

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Elvis Božac

UTJECAJ AEROSOLA NASTALOG IZ SUSTAVA ZA
ZAGRIJAVANJE DUHANA NA MIKROBIOM SUPRAGINGIVNOG
DENTALNOG BIOFILMA

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Elvis Božac

UTJECAJ AEROSOLA NASTALOG IZ SUSTAVA ZA
ZAGRIJAVANJE DUHANA NA MIKROBIOM SUPRAGINGIVNOG
DENTALNOG BIOFILMA

Doktorski rad

Mentorica: Doc.dr.sc. Romana Peršić Bukmir, dr.med.dent.

Komentorica: Doc.dr.sc. Bojana Mohar Vitezić, mag.mikrobiol.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Elvis Božac

THE IMPACT OF AEROSOLS GENERATED FROM TOBACCO
HEATING SYSTEMS ON THE SUPRAGINGIVAL DENTAL
BIOFILM MICROBIOME

PhD Thesis

Rijeka, 2025

Mentor rada: Doc. dr. sc. Romana Peršić Bukmir, dr. med. dent.

Komentor rada: Doc. dr. sc. Bojana Mohar Vitezić, mag. mikrobiol.

Doktorska disertacija obranjena je dana _____ u/ na
_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 148 listova, 31 sliku, 1 shemu, 34 tablica i 233 literaturna navoda

UDK:

PREDGOVOR

Ovo istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Okolišni čimbenici i mikrobiološke interakcije u strukturi dentalnog biofilma“. Projekt je financirala Hrvatska zaklada za znanost (IP-2020-02 4027).

Zahvaljujem se svojim mentoricama docentici Romani Peršić Bukmir i docentici Bojani Mohar Vitezić na iznimnom trudu, strpljenju i nesebičnoj pomoći u provedbi ovog istraživanja. Hvala Vam što sam u svakom trenutku mogao računati na Vas.

Zahvaljujem se profesoru Stjepanu Špalju, voditelju projekta, bez čije pomoći i ustrajnosti provedba ovog istraživanja ne bi bila moguća.

Zahvaljujem se Nataši i Simonu, djelatnicima laboratorija Omega d.o.o. na pomoći u provedbi istraživanja. Ugodan boravak u Vašem laboratoriju će mi zauvijek ostati u sjećanju.

Zahvaljujem se profesoru Jurici Žučku i docentu Matjažu Hladniku na uloženom trudu u provedbi istraživanja.

Zahvaljujem se djelatnicima Katedre za Mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci koji su mi pomogli u provedbi istraživanja.

Zahvaljujem se mojim dragim kolegama, djelatnicima Katedre za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Fakulteta dentalne medicine u Rijeci koji su me od mog dolaska na katedru prihvatili kao člana obitelji.

Zahvaljujem se svojim mentorima u kliničkom radu doktorici Lauri Fosco Glavaš, docentu Damiru Šnjariću, a najviše profesoru Alenu Brautu na svom prenesenom znanju. Hvala Vam što ste me naučili raditi posao koji volim.

Ovaj rad posvećen je mojim roditeljima kojima su mi uvijek bili najveća i najsigurnija podrška.

SAŽETAK

Ciljevi: Ciljevi istraživanja bili su procijeniti i usporediti kliničke karakteristike pušača THS-a (engl. Tobacco heating systems), pušača cigareta i nepušača te utvrditi i usporediti sastave njihovih supragingivnih dentalnih biofilмова te dodatno, prema dobivenim podacima učiniti procjenu karijes rizika Cariogram metodom i procijeniti kariogeni potencijal supragingivnog dentalnog biofilma.

Materijali i metode: U istraživanju je sudjelovalo 69 ispitanika podijeljenih u tri skupine: pušači THS-a, pušači cigareta i nepušači. Podaci o kliničkim karakteristikama prikupljeni su putem kliničkog pregleda te kliničkih i laboratorijskih testova. Podaci o prehranbenim, preventivnim i navikama pušenja prikupljeni su putem upitnika. Prikupljeni podaci korišteni su za provedbu procjene karijes rizika Cariogram metodom. Prikupljeni su uzorci supragingivnog dentalnog biofilma iz kojih je izolirana DNK te je provedeno amplikon sekvencioniranje hipervarijabilnih regija 16s rRNK gena metodom sekvenciranja iduće generacije. Bioinformatičkom analizom utvrđeni su sastav i zastupljenost bakterijskih vrsta u uzorcima supragingivnih dentalnih biofilмова ispitanika.

Rezultati: Utvrđene su razlike u kliničkim karakteristikama ispitivanih skupina koje se tiču salivarne razine *S.mutans* ($p<0,001$) i *Lactobacillus spp.* ($p<0,001$), stupnja nakupljanja biofilma ($p=0,034$.) količine izlučene sline ($p<0,001$) i pH sline ($p=0,009$). Nepušači su imali povećan rizik za nastanak karijesa zbog prehranbenih navika ($p<0,001$). Značajne razlike u sastavu mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilмова ispitivanih skupina pronađene su na svim taksonomskim razinama, a najznačajnije razlike pronađene su na razini rodova *Actinobaculum* ($p=0,004$), *Avibacterium* ($p=0,015$), *Alysiella* ($p=0,016$), *Propionibacterium* ($p=0,025$) i *Haemophilus* ($p=0,030$).

Zaključak: Pušenje THS-a i cigareta povezano je s kliničkim karakteristikama koje utječu na nastanak karijesa. Sastavi mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilмова pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača se razlikuju, a zbog povećane zastupljenosti anaeroba s kariogenim svojstvima u skupinama pušača THS-a i pušača cigareta kariogeni potencijal njihovih biofilмова se može smatrati većim nego u nepušača.

Ključne riječi: Dentalni karijes; Dentalni plak; Mikrobiota; Naprave za pušenje; Pušenje

SUMMARY

Objectives: The objectives of the present study were to compare the clinical characteristics of THS (Tobacco heating systems) smokers, cigarette smokers and non-smokers and to compare the composition of their supragingival dental biofilm microbiomes. Additionally, through the obtained data, further goals of the study included the assessment of caries risk through the Cariogram method and the assessment of the cariogenic potential of supragingival dental biofilm

Materials and methods: In the present study a total of 69 subjects were divided in three groups: THS smokers, cigarette smokers and non-smokers. Data regarding clinical characteristics were obtained through clinical examination, clinical and laboratory tests. Data regarding dietary, preventive and smoking habits were assessed through a questionnaire. The obtained data was used to assess caries risk through the Cariogram method. Samples of supragingival dental biofilm were collected, DNA was isolated and used for 16s rRNA gene hypervariable region amplicon sequencing through next generation sequencing. Bioinformatic analysis was used to determine the composition of bacterial species.

Results: Major differences were found in clinical characteristics regarding salivary levels of *S.mutans* ($p<0.001$) and *Lactobacillus spp.* ($p<0.001$), amount of biofilm accumulation ($p=0.034$), quantum of salivation ($p<0.001$) and saliva pH ($p=0.009$). Non-smokers had a higher risk of developing caries lesion due to dietary habits ($p<0.001$). Major differences were found in the composition of supragingival dental biofilm microbiomes of the examined groups on all taxonomic levels, and the most significant ones were found on the genus level *Actinobaculum* ($p=0.004$), *Avibacterium* ($p=0.015$), *Alysiella* ($p=0.016$), *Propionibacterium* ($p=0.025$) and *Haemophilus* ($p=0.030$).

Conclusion: THS and cigarette smoking are related to clinical characteristics that affect caries development. The compositions of supragingival dental biofilms of THS smoker, cigarette smokers and non-smokers are different, and due to an increased number of anaerobic bacteria with cariogenic properties, the cariogenic potential of biofilms of THS smokers and cigarette smokers could be considered as greater when compared to non-smokers.

Key words: Dental caries; Dental plaque; Microbiota; Smoking; Smoking devices

SADRŽAJ

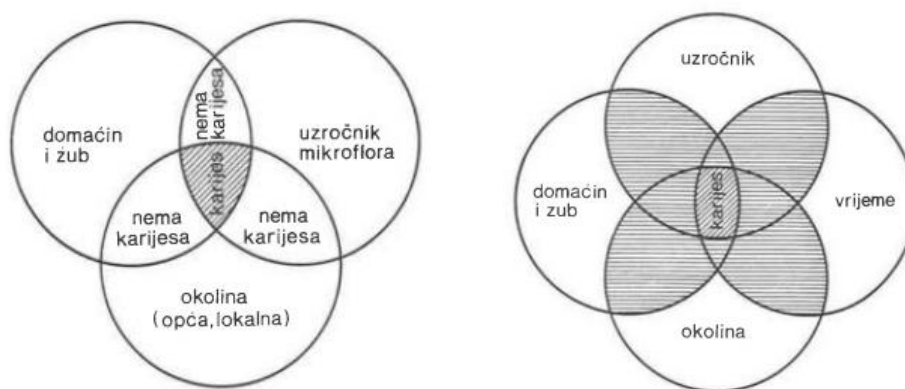
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Zubni karijes.....	1
1.2. Dentalni biofilm	5
1.2.1 Formiranje salivarne pelikule.....	7
1.2.2 Prianjanje primarnih (ranih kolonizatora)	7
1.2.3 Koadhezija i stvaranje mikrokolonija.....	7
1.2.4 Porast bakterijske raznolikosti - prianjanje kasnih kolonizatora.....	8
1.2.5 Vrhunac zrelosti bakterijske zajednice	8
1.3 Dentalni biofilm u zdravlju i bolesti.....	9
1.4 Povezanost pušenja i incidencije karijesnih lezija.....	12
1.5 Identifikacija bakterijskih vrsta u dentalnom biofilmu pomoću metagenomskih metoda	13
1.6 Obrada rezultata sekvenciranja – Bioinformatička i biostatistička analiza	21
1.7 Procjena rizika incidencije nastanka karijesa	23
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	27
3. ISPITANICI I METODE.....	28
3.1 Ispitanici.....	28
3.2 Kriteriji uključivanja/isključivanja ispitanika	29
3.3 Procjena intenziteta pušenja.....	30
3.4 Analiza mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma	30
3.5 Prikupljanje uzoraka supragingivnog dentalnog biofilma	30
3.6 Izolacija DNK iz uzoraka supragingivnog dentalnog biofilma	30
3.7 Izrada knjižnica	35
3.7.1 Amplifikacija hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena	35
3.7.2 Pooliranje amplikona svakog ispitanika i pročišćavanje PCR produkta	36
3.7.3 Analiza koncentracije i kvalitete pročišćenog PCR produkta	37
3.7.4 Priprema knjižnica	42
2.8 Priprema template-a i punjenje čipova za sekvenciranje.....	51
2.9 Sekvenciranje knjižnica metodom Next generation sequencing-a.....	53
2.10 Analiza rezultata sekvencioniranja	53
2.11 Karakteriziranje kariogenih bakterija	54

