrlo je verovatno da mnoge salivarne komponente mogu da stupe u interakciju sa ovim peptidima i time utiču na koncentraciju aktivnih formi ovih peptida. Ovome, treba dodati i kompleksan

mehanizam antimikrobnog dejstva defenzina i ketelicidina, koji osim bazičnog, direktnog mehanizma antimikrobnog dejstva podrazumeva i stimulaciju stečenog imunog odgovora uz produkciju IgA. Zbog svega navedenog se može smatrati nerealnim očekivati da će jedan salivarni peptid sam po sebi biti dovoljan o pouzdan karijes rizik biomarker i da omogući ranu identifikaciju karijes prijemčive osobe. Stoga bi pri utvrđivanju značaja defenzina i ketelicidina kao karijes-rizik biomarkera bilo sasvim opravdano razmotriti primenu multimarker pristupa, pre nego analize njihove efikasnosti kao solo karijes rizik-biomarkera. Sve ovo je neophodno razmotriti pri dizajniranju budućih longitudinalnih studija, koje su neophodne da bi se detaljno ispitala efikasnost ovih peptida pljuvačke kao karijes rizik biomarkera. Pored toga, daljim studijama treba razmotriti i potencijalnu ulogu ostalih neimunoglobulinskih antimikrobnih proteina kojima je pljuvačka bogata. Dokazivanje njihove uloge kao pouzadnih karijes rizik biomarkera bi napravio ogroman pomak u oblasti dijagnostike karijes rizika, a posledično i u primarnoj prevenciji karijesa.

Za sada, bazirano na rezultatima sprovedene studije, uz socio-demografske karakteristike, najznačajnijim karijes rizik faktorima u dečjem uzrastu se mogu smatrati varijable vezane za oralnu higijenu, što sugeriše da je ključ prevencije karijesa u odgovornom ponašanju dece prema oralnom zdravlju i da mehanička kontrola plaka ostaje centralna karijes preventivna mera. Stoga programom zdravstvenog vaspitanja, treba obuhvatiti i decu i njihove roditelje, a sam program se nikako ne bi smeo da zasniva samo na pružanju informacija jer to obično daje kratkoročne rezultate. Stvaranje zdravih navika složen je i dugotrajan proces, za čiju efikasnost je potrebna i snažna motivacija i remotivacije dece da ih usvoje i kasnije primenjuju kroz život. To je ono na čemu se zasniva koncept promocije oralnog zdravlja i posebno je važan u svim razvojnim fazama detinjstva.

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenog istraživanja i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Koncentracija HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke u dečjem uzrastu pokazuje individualne varijacije, i korelira sa uzrastom dece. Salivarni nivo HNP-1 obrnuto, dok suprotno tome salivarni nivo hBD-2 i LL-37 direktno korelira sa uzrastom dece;
2. Utvrđena je obrnuta povezanost salivarnih koncentracija HNP-1, hBD-2 i LL-37 sa pH vrednostima nestimulisane pljuvačke;
3. Ispitivani HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke nisu pokazali značaj karijes rizik indikatora u dečjem uzrastu.
 - Najznačajniji karijes rizik indikatora u predškolskom uzrastu su pol, starost majki, dužina dojenja, frekventnost unosa rafiniranih ugljenih hidrata i vrednosti indeksa oralne higijene, dok su kod ranih adolescenata značaj karijes rizik indikatora pokazali obrazovanje roditelja, vrednosti indeksa oralne higijene, frekventnost i dužina izvođenja oralne higijene;
4. Ispitivani HNP-1, hBD-2 i LL-37 nestimulisane pljuvačke nisu pokazali značaj prediktora karijesa u dečjem uzrastu.
 - U predškolskom uzrastu najznačajniji prediktori karijesa su indeks oralne higijene i odsustvo poseta stomatologu, a kod ranih adolescenata uz pol, najveći karijes prediktivni značaj su pokazale varijable vezane za oralnu higijenu.

I pored nesumnjivog značaja u biološkoj kontroli karijesa, ispitivani defenzini i katelicidin nisu pokazali značaj pouzdanih karijes rizik biomarkera kod dece. Međutim, rezultati sprovedene studije sugerišu da analiza značaja defenzina i katelicidina pljuvačke

u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece nije tako jednostvana, budući da se u dinamičnom salivarnom medijumu njihov salivarni nivo može povezati sa brojnim faktorima. Sprovedena studija je pokazala da salivarni nivo ovih peptida korelira sa uzrastom dece i pH pljuvačke, ali je vrlo verovatno da se on može dovesti u vezu i sa mnogim salivarnim komponentama, sa kojima ovi peptidi mogu da stupe u interakciju, što značajno otežava precizno utvrđivanje njihovog značaja u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece. Stoga bi se moglo smatrati sasvim opravdanim sprovesti multimarker pristup pri utvrđivanju značaja defenzina i katelicidina kao karijes rizik biomarkera kod dece, pre nego analize njihove efikasnosti kao solo karijes rizik biomarkera. Sve ovo je neophodno razmotriti pri dizajniranju budućih longitudinalnih studija, koje su neophodne da bi se detaljno ispitala efikasnost ovih, ali i mnogih drugih, antimikrobnih peptida i proteina pljuvačke u oblasti procene rizika za nastanak karijesa kod dece. Do tada, bazirano na rezultatima sprovedene studije, socio-demografske karakteristike i oralno-higijenske navike ostaju važni karijes rizik faktori u dečjem uzrastu, sugerišući da ključ prevencije karijesa leži u odgovornom ponašanju osobe prema oralnom zdravlju i da mehanička kontrola dentalnog biofilma ostaje centralna karijes preventivna mera.