2.12. Kliničke karakteristike i procjena karijes rizika Cariogram metodom	55
Statistička obrada podataka	58
4. REZULTATI	59
4.1. Kliničke karakteristike pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača	59
4.2 Stupanj edukacije, program fluoridacije, prehrambene navike i prisutnost sustavnih bolesti	60
4.3 Navike pušenja.....	61
4.4 Kliničke karakteristike	62
4.5 Procjena rizika za razvoj karijesnih lezija Cariogram metodom	63
4.6 Analiza bakterijskog sastava mikrobioma	66
4.6.1 Analiza ASV sekvenci.....	66
4.6.2 Alfa raznolikost.....	67
4.6.3 Beta raznolikost	68
4.6.4 Bakterijska raznolikost na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji	69
4.6.5 Bakterijska raznolikost na razini roda	76
4.6.6 Bakterijska raznolikost na razini vrste	84
4.6.7 Kariogeni potencijal biofilma	91
5.RASPRAVA.....	100
4.1 Uzorak	100
4.2 Navike pušenja.....	100
4.3 Kliničke karakteristike	100
4.4 Procjena karijes rizika	102
4.5 Mikrobiom supragingivnog dentalnog biofilma	102
5. ZAKLJUČCI	107
6. LITERATURA	109
7. ILUSTRACIJE	132
7.1 Popis slika	132
7.2 Popis tablica	134
7.3 Popis shema.....	136
8. POPIS POKRATA	137
9. ŽIVOTOPIS	138

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Zubni karijes

Zubni karijes je najzastupljenija bolest među općom populacijom. Uzročnik zubnog karijesa su bakterije, stoga se radi o infektivnoj bolesti, ali ona nije prenosiva unutar populacije. Radi se o dinamičnom procesu u kojem bakterije prisutne u zubnom biofilmu, putem svojeg metabolizma i međusobnih interakcija uzrokuju demineralizaciju tvrdih zubnih tkiva te posljedično stvaranje kavitacija[1-3]. Osnovni model nastanka karijesne lezije dobro prikazuje model Keyesove trijade (slika 1.1a) koji u obzir uzima čimbenike uzročnika (bakterije), supstrata (ugljikohidrati) i domaćina (zub). Kasnije je dijagramu pridružen i čimbenik vremena (Slika 1.1b) budući da je za nastanak karijesne lezije potreban dulji period sniženog pH oralnog miljea što ukazuje na dinamičnu prirodu karijesa kao bolesti koja uključuje periode demineralizacije i remineralizacije tvrdih zubnih tkiva[4, 5].



Slika 1.1a (lijevo) i 1.1b (desno). Keyesov model nastanka zubnog karijesa (preuzeto iz [6])

Bolest će nastati u slučajevima kada periodi demineralizacije dominiraju nad periodima remineralizacije što će u konačnici rezultirati glavnim znakom bolesti, a to je prisutnost kavitacije. Demineralizacija tvrdih zubnih tkiva nastaje uslijed pada pH u bakterijskom biofilmu koji se nalazi na površini zuba zbog produkcije organskih kiselina koje su produkti bakterijskog metabolizma šećera. Padom pH ioni kalcija i fosfata bivaju uklonjeni iz kristalne rešetke kalcijevog hidroksil apatita čime tvrda zubna tkiva gube svoj strukturni integritet [7]. Proces demineralizacije bit će

zaustavljen kada se s površine zuba mehanički ukloni bakterijski biofilm te se razina pH vrati na neutralnu vrijednost uslijed puferskog djelovanja sline. Također, zasićenost sline ionima kalcija i fosfata omogućit će remineralizaciju tvrdih zubnih tkiva, odnosno regeneraciju kristalne rešetke kalcijevog hidroksil apatita. Regeneracija kristalne rešetke moguća je u slučajevima kada je njena struktura dovoljno očuvana, odnosno ako u periodu demineralizacije nije došlo do stvaranja kavitacije, što znači da je karijesna lezija u svojem inicijalnom stadiju (bijela mrlja, engl. *white spot lesion*) reverzibilne prirode i ne zahtijeva terapiju ispunom [1, 4].

Mehanizam nastanka karijesne lezije sugerira da su glavni uzročnici karijesa bakterije koje imaju sposobnost stvaranja kiselina, međutim nastanak bolesti može izostati i kada su specifične bakterije koje imaju spomenute karakteristike prisutne u bakterijskom biofilmu. U takvim slučajevima njihova brojnost i metabolička aktivnost nisu dovoljno izražene kako bi uzrokovale bolest [8]. Zbog toga je formirana teorija koja uzima u obzir i ulogu čimbenika okoline u dinamici razvoja bolesti. Takav model nastanka karijesne lezije, sugerira trenutačno prihvaćena ekološka hipoteza nastanka karijesa [4, 5, 9]. Spomenuti model temelji se na hipotezi da ne postoji specifični uzročnik zubnog karijesa već se radi o skupini mikroorganizama čija brojnost i metabolička aktivnost postaje značajno izraženija pri povećanom unosu šećera kroz prehranom što rezultira formiranjem dentalnog biofilma sniženih vrijednosti pH i posljedično razvojem bolesti. Zbog novih saznanja o mikrobiološkoj dinamici unutar dentalnog biofilma, odnosno potvrđene sposobnosti bakterija da se adaptiraju i preživljavaju u uvjetima sniženog pH, ekološka hipoteza je dodatno razrađena te je u posljednjih 15-ak godina poznata pod nazivom „proširena ekološka hipoteza nastanka karijesa“ [10].

Osim unosa šećera, mikrobiološka dinamika u dentalnom biofilmu pod utjecajem je i brojnih okolišnih čimbenika. Okolišni čimbenici, iako nemaju izravni utjecaj na nastanak karijesnih lezija, moduliraju osnovne čimbenike i tako pridonose razvoju ili prevenciji bolesti [3, 11, 12]. U okolišne čimbenike spadaju kontekstualni čimbenici, individualni čimbenici i biološki čimbenici [11].

Kontekstualni čimbenici odnose se na okolinu u kojoj se pojedinac nalazi, a tiču se stupnja ekonomskog razvoja geografskog područja/države, društvenih politika promoviranja zdravlja i prevencije nastanka bolesti te kulturnih i društvenih normi. Oni sami po sebi nisu čimbenici rizika za nastanak karijesa, ali igraju bitnu ulogu u moduliranju dinamike razvoja i progresije bolesti [13].

Individualni čimbenici povezani su sa sociodemografskim karakteristikama (dob, spol, društveni status, stupanj obrazovanja i ekonomski prihod) i navikama pojedinca (prehrambene, oralno higijenske, i preventivne) [11]. Socioekonomski čimbenici kao što su stupanj obrazovanja i ekonomski status imaju dokazan utjecaj na nastanak bolesti budući da je u osoba s većim stupnjem obrazovanja i većim novčanim prihodom zabilježena manja incidencija karijesnih lezija [14]. Čimbenik spola također ima dokazan utjecaj na dinamiku bolesti budući da je nekolicina studija potvrdila veću sklonost žena ka korištenju dentalnih zdravstvenih usluga nego u muškaraca [15, 16]. Incidencija karijesa ovisi i o dobi, budući da je dokazano povećana u djece, adolescenata i starijih [17, 18].

Navike pojedinca također pridonose dinamici razvoja/prevenciji nastanka bolesti. Prehrambeni čimbenici koji se tiču ne samo količine unesenog šećera, već i frekvencije konzumacije te konzistencije konzumirane hrane također pridonose stupnju incidencije karijesnih lezija [19].

Biološki čimbenici uzimaju u obzir prethodno karijes iskustvo, čimbenike sline, količinu nakupljanja biofilma i razvojne defekte tvrdih zubnih tkiva.

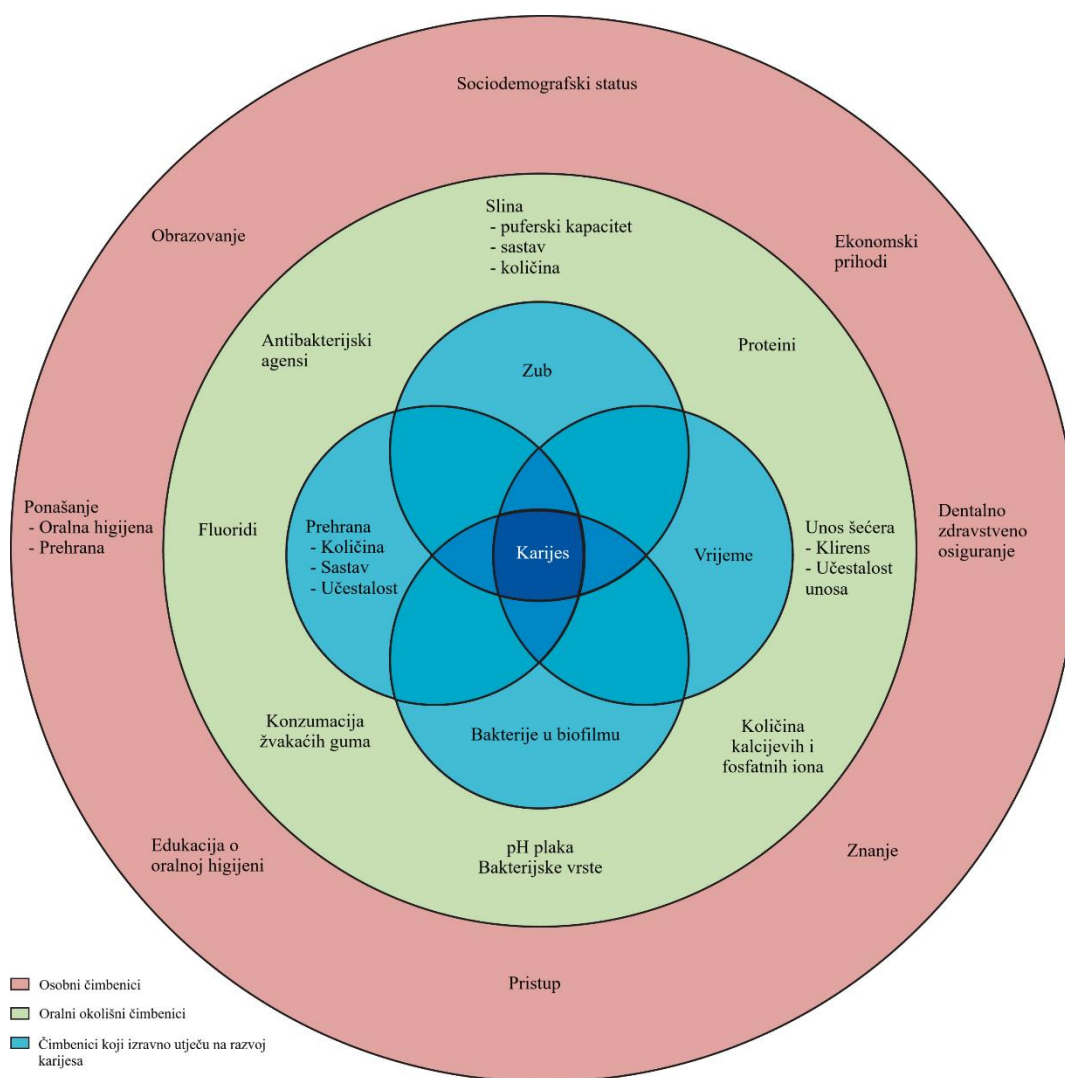
Prethodno iskustvo karijesom najčešće se procijenjuje KEP indeksom (Karijes – Ekstrakcija – Plomba) ili KEP indeksom po plohi zuba (engl. *Decayed-Missing-Filled Tooth* (DMFT), *Decayed-Missing-Filled Tooth surface* (DMFTs)). Veće vrijednosti KEP indeksa ukazuju na potencijalno veću incidenciju karijesnih lezija u budućnosti kod pojedinca [20].