9. LITERATURA

1. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31(Suppl 1):3-24.
2. Vulović M i sar. Preventivna stomatologija. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu: Beograd; 2002.
3. Miller WD. Dental Decay. *Am J Dent Sci* 1889; 23(3):97-100.
4. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: Findings and implications. *Arch Oral Biol* 1960; 1(4):304-320.
5. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004; 83(Suppl 1):35-38.
6. Vojinović J. Organizovana prevencija u stomatologiji. Medicinski Fakultet: Banja Luka; 2012.
7. Colombo NH, Ribas LFF, Pereira JA, Kreling PF, Kressirer CA, Tanner ACR, Duque C.. Antimicrobial peptides in saliva of children with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol* 2016; 69:40-46.
8. Davidopoulou S, Diza E, Menexes G, Kalfas S. Salivary concentration of the antimicrobial peptide LL-37 in children. *Arch Oral Biol* 2012; 57(7):865-869.
9. Jurczak A, Kościelniak D, Papież M, Vyhouskaya P, Krzyściak W. A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. *Biol Res* 2015; 48(1):61-69.
10. Hale JD, Hancock RE. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5(6):951-959.
11. Anil S, Anand PS. Early Childhood Caries: Prevalence, Risk Factors, and Prevention. *Front Pediatr* 2017; 5:157
12. Ismail AI, Sohn W. A systematic review of clinical diagnostic criteria of early childhood caries. *J Public Health Dent* 1999; 59(3):171-191.

13. Gao XL, Hsu CYS, Xu Y, Hwang HB, Loh T, Koh D. Building caries risk assessment models for children. *J Dent Res* 2010; 89(6):637-643.
14. Ivanović M. Protokol za primenu fluorida. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu: Beograd; 2009.
15. Mitić N. Caries Profunda. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu: Niš; 1986.
16. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007; 369(9555):51-59.
17. Fejerskov O. Different concepts of dental caries and their implications. *Textbook of clinical cariology* 1994; 209-218.
18. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50(4):353-380.
19. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *CRE* 2008; 42(6):409-418.
20. Ivanović M, Mandić J, Jovičić O. Kontrola biofilma ključ prevencije oralnih oboljenja. *Acta Stom Naissi* 2012; 28(1):17-19.
21. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2000; 2(13):1599-1607.
22. Haffajee AD, Socransky SS, Feres M, Ximenez-Fyvie LA. Plaque Microbiology in Health and Disease. In: Newman HN, Wilson M. (Eds.), *Dental Plaque Revisited*. Bioline, Cardiff, 1999. p 255–282.
23. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71(4):653-670.
24. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* 1976; 9:65-107.
25. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1986; 13(10):905-911.
26. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003; 149(2):279-294.

27. Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides* 2010; 31(11):2003-2008.
28. Pepperney A, Chikindas ML. Antibacterial peptides: opportunities for the prevention and treatment of dental caries. *Probiotics Antimicro Prot* 2011; 3(2):68-96.
29. Kuramitsu HK. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *critical reviews in oral biology & Medicine* 1993; 4(2):159-176.
30. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993; 72(1):37-45.
31. Brailsford SR, Lynch EJR, Beighton D. The isolation of actinomyces naeslundii from sound root surfaces and root carious lesions. *CRE* 1998; 32(2):100-106.
32. Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol* 2007; 45(1):81-87.
33. Mauriello SM, Bader JD, Disney JA, Graves RC. Examiner agreement between hygienists and dentists for caries prevalence examinations. *J Public Health Dent* 1990;50(1):32-37.
34. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27(1):31-40.
35. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27(1):31-40.
36. Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Ass* 2000;131(7):887-899.
37. Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dent J* 2008; 53(3):286-291.

38. Featherstone JDB, Glana R, Shariati M, Shields CP. Dependence of in vitro demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res* 1990; 69 (Suppl 2):620-625.
39. Twetman S, Fontana M. Patient caries risk assessment. In: Detection, assessment, diagnosis and monitoring of caries. Karger Publishers, 2009. p. 91-101.
40. Stošić P i sar. Preventivna i dečja stomatologija. Dečja knjiga: Gornji Milanovac. 1982.
41. Dožić I, Todorović T. Antimicrobial peptides of human saliva. *Stom Glas Srb* 2005; 52(4):208-216.
42. Gorr SU, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease: Antimicrobial peptides. *J Clin Periodontol* 2011; 38:126-141.
43. Gorr SU. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology* 2000 2009; 51(1):152-180.
44. Gudmundsson GH, Agerberth B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J Immunol Methods* 1999; 232(1):45-54.
45. Brown KL, Hancock RE. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(1):24-30.
46. Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000; 8(9):402-410.
47. Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2006; 1758(9):1408-1425.
48. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol* 2010;5 (1):99-113.

49. Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 2001;1(3):156-164.
50. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial Peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLOS Pathogens* 2010; 6(10): e1001067.
51. da Silva BR, Freitas VAA , Nascimento-Neto LG, Carniero VA, Arruda FVS, de Aguiar ASW, Cavada BS, Teixeira EH. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature. *Peptides* 2012; 36(2):315-321.
52. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara MK, Koji H, Kurihara H, Sugai M. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(6):888-896.
53. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3(3):238-250.
54. Ehrenstein G, Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* 1977; 10(1):1-34.
55. Mor A, Nicolas P. The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J Biol Chem* 1994; 269(3):1934-1939.
56. Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry* 1992; 31(49), 12416-12423
57. Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, et al. Salivary Antimicrobial Peptide Expression and Dental Caries Experience in Children. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(9):3883-3888.
58. Ghosh SK, Gerken TA, Schneider KM, Feng Z, McCormick TS, Weinberg A. Quantification of human β -defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. *Clin Chem* 2007; 53(4):757-765.

59. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense. *Annual Rev Immun* 2004;22(1):181-215.
60. Hancock REW, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(6):1317-1323.
61. White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* 1995;5(4):521-527.
62. Bastos P, Trinidad F, da Costa J, Ferreira R, Vitorino R. Human antimicrobial peptides in bodily fluids: current knowledge and therapeutic perspectives in the postantibiotic era. *Medic Res Rev* 2018; 38(1): 101-146.
63. Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc* 2003; 36(4):247-252.
64. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology* 2005; 6(6):551-557.
65. Greer A, Zenobia C, Darveau RP. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium. *Periodontology* 2000 2013;63(1):67-79.
66. Xie Z, Feng J, Yang W, Xiang F, Yang F, Zhao Y, Cao Z, Li W, Chen Z, Wu Y. Human α -defensins are immune-related Kv1.3 channel inhibitors: new support for their roles in adaptive immunity. *FASEB J* 2015; 29(10):4324-4333.
67. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2005;7(2):119-133.
68. Yin L, Chino T, Horst OV, Hacker BM, Clark EA, Dale BA; Chung Wo. Differential and coordinated expression of defensins and cytokines by gingival epithelial cells and dendritic cells in response to oral bacteria. *BMC Immunology* 2010; 11(1):1-14.
69. Lehrer RI, Ganz T. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol* 2002; 9(1):18–22.

70. Wang G, Mishra B, Epanand RF, Epanand RM. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2014; 1838(9):2160-2172.
71. Zanetti M, Gennaro R, Scocchi M, Skerlavaj B. Structure and biology of cathelicidins. In: Keisari Y, Ofek I, eds. *The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer US; 2002:203-218.
72. Bachrach G, Chaushu G, Zigmond M, et al. Salivary LL-37 secretion in individuals with Down Syndrome is normal. *J Dent Res* 2006; 85(10):933-936.
73. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2907-2915.
74. Tsutsumi- Ishii Y, Nagaoka I. NF- κ B-mediated transcriptional regulation of human β -defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol* 2002; 71(1):154-162.
75. Malik E, Dennison SR, Harris F, Phoenix DA. pH dependent antimicrobial peptides and proteins, their mechanisms of action and potential as therapeutic agents. *Pharmaceuticals* 2016;9(4):67.
76. Bucki R, Namiot DB, Namiot Z, Savage PB, Janmey PA. Salivary mucins inhibit antibacterial activity of the cathelicidin-derived LL-37 peptide but not the cationic steroid CSA-13. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(2):329-335.
77. Tomita T, Hitomi S, Nagase T, Matsui H, Matsuse T, Kimura S, Ouchi Y. Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol Immunol* 2000; 44(9):749-754.
78. Nishimura E, Eto A, Kato M, Hashiyume S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. Oral Streptococci exhibit diverse susceptibility to human β -defensin-2: antimicrobial effects of hBD-2 on oral Streptococci. *Curr Microbiol* 2004; 48(2):85-87.

79. Eberhard J, Menzel N, Dommisch H, Winter J, Jepsen S, Mutters R. The stage of native biofilm formation determines the gene expression of human β -defensin-2, psoriasin, ribonuclease 7 and inflammatory mediators: a novel approach for stimulation of keratinocytes with in situ formed biofilms. *Oral Microbio Immuno* 2008; 23(1):21-28.
80. Dale BA, Tao R, Kimball JR, Jurevic RJ. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health* 2006; 6(1):S13.
81. Wilmarth PA, Riviere MA, Rustvold DL, Lauten JD, Madden TE, David LL. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *J Proteome Res* 2004; 3(5):1017-1023.
82. Dodds MWJ, Johnson DA, Mobley CC, Hattaway KM. Parotid saliva protein profiles in caries-free and caries-active adults. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod* 1997; 83(2):244-251.
83. Pedersen A, Reibel J, Nordgarden H, Bergem H, Jensen J, Nauntofte B. Primary Sjögren's syndrome: salivary gland function and clinical oral findings. *Oral Dis* 2008;5(2):128-138.
84. Kapas S, Pahal K, Cruchley AT, Hagi-Pavli E, Hinson JP. Expression of adrenomedullin and its receptors in human salivary tissue. *J Dent Res* 2004;83(4):333-337.
85. Słotwińska SM. Review paper Immunological aspects of dental caries. *Cent Euro J Immunol* 2012; 37(2): 182-185
86. Marcotte H, Lavoie MC. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(1):71-109.
87. Filstrup SL, Briskie D, Lawrence L, Wandera A, Inglehart MR. Early childhood caries and quality of life: child and parent perspectives. *Pediatr Dent* 2003; 25(5): 431-440.