Jedan od najvažnijih bioloških čimbenika u reguliranju karijesne aktivnosti je slina. Slina ima brojne protektivne uloge: 1) puferiranje i regulacija pH usne šupljine, 2) mehaničko ispiranje usne šupljine, 3) remineralizacija kiselinama oštećenih tvrdih zubnih tkiva i 4) stvaranje salivarne pelikule na površini zuba koja smanjuje kontakt površine zuba s kiselim produktima bakterijskog metabolizma. Zbog toga se hiposalivacija povezuje s visokim stupnjem incidencije karijesnih lezija [21, 22].

Povećan stupanj nakupljanja biofilma, odnosno nemogućnost njegovog uklanjanja zbog ortodontskih anomalija, morfologije zuba koja potiče zadržavanje plaka ili nedovoljne motoričke sposobnosti pojedinca se također ubrajaju u čimbenike koje utječu na incidenciju [23, 24].

Razvojni defekti tvrdih zubnih tkiva koji se mogu javljati u vidu aplazije ili hipomineralizacije također imaju bitan značaj u nastanku karijesa. Oslabljena struktura tvrdih zubnih tkiva pogodnija je za nastanak karijesnih lezija [25].

Osnovni i modulirajući čimbenici koji imaju ulogu u nastanku karijesnih lezija prikazani su na slici 1.2.

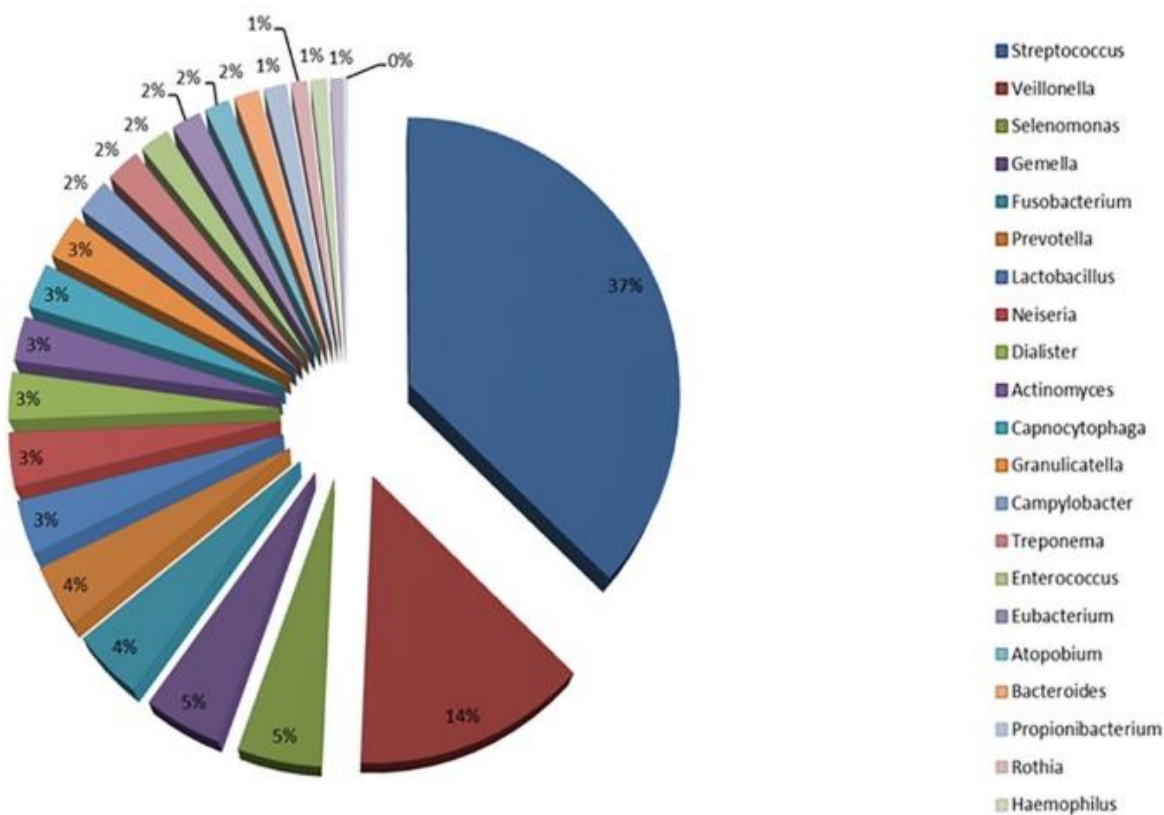


Slika 1.2. Čimbenici uključeni u nastanak karijesnih lezija (Preuzeto i prilagođeno iz [26])

1.2. Dentalni biofilm

Oralni mikrobiom sačinjavaju brojni mikroorganizmi među kojima su najbrojnije bakterije (oko 700 vrsta), ali u čiji sastav također ulaze i virusi, gljive, archeje i protozoe. Iako je sastav bakterijskih vrsta oralnog mikrobioma generalno poznat, postoji varijabilnost među općom populacijom budući da isti uvelike ovisi o brojnim čimbenicima kao što su: dob, prehrambene navike, genetski čimbenici, unos lijekova, geografski čimbenici i slično[27, 28].

Najraniji i najbrojniji kolonizatori usne šupljine jesu oralni streptokoki, ali u velikoj brojnosti mogu se pronaći i *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Actinomices spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Veillonella spp.*, *Prevotella spp.* i dr.[4, 27, 29-31]. Raspodjela najznačajnijih bakterijskih rodova zastupljenih u oralnom mikrobiomu prikazana je na slici 1.3.

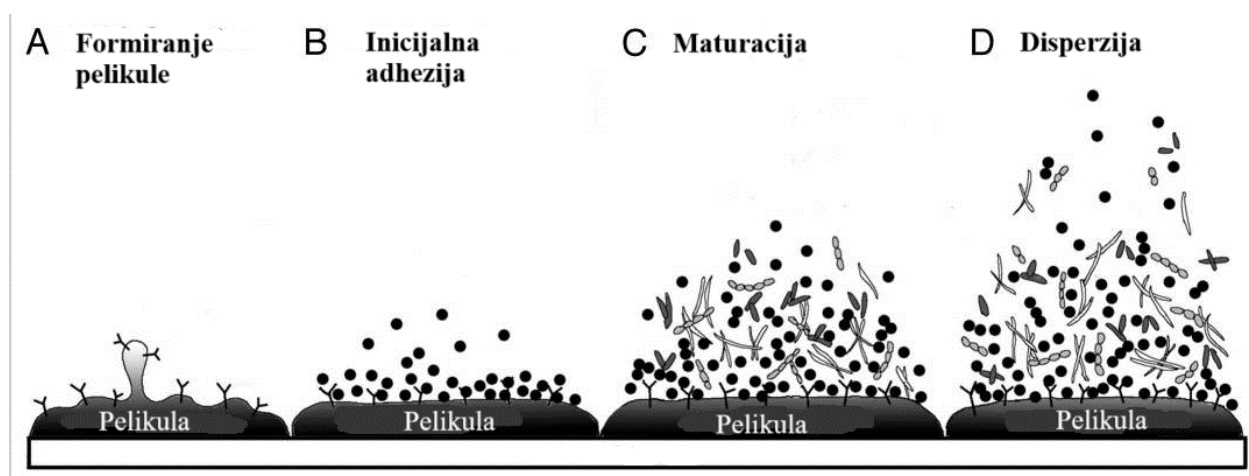


Slika 1.3. Zastupljenost bakterijskih rodova u oralnom mikrobiomu čovjeka Preuzeto iz [27]

Preduvjet za nastanak karijesne lezije jest prisutnost supragingivnog dentalnog biofilma (plaka) na površini tvrdih zubnih tkiva. Općenito, biofilmovi su strukturalno organizirane zajednice sačinjene od više bakterijskih vrsta okruženih ekstracelularnim matriksom. [30, 32]. Sposobnost formiranja biofilma u današnje vrijeme smatra se osnovnim mehanizmom bakterijske proliferacije i rasta, iako je mikrobna dinamika biofilma nedovoljno istražena. Razlog tome je što je većina istraživanja proteklih desetljeća bila fokusirana na bakterije u planktonskom obliku čija se fiziologija bitno razlikuje kada se nalaze u sastavu biofilma [24].