88. Feldens CA, Ardenghi TM, Dullius AIDS, Vargas-Ferreira F, Hernandez PAG, Kramer PF. Clarifying the impact of untreated and treated dental caries on oral health-related quality of life among adolescents. *CRE* 2016; 50(4):414-421.
89. Mota-Veloso I, Soares MEC, Alencar BM, Marques LS, Ramos-Jorge ML, Ramos-Jorge J. Impact of untreated dental caries and its clinical consequences on the oral health-related quality of life of schoolchildren aged 8–10 years. *Qual Life Res* 2016; 25(1):193-199.
90. Nora ÂD, da Silva RC, de Oliveira RR, Soares FZM, Minatel Braga M, Lenzi TL. Is Caries associated with negative impact on oral health-related quality of life of pre-school children? A Systematic review and meta-analysis. *Pediatr Dent* 2018; 40(7):403-411.
91. Pinheiro SA, Rodrigues HB, Santos JTL, Granja GL, Lussi A, Leal SC, Diniz MB. Association of dental caries morbidity stages with oral health-related quality of life in children and adolescents. *Int J Paed Dent* 2020; 30(3):293-303.
92. Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *CRE* 1999; 33(4):252-260.
93. Tinanoff N, Douglass JM. Clinical decision-making for caries management in primary teeth. *J Dent Educ* 2001; 65(10):1133-1142.
94. Hildebrandt GH. Caries risk assessment and prevention for adults. *J Dent Educ* 1995; 59(10):972-979.
95. Fontana M. The clinical, environmental, and behavioral factors that foster early childhood caries: evidence for caries risk assessment. *Pediatr Dent* 2015; 37(3):217-225.
96. Fontana M, Zero DT. Assessing patients' caries risk. *J Am Dent Assoc* 2006;137(9):1231-1239.

97. Masood M, Yusof N, Hassan MIA, Jaafar N. Assessment of dental caries predictors in 6-year-old school children - results from 5-year retrospective cohort study. *BMC Public Health* 2012;12(1):989.
98. Apostolović M i sar. Preventivna stomatologija. Galaksija:Niš. 2015.
99. Axelsson P, Paulander J, Svärdröm G, Tollskog G, Nordensten S. Integrated caries prevention effect of a needs-related preventive program on dental caries in children. *CRE* 1993; 27 (Suppl 1):83-94.
100. Fontana M, Jackson R, Eckert G, et al. Identification of caries risk factors in toddlers. *J Dent Res* 2011; 90(2):209-214.
101. Ignjatović A. Primena multimarker pristupa u proceni rizika kod pacijenata na dijelizi. Doktorska disertacija; Univerzitet u Nišu: Medicinski fakultet 2011.
102. Tagliaferro EP, Ambrosano GMB, Meneghim M de C, Pereira AC. Risk indicators and risk predictors of dental caries in schoolchildren. *J Appl Oral Sci* 2008; 16(6):408-413.
103. Harris R, Nicoll AD, Adair PM, Pine CM. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. *Community Dent Health* 2004; 21(1): 71-85
104. Mejåre I, Axelsson S, Dahlén G, Espelid I, Norlund A, Tranaeus S. Caries risk assessment. A systematic review. *Acta Odontol Scan* 2014; 72(2):81-91.
105. Miravet RA, Company MJM, Almerich Silla JM. Evaluation of caries risk in a young adult population. *Med Oral, Patol Oral Cir Bucal* 2007;12(5):412-418.
106. Disney JA, Graves RC, Stamm JW, Bohannon HM, Abernathy JR, Zack DD. The University of North Carolina Caries Risk Assessment study: further developments in caries risk prediction. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992; 20(2):64-75.
107. Nigel BP. Risk assessment and caries prediction. *J Dent Educ* 1998; 62:762-770.

108. Tagliaferro EP, Pereira AC, Meneghim M de C, Ambrosano GMB. Assessment of dental caries predictors in a seven-year longitudinal study. *J Public Health Dent* 2006; 66(3):169-173.
109. Kornman KS. Diagnostic and prognostic tests for oral diseases: Practical applications. *J Dent Educ* 2005; 69(5):498-508.
110. Thibodeau EA, O'Sullivan DM, Tinanoff N. Mutans streptococci and caries prevalence in preschool children. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993; 21(5):288-291.
111. Stecksén- Blicks C. Salivary counts of lactobacilli and *Streptococcus mutans* in caries prediction. *Eur J Oral Sci* 1985; 93(3):204-212.
112. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3):1001-1009.
113. Gao X, Hsu CYS, Loh T, Hwang B, Koh D. Role of microbiological factors in predicting early childhood caries. *Pediatr Dent* 2014; 36(4):348-354.
114. Holbrook WP. Dental caries and cariogenic factors in pre-school urban icelandic children. *CRE* 1993; 27(5):431-437. 5
115. Burt BA, Eklund SA, Morgan KJ, Larkin FE, Guire KE, Brown LO, Weintraub JA. The effects of sugars intake and frequency of ingestion on dental caries increment in a three-year longitudinal study. *J Dent Res* 1988;67(11):1422-1429.
116. Burt BA, Pai S. Sugar Consumption and Caries Risk: A Systematic Review. *J Dent Educ* 2001; 65(10):1017-1023.
117. Toumba KJ, Twetman S, Splieth C, Parnell C, van Loveren C, Lygidakis NA. Guidelines on the use of fluoride for caries prevention in children: an updated EAPD policy document. *Eur Arch Paediatr Dent* 2019; 20(6):507-516.
118. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology* 2000 2016; 70(1):128-141.

119. Preethi BP, Reshma D, Anand P. evaluation of flow rate, ph, buffering capacity, calcium, total proteins and total antioxidant capacity levels of saliva in caries free and caries active children: An in vivo study. *Indian J Clin Biochem.* 2010; 25(4):425-428. d
120. Reich E, LussiA, Newbrun E. Caries- risk assessment. *Int Dent J* 1999; 49(1): 15-26.
121. Watson MR, Horowitz AM, Garcia I, Canto MT. Caries conditions among 2–5-year- old immigrant Latino children related to parents’ oral health knowledge, opinions and practices. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27(1):8-15.
122. Chaffee BW, Gansky SA, Weintraub JA, Featherstone JDB, Ramos-Gomez FJ. Maternal oral bacterial levels predict early childhood caries development. *J Dent Res* 2014; 93(3):238-244.
123. Hooley M, Skouteris H, Boganin C, Satur J, Kilpatrick N. Parental influence and the development of dental caries in children aged 0–6 years: A systematic review of the literature. *J Dent* 2012; 40(11):873-885.
124. Beck JD, Kohout F, Hunt RJ. Identification of high caries risk adults: attitudes, social factors and diseases. *Int Dent J* 1988; 38(4):231-238.
125. Hausen H, Kärkkäinen S, Seppä L. Application of the high-risk strategy to control dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28(1):26-34.
126. American Academy of Pediatric Dentistry et al. Guideline on caries-risk assessment and management for infants, children, and adolescents. *Pediatric dentistry* 2013;35(5): E157
127. American Dental Association. Caries form (patients 0-6). Available at: https://www.ada.org/~media/ADA/Member%20Center/Files/topics_caries_under6.ashx.
128. American Dental Association. Caries form (patients > 6). Available at: http://www.ada.org/~media/ADA/Science%20and%20Research/Files/topic_caries_over6.ashx

129. Bratthall D, Petersson GH. Cariogram – a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005; 33(4):256-264.
130. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharm Therap* 2001;69(3):89-95.
131. Sreebny LM. Saliva: its role in health and disease. Working Group 10 of the Commission on Oral Health, Research and Epidemiology (CORE). *Int Dent J* 1992; 42:287-304.
132. Singh S, Sharma A, Sood PB, Sood A, Zaidi I, Sinha A. Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study. *J Oral Biol Craniofac Res* 2015; 5(2):59-64.
133. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci* 2017; 9(11):1-8.
134. World Health Organization. *Oral Health Surveys: basic methods* 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2013.
135. Klein H, Palmer CE; Knutson JW. Studies on dental caries: I. Dental status and dental needs of elementary school children. *Public Health Reports* 1938; 751-765.
136. Greene JG, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. *J Am Dent Assoc* 1964; 68(1):7-13.
137. Sowole A, Sote E, Folayan M. Dental caries pattern and predisposing oral hygiene related factors in Nigerian preschool children. *Eur Arch Paediatr Dent* 2007; 8(4):206-210.
138. Thomson WM. Public health aspects of paediatric dental treatment under general anaesthetic. *Dent J* 2016; 4(2):20.
139. Jose BG. Increased expression and levels of human β defensins (hBD2 and hBD4) in adults with dental caries. *Journal of Health Sciences* 2013;3(2)
140. Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, Levy SM, Banas JA. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free