Formiranje dentalnog biofilma dinamičan je proces koji uključuje prijanjanje, rast, uklanjanje i ponovno prijanjanje bakterijskih vrsta na površine zuba. Sam proces odvija se u nekoliko stadija koji uključuju:

1. formiranje salivarne pelikule (do 20 minuta nakon uklanjanja postojećeg biofilma)
2. prijanjanje primarnih(ranih) kolonizatora (0-24 sata)
3. koadhezija i stvaranje mikrokolonija (4-24 sata)
4. porast bakterijske raznolikosti – prijanjanje kasnih (sekundarnih i tercijarnih) kolonizatora (1-7 dana)
5. vrhunac zrelosti bakterijske zajednice (7 i više dana)[4]



Slika 1.4. Stadiji formiranja dentalnog biofilma (preuzeto i prilagođeno iz [33])

1.2.1 Formiranje salivarne pelikule

Kako bi se bakterije zadržale u ustima potrebna im je sposobnost zadržavanja na tkivima usne šupljine. Sposobnost bakterija da adheriraju na površine osnovni je preduvjet za stvaranje biofilma, međutim bakterije ne mogu adherirati izravno na tvrda zubna tkiva već se povezuju preko acelularnog proteinskog sloja prisutnog na površini zuba koji sačinjava salivarnu pelikulu. Salivarna pelikula formira se na površini cakline unutar 20 minuta nakon četkanja, a sastoji se glavninom od glikoproteina, fosfoproteina, komponenata gingivalne sulkularne tekućine, ostataka staničnih stijenki bakterija i drugih bakterijskih produkata. Spomenute komponente adsorbiraju se na površinu zubne cakline te zbog toga dolazi do konformacijskih promjena u njihovoj strukturi čime se otvaraju receptori i proteinske skupine koje su potrebne za prijanjanje mikroorganizama [34]. Osim prijanjanja mikroorganizama i reguliranja stvaranja kariogenog biofilma onemogućavanjem izravne adherencije patogenih bakterija [35], salivarna pelikula ima ulogu i u reguliranju procesa demineralizacije i remineralizacije [36].

1.2.2 Prijanjanje primarnih (ranih kolonizatora)

Inicijalno, bakterijske stanice bivaju privučene prema zubnim površinama prekrivenim salivarnom pelikulom međumolekulskim van der Waalsovima. Sama adhezija na površinu zuba dogodit će se prilikom interakcije receptora prisutnih na molekulama salivarne pelikule i adhezina prisutnih na površini bakterijskih stanica [37]. Tako započinje stvaranje bakterijskog biofilma kolonizacijom bakterija koje nazivamo primarni ili rani kolonizatori. Primarne kolonizatore uglavnom čine pripadnici rodova *Streptococcus* i *Actinomyces*, a svojim prijanjanjem na salivarnu pelikulu imaju sposobnost moduliranja prisutnih receptora i tako omogućuju vezivanje drugih bakterijskih vrsta na površinu zuba [38].

1.2.3 Koadhezija i stvaranje mikrokolonija

Približno 8 sati nakon adheriranja prvih bakterija na salivarnu pelikulu dolazi do stvaranja mikrokolonija različite veličine i debljine na površinama tvrdih zubnih tkiva odnosno značajnog porasta brojnosti bakterija. Vrste koje koloniziraju površine zuba pripadaju uglavnom rodovima *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Haemophilus* i *Neisseria*. Njihove kolonije svojim rastom postepeno konfluiraju te na taj način stvaraju biofilm [38]. Bitno je napomenuti da *Streptococcus mutans*,

najznačajnija kariogena bakterija, ne sudjeluje u formiranju biofilma u ranim fazama iako *in vitro* pokazuje izrazitu sposobnost stvaranja biofilma velike debljine i gustoće [39]. U ovom stadiju počinje i stvaranje ekstracelularnog matriksa [40].

1.2.4 Porast bakterijske raznolikosti - prijanjanje kasnih kolonizatora

Sazrijevanjem biofilma dominantna populacija postaju bakterije iz roda *Actinomyces*, dok streptokoki postaju manje zastupljeni [4]. Prijanjanje i integraciju sekundarnih i tercijarnih kolonizatora omogućuje metabolička aktivnost primarnih kolonizatora. Primarni kolonizatori koji su uglavnom aerobi, svojim metabolizmom troše kisik u biofilmu, a stvaranjem ekstracelularnog matriksa blokiraju dotok kisika u biofilm. Na taj način stvaraju okolišne uvjete pogodne za naseljavanje anaeroba. Isto tako, produkti metabolizma primarnih kolonizatora mogu poslužiti kao receptori za adheriranje novih bakterijskih vrsta u strukturu biofilma [41]. Od sekundarnih kolonizatora posebno je važno spomenuti ulogu bakterije *Fusobacterium nucleatum* budući da pokazuje sposobnost koadherencije sa svim bakterijama iz skupine primarnih kolonizatora te se stoga smatra međupoveznim mikroorganizmom (engl. „*Bridging organism*“) između ranih i kasnih kolonizatora [42]. Postupnom adherencijom sve većeg broja bakterija u biofilm dolazi do strukturne organizacije bakterija u morfološke oblike koji se opisuju kao „niti kista“ ili „klipovi kukuruza“ (engl. „*Bristle brushes or corn cobs*“). Ekstracelularni matriks ima posebnu važnu ulogu pri stvaranju navedenih struktura jer služi kao poveznica te povećava stabilnost i čvrstoću građevne strukture biofilma [4].

1.2.5 Vrhunac zrelosti bakterijske zajednice

Sastav zrelog biofilma ovisit će uvelike o okolišnim čimbenicima koji ovise o brojnim kemijskim i biološkim čimbenicima kao što su dostupnost hranjivih tvari, koncentracija kisika i razina pH. Sastav zrelog biofilma je raznolik i uključuje širok spektar Gram+ i Gram- bakterija od kojih je većina anaerobna ili fakultativno anaerobna. Prostorna organizacija bakterija u biofilmu modulirana je uvjetima okoline i stoga se bakterije smještaju u dijelovima biofilma gdje prevladava za njih povoljan mikrookoliš. Primjerice, u dubljim slojevima biofilma pronaći će se više anaerobnih vrsta budući da u tim zonama nema pristupa kisiku [43]. Protok tvari u zreлом biofilmu znatno je otežan, budući da se sazrijevanjem biofilma povećava njegova gustoća i smanjuje

poroznost u strukturi koja omogućava protok tvari iz sline kao što su ioni, puferi i komponente imunološkog sustava [44].

1.3 Dentalni biofilm u zdravlju i bolesti

Organizacija bakterija u biofilmove omogućava bakterijama preživljenje u otežanim životnim uvjetima te dovodi do promjena u genskoj ekspresiji, metabolizmu i ponašanju bakterijskih vrsta [45]. Stoga, bakterijske zajednice u biofilmovima pokazuju niz svojstava koje nemaju u planktonskim oblicima (Tablica 1.1).

Tablica 1.1. Svojstva bakterijskih biofilmova

Generalno svojstvo	Primjer puta ostvarivanja
Otvorena građa strukture biofilma	Prisutnost poroznosti/kanala u strukturi
Zaštita bakterija od imunološkog sustava domaćina, isušivanja i sl.	Stvaranje ekstracelularnog matriksa – stvaranje fizičke barijere koja onemogućava prodiranje fagocita u strukturu biofilma
Povećana antimikrobna otpornost	Smanjena osjetljivost na klorheksidin i antibiotike, prijenos gena otpornosti, međusobna zaštita
Neutralizacija inhibirajućih čimbenika	Proizvodnja enzima katalaze radi zaštite osjetljivih vrsta od vodikovog peroksida
Razlike u genskoj ekspresiji	Povećana produkcija adhezina u fazama adheriranja mikroorganizama, regulacija aktivnosti glukozil transferaze u zrelih biofilmovima
Quorum sensing	Produkcija signalnih molekula na razini stanica-stanica
Prostorna i okolišna heterogenost	pH razina i koncentracija kisika nije ista u svim dijelovima biofilma, koadhezija između specifičnih bakterijskih vrsta
Proširenje habitata	Mogućnost naseljavanja obligatnih anaeroba, mogućnost preživljavanja vrsta osjetljivih na pad pH
Efikasniji metabolizam	Katabolizam kompleksnih molekula razvojem zajedničkih metaboličkih mreža
Povećan stupanj virulencije	Patogeni sinergizam prilikom stvaranja apscesa

*preuzeto i prilagođeno iz [4]

Primjerice, u ranim fazama stvaranja biofilma (bakterijska adhezija na površinu zuba) dolazi do povećane sinteze adhezina i njihove migracije na površinu bakterijske stanice, dok u kasnijim fazama (zreli biofilm) dolazi do povećane sinteze enzima koji sudjeluju u katabolizmu ugljikohidrata [39]. Bakterije u sklopu biofilma također pokazuju veći stupanj otpornosti na čimbenike imuniteta domaćina te veću otpornost na antiseptike i antibiotike. Iako točan mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, kao mogući uzroci smatraju se promjene u metabolizmu, zaštitna uloga ekstracelularnog matriksa, quorum sensing i veće antioksidativne mogućnosti [46-48]. Kompleksnost dentalnog biofilma najviše dolazi do izražaja preko niza bakterijskih interakcija u njegovoj strukturi koje predstavljaju jedan od ključnih čimbenika koji određuju sastav njegovog mikrobioma. Spektar bakterijskih interakcija izuzetno je širok: inhibiranje drugih vrsta proizvodnjom inhibirajućih molekula, omogućavanje kolonizacije drugih vrsta selektivnom koadhezijom, osiguravanje metaboličkih puteva i slično [33, 49-51]. Bakterijske zajednice u biofilmu mogu jedne drugima osigurati siguran izvor hrane, budući da produkti metabolizma nekih bakterija mogu poslužiti kao izvor energije za druge bakterije. Primjerice, laktati kao produkti metabolizma acidogenih bakterija kao što su pojedine vrste rodova *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Actynomices*, mogu poslužiti bakterijama iz rodova *Veillonella* i *Propionibacterium* u njihovom metabolizmu [52]. Osim navedenog, bakterije u biofilmu pokazuju i sposobnost engl. *quorum sensinga* (međusobne komunikacije) što im omogućava visok stupanj suradnje u raznim biološkim aktivnostima kao što su: formiranje biofilma, antimikrobna otpornost, horizontalni prijenos gena, dijeljenje čimbenika virulencije, povećana otpornost na uvjete sniženog pH i slično [53].