- individuals differ in sensitivity to host anti-microbial peptides. *Mol Oral Microbiol* 2011; 26(3):187-199.
141. Gyll J, Ridell K, Öhlund I, Karlsland Åkeson P, Johansson I, Lif Holgerson P. Vitamin D status and dental caries in healthy Swedish children. *Nutrition J* 2018; 17(1):11.
142. Raftery T, Martineau AR, Greiller CL, Gsosh S, McNamara D, Bennett K, Meddings J, O Sullivan M . Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *United Eur Gastroent J* 2015; 3(3):294-302.
143. Sivakumar T, Hand AR, Mednieks M. Secretory proteins in the saliva of children. *J Oral Sci* 2009; 51(4):573-580.
144. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res* 2000; 14(1):40-47.
145. Shiomi K, Nakazato M, Ihi T, Kangawa K, Matsuo H, Matsukura S. Establishment of radioimmunoassay for human neutrophil peptides and their increases in plasma and neutrophil in infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195(3): 1336-1344.
146. Könönen E. Oral colonization by anaerobic bacteria during childhood: role in health and disease. *Oral Dis* 1999;5(4):278-285.
147. Malcolm J, Sherriff A, Lappin DF, Ramage G, Conway DI, Macpherson LMD, Culshaw S. Salivary antimicrobial proteins associate with age-related changes in streptococcal composition in dental plaque. *Mol Oral Microbiol* 2014;29(6):284-293.
148. <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/a/l-arginine.html>

149. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB, Guthmiller JM. Correlation between β -defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005; 42(9):1073-1084.
150. Chung WO, Dale BA. Innate Immune Response of Oral and Foreskin Keratinocytes: Utilization of Different Signaling Pathways by Various Bacterial Species. *Infect Immun* 2004; 72(1):352-358.
151. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Grahm S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB. Production of β -Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands. *Infect Immun* 1999; 67(6):2740-2745.
152. Simon-Soro A, Sherriff A, Sadique S, Ramage G, Macpherson L, Mira A, Malcolm SC. Combined analysis of the salivary microbiome and host defence peptides predicts dental disease. *Sci Reports* 2018; 8(1):1484-1494.
153. Mai S, Mauger MT, Niu L, Barnes JB, Kao S, Bergeron BE, Ling J, Tay FR. Potential applications of antimicrobial peptides and their mimics in combating caries and pulpal infections. *Acta Biomater* 2017; 49:16-35.
154. Aida KL, Kreling PF, Caiaffa KS, Calixto GMF, Chorilli M, Spolidorio DMP, Santos Filho NA, Cilli EM, Duque C. Antimicrobial peptide-loaded liquid crystalline precursor bioadhesive system for the prevention of dental caries. *Int J Nanomedicine* 2018; 13:3081-3091.
155. Pálffy R, Gardlík R, Behuliak M, Kadasi L, Turna J, Celec P. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. *Mol Med* 2009; 15(1):51-59.
156. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. Human β Defensin 2 Is a Salt-sensitive Peptide Antibiotic Expressed in Human Lung. *J Clin Invest* 1998; 102.5: 874-880.
157. Seow WK. Environmental, maternal, and child factors which contribute to early childhood caries: a unifying conceptual model. *Int J Paediatr Dent* 2012; 22(3):157-168.

158. Niji R, Arita K, Abe Y, Lucas ME, Nishino M, Mitome M. Maternal age at birth and other risk factors in early childhood caries. *Pediatr Dent* 2010; 32(7):493-498.
159. Hoeft KS, Masterson EE, Barker JC. Mexican American mothers' initiation and understanding of home oral hygiene for young children. *Pediatr Dent* 2009; 31(5):395-404.
160. Nirunsittirat A, Pitiphat W, McKinney CM, DeRouen TA, Chansamak N, Angwaravong O, Patcharanuchat P, Pimpak T. Breastfeeding duration and childhood caries: A cohort study. *Caries Res* 2016; 50(5):498-507.
161. Ölmez S, Uzamýb M, Erdem G. Association between early childhood caries and clinical, microbiological, oral hygiene and dietary variables in rural Turkish children. *Turk J Pediatr* 2003; 45(3): 231-236.
162. Prakash P, Subramaniam P, Durgesh BH, Konde S. Prevalence of early childhood caries and associated risk factors in preschool children of urban Bangalore, India: A cross-sectional study. *Eur J Dent* 2012; 06(2):141-152.
163. Arora A, Scott JA, Bhole S, Do L, Schwarz E, Blinkhorn AS. Early childhood feeding practices and dental caries in preschool children: a multi-centre birth cohort study. *BMC Public Health* 2011; 11(1):28.
164. Retnakumari N, Cyriac G. Childhood caries as influenced by maternal and child characteristics in pre-school children of Kerala-an epidemiological study. *Contemp Clin Dent* 2012;3(1):2-8.
165. Boka V, Trikaliotis A, Kotsanos N, Karagiannis V. Dental caries and oral health-related factors in a sample of Greek preschool children. *Eur Arch Paediatr Dent* 2013;14(6):363-368.
166. Nota A, Caruso S, Cantile T, Gatto R, Ingenito A, Tecco S, Ferrazzano GF. Socioeconomic Factors and Oral Health-Related Behaviours Associated with Dental Caries in Preschool Children from Central Italy (Province of Ascoli Piceno). *BioMed Res. Int* 2019, doi.org/10.1155/2019/7981687.