Značajan doprinos u svim svojstvima biofilma daje prisutnosti ekstracelularnog matriksa koji okružuje bakterije u biofilmu. Ekstracelularni matriks produkt je bakterija i sačinjen je od ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS). U EPS ubraja se niz molekula, ali uglavnom se radi o: ugljikohidratima, proteinima, nukleinskim kiselinama, polimerima staničnih stijenki bakterija, peptidoglikanima i mastima [40]. Spomenuti bakterijski produkti imaju brojne uloge u biofilmu: reguliraju propusnost i mogućnost difuzije molekula, omogućavaju prianjanje bakterijskih vrsta, određuju mehaničku stabilnost strukture i slično. Dodatno EPS omogućavaju stvaranje mikroniša i različite okolišne uvjete unutar osnovne strukture biofilma, što rezultira stvaranjem mikrobiološki različitih zona koje se mogu razlikovati u svom patogenom potencijalu [30, 40].

Patogeni potencijal biofilma određen je prisutnosti i interakcijom bakterijskih vrsta u svojem sastavu, odnosno svojom strukturom zajednice. Nedavna istraživanja temeljena na sekvenciranju DNK i fluorescentne *in-situ* hibridizacije daju uvid u bakterijski sastav biofilmova i potencijalni utjecaj okolišnih čimbenika na bakterijske zajednice u zdravlju i bolesti [28, 54-57].

U stanju zdravlja prisutnost biofilmova na površinama tkiva u ljudskom organizmu je poželjno budući da normalno prisutna bakterijska flora (komezali) onemogućava naseljavanje patoloških vrsta i pojavu bolesti. Dodatno, komezalna flora djeluje stimulativno na imunološki sustav te na taj način ima ulogu reguliranju upalnog odgovora u stanjima s i bez prisutnosti infekcije [54]. Iako opisan mehanizam ima zaštitnu ulogu za zdravlje, uključivanje određenih bakterijskih vrsta (patogene i oportunistički patogene bakterije) u strukturu dentalnog biofilma ili promjena okolišnih uvjeta unutar biofilma (promjene pH, koncentracija kisika, dostupnost određenih nutrijenata i sl.) mogu uzrokovati pojavu bolesti [30, 32].

Za nastanak zubnog karijesa ključan je povećan unos ugljikohidrata odnosno šećera. Povećana dostupnost šećera omogućit će nastanak dentalnog biofilma u kojem brojnije postaju oportunistički patogene (kariogene) bakterije [2].

Kariogene bakterije imaju svojstva acidogenosti, odnosno stvaranja kiselina (uglavnom laktata) koje su produkti metabolizma ugljikohidrata. Dodatno svojstvo koje posjeduju kariogene je aciduričnost odnosno sposobnost preživljavanja u uvjetima sniženog pH. Zbog pojačanog metabolizma kariogenih bakterija, stvara se biofilm sniženih vrijednosti pH koji pogoduje nastanku karijesnih lezija. U metabolizmu ugljikohidrata kariogenih bakterija ključni su enzimi glukozil transferaze koji omogućavaju stvaranje EPS kao što su glukani i fruktani. Spomenuti EPS imaju ključnu ulogu u održavanju niskog pH biofilma, inhibirajući aktivnost pufera prisutnih u slini te služe kariogenim bakterijama kao prehrambena rezerva [30, 54, 58].

Bakterija koja se najviše povezuje s karijesom je *Streptococcus mutans* i kao takva posjeduje sve osobine kariogene bakterije [39]. Međutim, dokazano je da karijes može nastati i bez prisutnosti *S. mutans* u dentalnom biofilmu što dokazuje da u nastanku karijesa sudjeluje više bakterija koje imaju kariogene osobine, pa su tako u biofilmovima koji uzrokuju povećanu karijesnu aktivnost često identificirane pojedine bakterije iz rodova *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. sobrinus* i *S. parasanguinus*), *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* (*L. acidophilus* i *L. fermentum*), *Scardovia*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Cryptobacterium*, *Megasphaera*, *Olsenella* i *Shuttleworthia* [58].

Također je bitno napomenuti da se s nastankom karijesnih lezija povezuju i bakterije koje ne posjeduju tipična kariogena svojstva, pa je stoga iz biofilmova koji se povezuju s nastankom karijesa moguće izolirati ne-acidurične sojeve bakterija iz rodova *Corynebacterium*, *Granulicatella* i *Propionibacterium* [59]. Navedeno ukazuje da uzročnici za nastanak karijesa nisu isključivo pojedine bakterijske vrste već se radi o skupini mikroorganizama čija zastupljenost i metabolička aktivnost u dentalnom biofilmu postaje veća uslijed djelovanja okolišnih čimbenika, poglavito povećanog unosa šećera. Stoga se glavnim uzročnikom incidencije karijesa smatra takozvani ekološki pomak (engl. *ecological shift*) u mikrobiomu dentalnog biofilma [60].

1.4 Povezanost pušenja i incidencije karijesnih lezija

Nastanak zubnog karijesa je dinamični proces primarno izazvan metaboličkom aktivnošću i interakcijama bakterija u dentalnom biofilmu, a moduliran je čimbenicima okoline. Pušenje, odnosno konzumacija duhanskih proizvoda jedno je od najviše istraživanih okolišnih čimbenika koji imaju utjecaj na nastanak karijesnih lezija. [61-68].

Axelsson i sur. uočili su značajno veću incidenciju karijesnih lezija kod pušača nego kod nepušača u istraživanju koje je provedeno na ispitanicima koji su bili podijeljeni u više dobni skupina [61]. Incidencija karijesnih lezija također je povezana s intenzitetom pušenja odnosno dnevnom količinom konzumiranih cigareta [62, 63]. Navedeno potvrđuju i rezultati meta analize koju su proveli Jiang i sur. u kojoj je 10 od 11 uključenih studija potvrdilo povezanost pušenja i incidencije zubnog karijesa [64]. Potencijalni uzrok tome jest utjecaj koji komponentne cigaretnog dima, posebice nikotin, imaju na proliferaciju i metabolizam bakterija u dentalnom biofilmu što je potvrdilo više *in vitro* studija [65-68]. Rezultati *in vitro* studije koju su proveli Huang i sur. ukazuju da nikotin, ovisno o svojoj koncentraciji, može imati inhibirajući ili stimulirajući učinak na proliferaciju i metaboličku aktivnost kariogene bakterije *S. mutans* [65]. Ista skupina istraživača je daljnjim istraživanjima potvrdila stimulirajući učinak nikotina na metabolizam *S. mutans*. Rezultati spomenute studije ukazuju da ekspozicija nikotinu potiče *S. mutans* na povećanu proizvodnju EPS-a i povećanu aktivnost enzima laktat dehidrogenaze *in vitro*. Dodatno, ekspozicija nikotinu, stimulira staničnu agregaciju bakterija i posljedično stvaranje biofilmova veće debljine [66]. Rezultate spomenutih studija također potvrđuje istraživanje provedeno na kliničkim uzorcima dobivenim ispiranjem (lavažom) usne šupljine pušača cigareta i nepušača.

Izolati *S. mutansa* iz uzoraka pušača pokazivali su značajno veći stupanj formiranja biofilma nego izolati nepušača pri određenim koncentracijama nikotina [68]. Slično istraživanje provedeno je i na električnim cigaretama (engl. *vaping*), u kojoj je uspoređivan njihov učinak s učinkom cigaretnog dima na rast, adheziju i sposobnost stvaranja biofilma *S. mutansa*. Rezultati ove studije potvrdili su da i aerosol električnih cigareta, kao i cigaretni dim, može imati stimulativni učinak na metabolizam i proliferaciju bakterija u dentalnom biofilmu [67].

Takve rezultate potvrđuju i nedavna istraživanja sastava mikrobioma dentalnog biofilma koja su otkrila postojanje razlike u mikrobiomima nepušača i ispitanika koji konzumiraju različite duhanske proizvode [69, 70].

Popularnost električnih cigareta značajno je porasla u posljednjih 10 godina. Sustavi za zagrijavanje duhana (engl. *Tobacco heating systems (THS)*) relativno su novi duhanski proizvodi koji su se prvi put pojavili na tržištu 2014. godine. Spomenuti proizvodi rade na principu zagrijavanja duhana, što naspram izgaranja, rezultira smanjenom emisijom tvari koje inače nalazimo u cigaretnom dimu. Zbog navedenog koncentracija katrana, ugljikovog monoksida i nikotina u aerosolu nastalom iz THS-a je značajno manja nego u cigaretnom dimu [71, 72]. Budući da prethodno spomenute studije ukazuju da koncentracija komponenti cigaretnog dima, posebice nikotina utječe na mikrobiološku aktivnost u dentalnom biofilmu, konzumacija sustava za zagrijavanje duhana potencijalno ima različit učinak na mikrobiološke aktivnosti i incidenciju karijesnih lezija nego pušenje cigareta [73].

1.5 Identifikacija bakterijskih vrsta u dentalnom biofilmu pomoću metagenomskih metoda

Okolišni čimbenici utječu na sastav dentalnog biofilma, i iako je utvrđeno da oralni mikrobiom sačinjava oko 700 bakterijskih vrsta, nove metode sekvenciranja bakterijskih genoma ukazuju da je stvarni broj bakterijskih vrsta koje možemo pronaći u usnoj šupljini značajno veći, a mikrobiom svakog pojedinca zbog izloženosti različitim okolišnim čimbenicima visoko individualan [32].

Zbog velike bakterijske raznolikosti prisutne u biofilmovima, metode identifikacije usmjerene na detekciju specifičnih bakterijskih vrsta (engl. *culture specific methods*) nisu pogodne za vjerodostojnu analizu sastava mikrobioma. Tehnologije sekvenciranja iduće generacije (engl. *Next*

generation sequencing (NGS)), omogućile su velik napredak u dijagnostici i pronašle su široku primjenu u genetskim, tumorskim i mikrobiološkim istraživanjima [74-76].

Od 60-ih godina prošlog stoljeća, istraživanja i napredak tehnologije omogućila su nastanak različitih generacija tehnologija sekvenciranja. U prvu generaciju ubrajamo metode koje su redom razvijali Robert Holley, zatim Walter Gilbert i Allan Maxam te naposljetku najznačajnija metoda Fredericka Sanger. Ova tehnika je omogućila brzo sekvenciranje fragmenata DNK i RNK dugačkih do nekoliko stotina nukleotida [77, 78].

Ranih 2000-ih godina pojavile su se tehnologije sekvenciranja druge odnosno iduće generacije. Ove metode pronašle su široku primjenu budući da omogućavaju paralelno sekvenciranje velikog broja fragmenata DNK što prethodna generacija tehnologija nije mogla. Tehnologije koje spadaju u ovu generaciju su: Roche 454-pyrosequencing, Illumina, Ion Torrent i SOLiD [76, 79].

Od 2010. godine pojavljuju se u uporabi tehnologije sekvenciranja treće generacije, ali njihovo korištenje u istraživanjima još uvijek nije u širokoj primjeni. Iako je teško odrediti graničnu razliku između druge i treće generacije, neki autori smatraju da je glavna razlika u tome što tehnologije treće generacije omogućavaju sekvenciranje iz jedne molekule [80]. Zbog toga je postupak sekvenciranja značajno ubrzan budući da koraci amplifikacije u ovim tehnologijama nisu potrebni te su očitane sekvence znatno veće duljine. Trenutačni predstavnici su PacBio i Oxford nanopore. [76, 81].

Prikaz tehnologija sekvenciranja nalazi se u tablici 1.2.

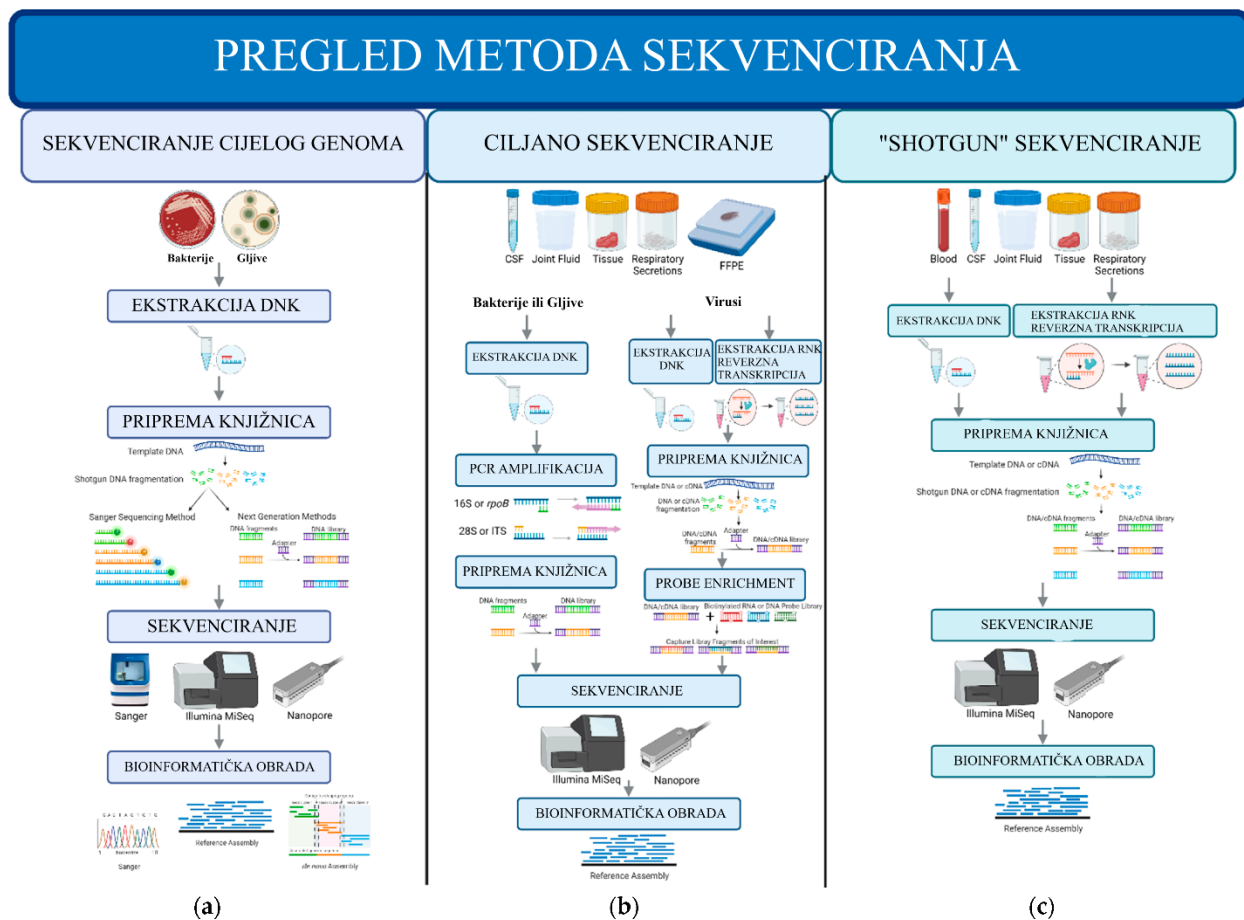
Tablica 1.2. Tehnologije sekvenciranja po generacijama

	Metoda	Tehnologija	Kompleksnost (Umjerena ili Visoka)	Uporaba za sekvenciranje u odnosu na kliničku mikrobiologiju	Reference
Prva generacija	Maxam-Gilbert	Kemijsko cijepanje radioaktivno označene DNK na određenim bazama	Umjerena	/	[82]
	Sanger	Terminacija lanca na određenim bazama pomoću dideoxinukleotida	Umjerena	16S i 28S identifikacija Sekvenciranje cijelog genoma	[78, 83-88]
Druga generacija	Pyrosequencing	Mjerenje sinteze pirofosfata pomoću luminescencije	Visoka	Sekvenciranje cijelog genoma	[89-93]
	SOLid	Mjerenje DNK ligacije oligonukleotida	Visoka	Sekvenciranje cijelog genoma	[94, 95]
	Ion Torrent	Mjerenje promjene pH koja nastaje zbog otpuštanja protona tijekom polimerizacije DNK	Visoka	Sekvenciranje cijelog genoma	[96]
	Illumina	Metoda „Bridge amplification“	Visoka	Sekvenciranje cijelog genoma Deep amplicon sekvenciranje Shotgun sekvenciranje	[97-99]

Treća generacija	PacBio	Single-molecule rezolucija koristeći zero- mode wavelenght(ZMW) nanostruktura	Visoka	Sekvenciranje cijelog genoma	[100]
	Nanopore	Single-molecule rezolucija koristeći biološke nanopore i nanopore krutog stanja	Visoka	Sekvenciranje cijelog genoma Deep amplicon sekvenciranje Shotgun sekvenciranje	[101, 102]

*Preuzeto i prilagođeno iz [79]

Tehnologije sekvencioniranja iduće generacije pronašle su široku primjenu u kliničkom radu i mikrobiološkim istraživanjima u svrhu identifikacije bakterijskih vrsta. U radu se najčešće koriste na 3 različita načina: 1. sekvenciranje cijelog bakterijskog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing (WGS)*), 2. ciljano metagenomičko sekvenciranje i 3. shotgun metagenomičko sekvenciranje [79]. Glavne prednosti ovih metoda jesu brzina provođenja, jednostavnost analize podataka i relativno niža cijena izvedbe naspram drugih metoda [81].



Slika 1.5. Mogućnosti primjene i protokoli rada s tehnologijama sekvencioniranja – preuzeto i prilagođeno iz [79]

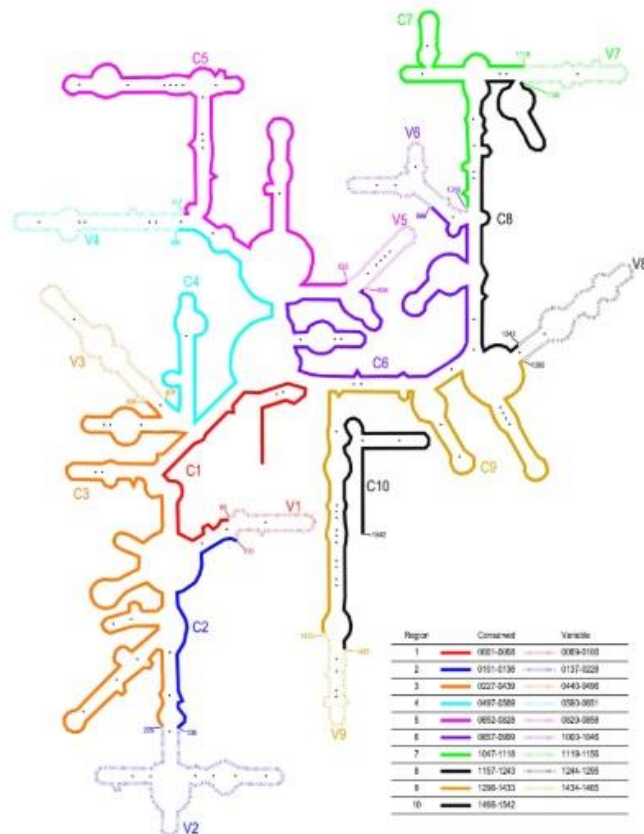
Sekvenciranje cijelog genoma u mikrobiologiji jest postupak u kojem se čitav genom mikroorganizma fragmentira. Fragmenti se zatim sekvenciraju i dobivene sekvence se spajaju. Glavna mana ove metode je što zahtijeva uzgoj kulture i izolacije bakterijske stanice čiji se genom želi sekvencirati. Prednosti ove metode uključuju mogućnost točne identifikacije i tipizacije

mikroorganizama u epidemiološke svrhe, te utvrđivanje potencijalne rezistencije na antimikrobne lijekove. U ovoj metodi najčešće se koriste tehnologije druge ili treće generacije [103, 104].

U metodama izravnog sekvencioniranja iz uzoraka glavna je prednost što za izvođenje nije prethodno potrebno uzgojiti kulturu i izolirati stanice. U ove metode ubrajaju se ciljano metagenomsko sekvenciranje i shotgun sekvenciranje. Ciljano metagenomsko sekvenciranje podrazumijeva amplifikaciju određenih dijelova DNK koji pripadaju skupini mikroorganizama ili jednom mikroorganizmu uz prethodnu izolaciju DNK izravno iz kliničkog uzorka. Glavna prednost ovih metoda je što umanjuju ometanje uzrokovano humanom DNK kod metagenomske analize uzoraka s velikim udjelom humanih stanica [105]. Shotgun sekvenciranje podrazumijeva sekvenciranje čitave DNK prisutne u prikupljenim uzorcima. Zbog toga je moguće identificirati gotovo sve mikroorganizme u uzorku, ali je zato velika mogućnost ometanja zbog prisutnosti humane DNK u kliničkim uzorcima. U ovim metodama primjenjuju se tehnologije druge i treće generacije [79, 106].