167. Brito ÁS, Clementino MA, Gomes MC, Neves ÉTB, de Sousa Barbosa A, de Medeiros CA, de Aquino MM, Granville-Garcia AF, de Menezes VA, Barbosa NÉT; Barbosa AS. Sociodemographic and behavioral factors associated with dental caries in preschool children: Analysis using a decision tree. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2018; 36(3):244-249.
168. Devenish G, Mukhtar A, Begley A, Spencer AJ, Thomson WM, Ha D, Do L, Scott JA. Early childhood feeding practices and dental caries among Australian preschoolers. *Am J Clin Nutr* 2020; 111(4):821-828.
169. Iida H, Auinger P, Billings RJ, Weitzman M. Association between infant breastfeeding and early childhood caries in the united states. *Pediatrics* 2007; 120(4):e944-e952.
170. Valaitis R, Hesch R, Passarelli C, Sheehan D, Sinton J. A systematic review of the relationship between breastfeeding and early childhood caries. *Can J Public Health* 2000; 91(6):411-417.
171. Casanova-Rosado AJ, Medina-Solís CE, Casanova-Rosado JF, Vallejos-Sánchez AA, Maupomé G, Ávila-Burgos L. Dental caries and associated factors in Mexican schoolchildren aged 6–13 years. *Acta Odontol Scan* 2005; 63(4):245-251.
172. David J, Wang NJ, Åstrøm AN, Kuriakose S. Dental caries and associated factors in 12-year-old schoolchildren in Thiruvananthapuram, Kerala, India. *Int J Paediatr Dent* 2005; 15(6):420-428.
173. Hashizume LN, Shinada K, Kawaguchi Y. Factors associated with prevalence of dental caries in Brazilian schoolchildren residing in Japan. *J Oral Sci* 2011; 53(3):307-312.
174. Ivanović M, Carević M. Program stomatološke zdravstvene zaštite stanovništva Srbije. In: Carevic M, editor. Zbornik referata i radova XXVIII, XXIX i XXX Simpozijum zdravstvenog vaspitanja u stomatologiji. Trideset godina zdravstvenog vaspitanja u stomatologiji; 21.jun 2014; Beograd:Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2017. p. 121-131

175. Pelkwijk A, Helderma WHP, Dijk JWE. Caries Experience in the Deciduous Dentition as Predictor for Caries in the Permanent Dentition. *CRE* 1990; 24(1):65-71.
176. Alaluusua S, Kleemola- Kujala E, Grönroos L, Evälahti M. Salivary caries-related tests as predictors of future caries increment in teenagers. A three-year longitudinal study. *Oral Microbiol Immun* 1990; 5(2):77-81.
177. Holbrook WP, Soet JJ de, Graaff J de. Prediction of Dental Caries in Pre-School Children. *CRE* 1993; 27(5):424-430.
178. Isaksson H, Alm A, Koch G, Birkhed D, Wendt LK. Caries prevalence in Swedish 20-year-olds in relation to their previous caries experience. *CRE* 2013; 47(3):234-242.
179. Edelstein BL, Ureles SD, Smaldone A. Very High Salivary Streptococcus Mutans Predicts Caries Progression in Young Children. *Pediatr Dent* 2016; 38(4):325-330.
180. Leong PM, Gussy MG, Barrow S-YL, Silva- Sanigorski A, Waters E. A systematic review of risk factors during first year of life for early childhood caries. *Int J Paediat Dent* 2013; 23(4):235-250.
181. Powell LV. Caries prediction: a review of the literature. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26(6):361-371.

10. PRILOG

Prilog 1

Datum anketiranja: _____

Šifra ispitanika: _____

Pol deteta: M Ž

ANKETNI LIST 1
(za decu predškolskog uzrasta)

1. Datum i mesto rođenja deteta: _____
2. Mesto stalnog prebivališta deteta: _____
3. Starost majke u trenutku pregleda deteta: _____
Starost oca u trenutku pregleda deteta: _____
4. Da li Vaše dete boluje od neke sistemske bolesti?
 1. Ne
 2. Da, _____ (dopisati od koje bolesti boluje dete)
5. Da li je Vaše dete u poslednjih mesec dana iz bilo kog razloga koristilo antibiotike?
 1. Ne
 2. Da
6. Obrazovanje roditelja:

a) Majke <input type="checkbox"/> Završen fakultet ili viša škola <input type="checkbox"/> Završena srednja škola <input type="checkbox"/> Završena osnovna škola	b) Oca <input type="checkbox"/> Završen fakultet ili viša škola <input type="checkbox"/> Završena srednja škola <input type="checkbox"/> Završena osnovna škola
---	---
7. Da li je dojeno Vaše dete? Ukoliko jeste, koliko dugo je dojenje trajalo?
 1. Ne
 2. Da, _____ meseci (dopisati)
8. Koliko obroka u toku dana ima Vaše dete?
 1. 3 glavna bez užina (međuobroka)
 2. 3 glavna + _____ (dopisati broj užina-međuobroka)
9. Koliko često navedene namirnice jede/pije Vaše dete?