Od spomenuta 3 načina primjene, ciljano metagenomsko sekvenciranje pronašlo je široku primjenu u znanstvenim istraživanjima, te se u novije vrijeme koristi i u kliničkoj dijagnostici. Najbolji primjer toga jest sekvenciranje 16S rRNK gena uz prethodnu PCR amplifikaciju njegovih hipervarijabilnih regija. Sekvenciranje 16S rRNK gena omogućuje identifikaciju velikog broja bakterijskih vrsta, a dodatna prednost ove metode jest što omogućuje identifikiranje bakterijskih vrsta čije je kulture teško uzgojiti budući da za provedbu metodologije nisu potrebne žive bakterijske stanice [79, 81].

16S rRNK gen je najviše korištena makromolekula u filogenetskim i taksonomskim istraživanjima. Radi se o genu prosječne duljine oko 1500 parova baza, a unutar njegove strukture može se pronaći 10 konzerviranih regija (engl. *Conserved regions*) čije su sekvence poznate i konstantne te se koriste za dizajniranje amplifikacijskih primera, i 9 varijabilnih regija (engl. *Variable regions*) čijim se sekvenciranjem mogu identificirati pripadajuće bakterijske vrste u filogenetskim i taksonomskim istraživanjima. Struktura 16S rRNK gena prikazana je na slici 1.6 [81].

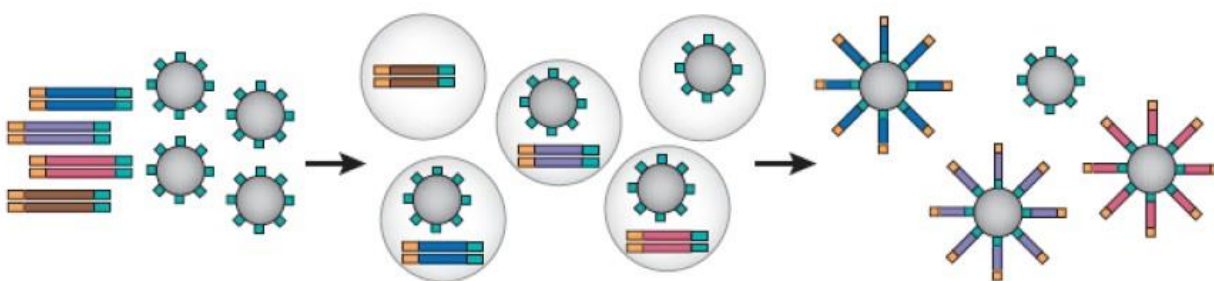


Slika 1.6. Struktura 16S rRNK gena (preuzeto iz [81])

Razlog zbog kojeg je 16S rRNK gen najkorištenija molekula u filogenetskim i taksonomskim istraživanjima je činjenica da je prisutan u genomu svih bakterija i arheja te pokazuje relativnu stabilnost u svim svojim regijama. Dodatni razlozi su lakoća kojom se gen može sekvencirati što omogućava stvaranje i proširivanje dostupnih baza podataka poznatih sekvenci te njegova pogodnost za bioinformatičku analizu zbog relativno velike duljine sekvence. Iako uporaba ovog gena u identificiranju bakterijskih vrsta ima velike prednosti, glavni nedostatak ove metode je u intragenomskoj redundantnosti gena budući da većina bakterija ima više od jednog 16S rRNK gena što nakon sekvenciranja može stvoriti greške u identifikaciji bakterijskih vrsta. Takve greške nastaju kada se sekvencira više gena koje pripadaju jednoj bakterijskoj vrsti, ali se pripadnost dobivenih sekvenci dodjeljuje većem broju bakterijskih vrsta, iako su razvijeni bioinformatički alati za korekciju i minimaliziranje takvih grešaka [107]. Dodatni nedostatak ove metode je što određene varijabilne zone pokazuju različite stupnjeve heterogenosti svojih sekvenci što znači da za preciznu identifikaciju bakterijske vrste potrebno je analizirati veći broj varijabilnih regija gena. Posljedica toga jest porast kompleksnosti metodologije što znači da je potreban veći broj primera

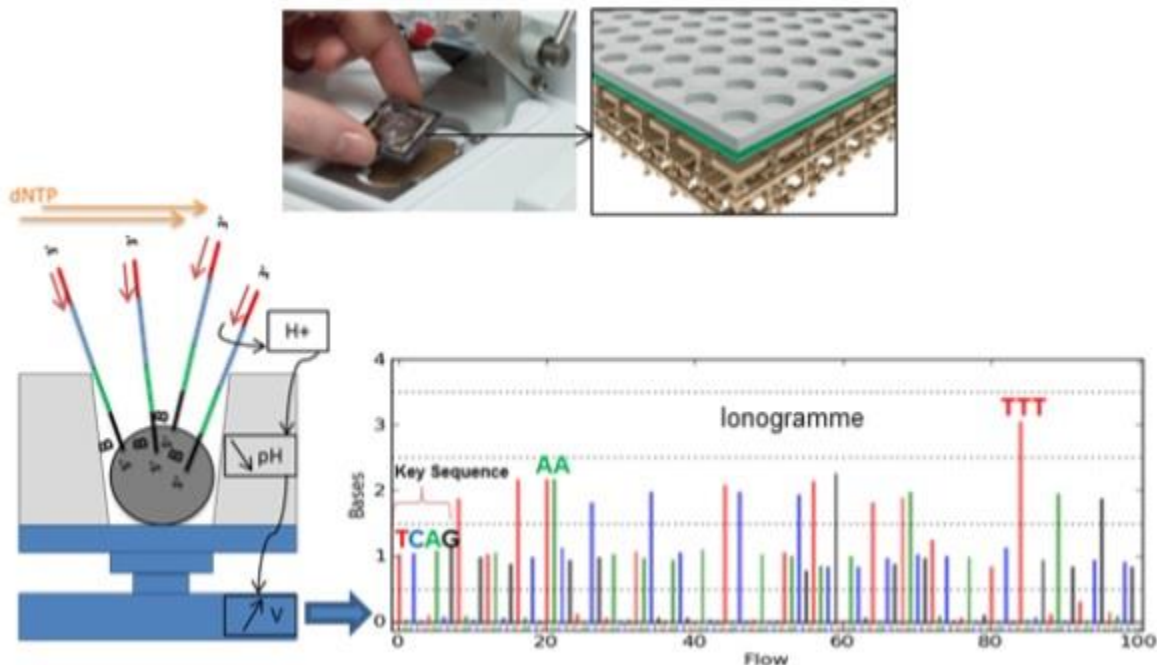
za amplifikaciju različitih varijabilnih regija budući da univerzalni amplifikacijski primer ne postoji [108, 109].

U istraživanju koje je tema ovog rada učinjeno je ciljano metagenomsko sekvenciranje hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena pomoću je Ion Torrent tehnologija sekvencioniranja iduće generacije. Ion Torrent tehnologija bazirana je na tehnologiji semikonduktorskih čipova odnosno promjeni pH prilikom vezivanja nukleotida u postupku sekvencioniranja. Ion Torrent tehnologija sekvencioniranja iduće generacije podrazumijeva kreiranje DNK template-a pomoću reakcije emulzijskog PCR-a pri čemu se koriste Ion Sphere Particles (ISP) kuglice.(slika 1.7)



Slika 1.7. Emulzijski PCR i ISP kuglice – preuzeto i prilagođeno iz[110]

ISP kuglice na svojoj površini sadrže univerzalne primere na koje se mogu vezati adapteri dodani na pripremljene amplikone u postupku pripreme knjižnica. Cilj emulzijskog PCR-a jest stvoriti monoklonalne ISP kuglice na kojima je vezano dovoljno kopija jednog amplikona iz pojedine knjižnice (uzorka). Kako bi se to postiglo, u reakciji emulzijskog PCR-a se koristi silikonsko ulje koje ima funkciju razdvajanja amplikona prilikom vezivanja na ISP kuglice. Stvaranje monoklonalnih ISP kuglica temelji se na principu da se jedan barkodirani amplikon iz pojedine knjižnice veže na jednu ISP kuglicu koja se nalazi u kapljici ulja sa svim komponentama potrebnim za uobičajenu reakciju PCR- a. Za emulzijskim PCR-om slijedi obogaćivanje ISP-ova (engl. *enrichment*). Cilj postupka obogaćivanja je isprati prazne ISP-ove bez vezanih amplikona, a zatim odvojiti komplementarni lanac amplikona koji su vezani na ISP-u, tako da ga možemo koristiti kao predložak (engl. *Template*) za sekvenciranje. Tako pripremljene monoklonalne ISP kuglice kada se napune na semikonduktorski čip dati će dovoljno jak signal u reakcijama sekvencioniranja (Slika 1.8).



Slika 1.8. Ion Torrent chip i reakcije sekvenciranja – preuzeto i prilagođeno s <https://www.biorigami.com/?p=4643> (Pristupljeno 3.1.2025.)

Semikonduktorski čipovi sadrže milijune jažica, a u svaku jažicu sjeda po jedna ISP kuglica. Čip se tijekom sekvenciranja prelijeva otopinom jednog od nukleotida A,T,C ili G te se promjena pH detektira kao taj nukleotid u pojedinačnoj jažici i pretvara u digitalni signal A,T,C ili G. [111-114].

1.6 Obrada rezultata sekvenciranja – Bioinformatička i biostatistička analiza

Rezultat dovršenog sekvenciranja su datoteke koje sadržavaju milijune detektiranih sekvenci nukleotida koje se nazivaju engl. *base-calls*. Svakom base call-u također je dodijeljen i takozvani engl. *Phred score* odnosno ocjena kvalitete (engl. *Quality or Q score*) koji ukazuje na vjerojatnost netočnosti svakog base call-a i prema kojem se određuje hoće li se određeni base call uključivati u postupak analize [81].