	Manje od jednom dnevno	Jednom dnevno	Dva i više puta dnevno
Voćne sokove, gazirane napitke			
Slatkiše			
Grickalice			

10. Koliko često Vaše dete pere zube?
 1. Ne pere zube
 2. Retko, u proseku jednom nedeljno
 3. Svakog dana, samo ujutru
 4. Svakog dana, samo uveče
 5. Svakog dana, ujutru i uveče
 6. Posle svakog obroka

11. Koju pastu koristite za pranje zuba Vašeg deteta?

1. Dečju pastu za zube/500 ppm F
2. Komercijalnu pastu za zube za odrasle/1450 ppm F
3. Pastu za zube bez fluorida
4. Ne koristi pastu za pranje zuba

12. Da li Vaše dete koristi ili je koristilo tablete sa fluoridima?

1. Ne
2. Da, svakodnevno
3. Ponekad

13. Da li Vaše dete ima svog stomatologa?

1. Da, u državnoj službi
2. Da, u privatnom sektoru
3. Ne

14. Koliko puta je u poslednjih 12 meseci Vaše dete posetilo stomatologa?

1. Jednom
2. 2-4 puta
3. Više od 5 puta
4. Nijednom

Prilog 2

Datum anketiranja: _____

Šifra ispitanika: _____

Pol deteta: M Ž

**ANKETNI LIST 2
(za rane adolescente)**

1. Datum i mesto rođenja deteta: _____
2. Stalno prebivalište deteta: _____
3. Starost majke u trenutku pregleda deteta: _____
Starost oca u trenutku pregleda deteta: _____
4. Da li Vaše dete boluje od neke sistemske bolesti?
 1. Ne
 2. Da, _____ (dopisati od koje bolesti boluje dete)
5. Da li je Vaše dete u poslednjih mesec dana iz bilo kog razloga koristilo antibiotike?
 1. Ne
 2. Da
6. Obrazovanje roditelja:

a) Majke <input type="checkbox"/> Završen fakultet ili viša škola <input type="checkbox"/> Završena srednja škola <input type="checkbox"/> Završena osnovna škola	b) Oca <input type="checkbox"/> Završen fakultet ili viša škola <input type="checkbox"/> Završena srednja škola <input type="checkbox"/> Završena osnovna škola
---	---
7. Koliko obroka u toku dana ima Vaše dete?
 1. 3 glavna bez užina (međuobroka)
 2. 3 glavna + _____ (dopisati broj užina-međuobroka)
8. Koliko često navedene namirnice jede/pije Vaše dete?

	Manje od jednom dnevno	Jednom dnevno	Dva i više puta dnevno
Voćne sokove, gazirane napitke			
Slatkiše			
Grickalice			

9. Koliko često Vaše dete pere zube?
 1. Ne pere zube
 2. Retko, u proseku jednom nedeljno
 3. Svakog dana, samo ujutru
 4. Svakog dana, samo uveče
 5. Svakog dana, ujutru i uveče
 6. Posle svakog obroka

11. BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Branislava Stojković je rođena 13.04.1978. godine u Nišu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, studijska grupa Stomatologija upisala je školske 1997/98. godine, a diplomirala 2004. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9,49 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Obavezni lekarski staž obavila je u Vojnoj bolnici u Nišu, nakon čega je položila stručni ispit. Specijalistički ispit iz Preventivne i dečje stomatologije položila je 2014. godine. Zaposlena je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu u svojstvu asistenta na UNO Preventivna i dečja stomatologija, i Klinici za stomatologiju u Nišu kao lekar specijalista Preventivne i dečje stomatologije.

Akadske doktorske studije, smer „Bazična istraživanja u stomatologiji“ na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu je upisala školske 2008/2009. godine. Odlukom Nastavno naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu odobren joj je prelaz na Doktorske akademske studije – Stomatološke nauke, gde je položila sve ispite predviđene planom i programom. Odlukom Naučno stručnog veća Univerziteta u Nišu za medicinske nauke broj 8/19-01-002/17-015 odobrena joj je tema za izradu doktorske disertacije pod nazivom „Značaj salivarnih defenzina i katelicidina u proceni rizika za nastanak karijesa kod dece“.

Dr Branislava Stojković je autor i koautor većeg broja naučnih i stručnih radova objavljenih u vodećim i značajnim inostranim i domaćim časopisima, kao i saopštenja na internacionalnim i domaćim skupovima.

IZJAVE
AUTORA

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ЗНАЧАЈ САЛИВАРНИХ ДЕФЕНЗИНА И КАТЕЛИЦИДИНА У ПРОЦЕНИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК КАРИЈЕСА КОД ДЕЦЕ

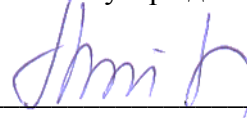
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Др Бранислава Б. Стојковић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И
ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

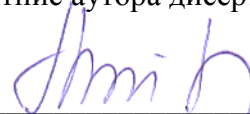
Наслов дисертације:

**ЗНАЧАЈ САЛИВАРНИХ ДЕФЕНЗИНА И КАТЕЛИЦИДИНА У ПРОЦЕНИ
РИЗИКА ЗА НАСТАНАК КАРИЈЕСА КОД ДЕЦЕ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Др Бранислава Б. Стојковић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ЗНАЧАЈ САЛИВАРНИХ ДЕФЕНЗИНА И КАТЕЛИЦИДИНА У ПРОЦЕНИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК КАРИЈЕСА КОД ДЕЦЕ

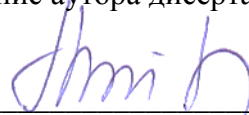
Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Др Бранислава Б. Стојковић