Zbog porasta popularnosti metode sekvenciranja 16S rRNA gena koja daje iznimno veliku količinu rezultata, bioinformatika se razvila u disciplinu koja konceptualizira biologiju kroz analizu makromolekula uz primjenu informatičkih alata. U tu svrhu stvoren je niz bioinformatičkih alata (engl. *bioinformatic pipelines*) koji se sastoje od sljedova bioinformatičkih algoritama koji

omogućavaju pročišćavanje, kontrolu kvalitete, kvantifikaciju, obradu i interpretaciju podataka dobivenih sekvenciranjem. Najpopularniji alati koji su danas u upotrebi su mothur, USEARCH, dada2 i Quantitative insights into microbial communities 2 (QIIME2) [115-118]. Svi spomenuti alati funkcioniraju na principu organizacije pročišćenih sekvenci u takozvane engl. *Operational Taxonomic Units* (OTU) ili engl. *Amplicon Sequence Variant* (ASV). OTU grupiranje (engl. clustering) je postupak u kojem se pročišćene sekvence ujedinjuju prema međusobnoj sličnosti slijeda nukleotida. Preporučena razina podudarnosti sekvenci za grupiranje u jedan OTU iznosi između 97% i 99% [119]. Međutim, to može rezultirati grupiranjem sekvenci koje ne pripadaju istom mikroorganizmu u istu skupinu što će rezultirati pogrešnom interpretacijom prilikom taksonomske karakterizacije [120]. Iz tog razloga, sve popularniji postaju alati koji imaju mogućnost razlikovanja sekvenci na razini jednog nukleotida i karakteriziranja pročišćenih sekvenci kao ASV-ove [121]. Neovisno o tome koja se metoda koristi, za karakteriziranje bakterija i njihovih taksonomskih razina potrebna je usporedba detektiranih sekvenci s podacima iz referentnih baza podataka kao što su RDP database, Greengenes i SILVA. Ove podatkovne baze sadrže poznate OTU/ASV sekvence i podatke o njihovoj pripadnosti pojedinim bakterijskim vrstama prema određenim taksonomskim razinama [122-124], a za usporedbu detektiranih sekvenci s njima koriste se alati kao što je BLAST [125].

Nakon taksonomske karakterizacije mikroorganizam slijedi biostatistička analiza podataka u sklopu koje se često koriste i takozvani metapodaci (engl. *metadata*) koji govore o okolišnim uvjetima, vrsti uzoraka, kliničkim parametrima, dobi, spolu, stanjima zdravlja i bolesti i slično. Ovi podaci su bitni radi uklanjanja utjecaja potencijalnih zbunjujućih čimbenika (engl. *confounding factors*) iz istraživanja [126, 127].

Normalizacija podataka bitan je korak prije provedbe testova biostatističke analize zbog prirode dobivenih podataka nakon taksonomske karakterizacije. Budući da se ukupan broj detektiranih sekvenci po uzorcima može jako razlikovati, podaci o detektiranim sekvencama najčešće se preoblikuju u obliku udjela od ukupnog broja detektiranih sekvenci po uzorku [128].

Biostatističkim metodama procijenjuje se raznolikost (engl. *Diversity*), a provodi se kvantitativno i kvalitativno. Najčešće metode procjene bakterijske raznolikosti jesu Alfa raznolikost i Beta raznolikost [81].

Alfa raznolikost opisuje mikrobnu raznolikost unutar pojedinog uzorka. Pokazatelji alfa raznolikosti su engl. *sample richness* koji govori o broju detektiranih vrsta unutar jednog uzorka i engl. *sample evenness* koji govori o zastupljenosti pojedine vrste unutar jednog uzorka. Alfa raznolikost izražava se kroz mjere kao što su Observed taxa, Chao1 indeks, ACE indeks, Shannon indeks, Fisher indeks i Simpson indeks [129].

Beta raznolikost opisuje sličnosti i razlike bakterijskih populacija to jest njihovu raznolikost između više različitih uzoraka. Za procjenu beta raznolikosti koriste se mjere kao što su Bray-Curtis indeks različitosti (engl. *Bray-Curtis dissimilarity index*), Jaccard udaljenost (engl. *Jaccard distance*) i Unifrac udaljenosti (engl. *Unifrac distances*) [130, 132, 133].

1.7 Procjena rizika incidencije nastanka karijesa

Jedan od ključnih koraka u planiranju terapijskih i preventivnih postupaka u pacijenata trebala bi biti procjena karijes aktivnosti pacijenata, odnosno procjena rizika za nastanak karijesa [131]. Kao najbolji prediktor nastanka karijesnih lezija pokazalo se prethodno karijes iskustvo pojedinca koje se procijenjuje kliničkim indeksima kao što su KEP ili KEP indeks po plohi zuba. Bitno je napomenuti da takve procjene karijesne aktivnosti nisu pouzdane budući da postoji nekoliko sustava za identifikaciju i klasifikaciju karijesnih lezija, kao što su skala Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation (WHO)*) i ICDAS sustav (engl. *International Caries Detection and Assessment System*). Spomenuti sustavi se razlikuju prema definiranju lezije kao „karijes“ u različitom stupnju progresije bolesti što može dovesti do različitih procjena karijesne aktivnosti u pojedinca ovisno o sustavu koji se koristi pri dijagnosticiranju karijesa [132, 133].

Zbog dinamične prirode i multifaktorijalne etiologije zubnog karijesa kao bolesti, ovakve procjene trebaju uzimati u obzir niz protektivnih čimbenika i čimbenika rizika. U čimbenike rizika, osim prethodnog karijes iskustva, spadaju: salivarne razine *S. mutans*, pH plaka, prisutnost ortodontskih anomalija, defekti tvrdih zubnih tkiva, odsutnost preventivnih i loše prehrambene navike, sustavne bolesti i slično, dok u protektivne čimbenike ubrajamo: slinu (količinu, konzistenciju, puferski učinak i čimbenike imuniteta.), unos fluorida, dobre preventivne i prehrambene navike i slično. Budući da spomenuti čimbenici nisu uvijek podjednako izraženi, stupanj rizičnosti za nastanak karijesnih lezija se mijenja kroz život [134, 135].

Nekolicina alata koji uzimaju u obzir više čimbenika rizika za nastanak karijesa već postoje u kliničkoj uporabi, a njihova primjena zahtijeva prikupljanje podataka o rizičnim i protektivnim čimbenicima kroz anamnezu i klinički pregled. Ovakvi alati/metode, s obzirom na način na koji procesuiraju prikupljene podatke mogu biti bazirani na temelju obrasca ili računalnih algoritama. Pregled dostupnih alata prikaz je u tablici 1.3 [134].

Tablica 1.3. Multifaktorijalni alati za procjenu karijes rizika

	Alat/Metoda	Osobitosti	Referenca
Alati u obliku obrazaca	American Academy of Pediatric Dentistry's Caries Risk Assessment Tool (AAPD-CAT)	2 tipa obrazaca: za djecu od 0-5 i 6+godina - Procjena karijes rizika na temelju niza protektivnih i rizičnih čimbenika - Procijenjuju se socijalni, opće zdravstveni i dentalni čimbenici te rizičnost navika	[136]
	American Dental Association's Caries Risk Assessment Tool (ADA-CAT)	2 tipa obrasca: za djecu od 0-6 i 6+ godina - Procijenjuju se navike pacijenta, opće zdravstveni i dentalni čimbenici	[137]
	Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA)	- Procjena i usporedba protektivnih i rizičnih čimbenika - Potrebna dozvola za komercijalnu uporabu	[138]
	International Caries Classification and Management System (ICCMS™) i CariesCare International (CCI) System	Podrazumijeva primjenu protokola u 4 koraka: procjena karijes rizika, detektiranje karijesnih lezija, planiranje terapije i provedba terapije	[139]
Alati bazirani na računalnim algoritmima	Cariogram	Procjena niza rizičnih i protektivnih čimbenika uspoređujući karakteristike pacijenta sa skalama za procjenu stupnja rizika	[140-142]

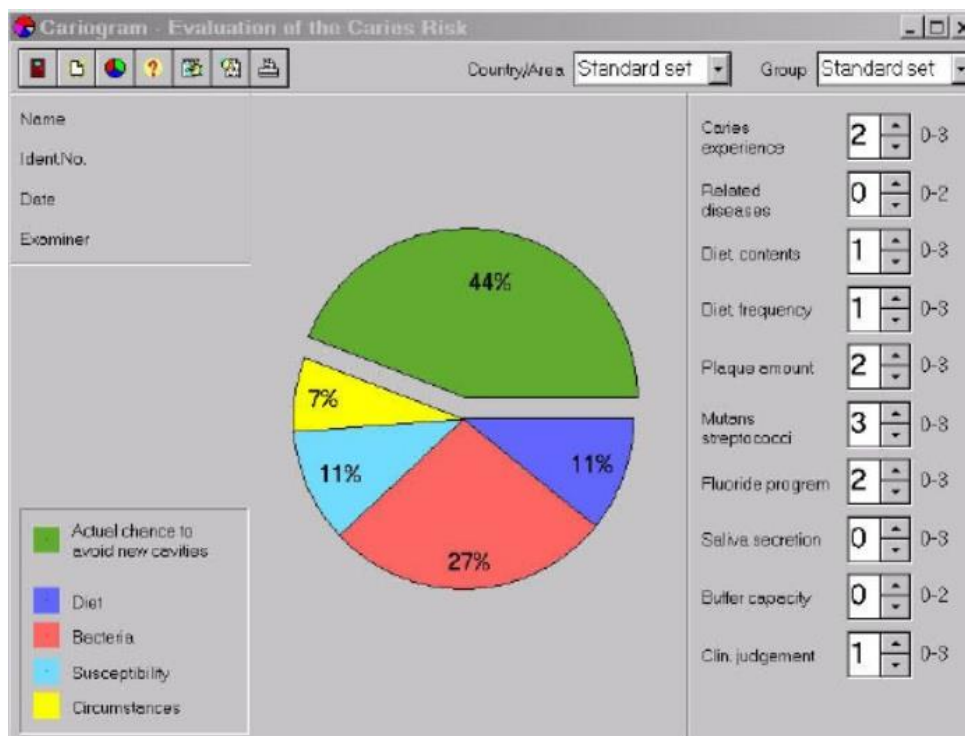
		• Dostupne korektivne postavke procjene rizika (rizičnost populacije i rizičnost geografskog područja prebivanja) • Grafički prikaz rezultata koji definira i potencijalni uzrok nastanka karijesa	
	MySmileBuddy	• Procjenu karijes rizika provodi sam pacijent • Ne koristi kliničke podatke • Procjena protektivnosti/rizičnosti pacijentovih navika • Sugerira načine kako smanjiti stupanj rizika	[143]
	PreViser Risk Assessment Tool	• Alat dizajniran za planiranje terapijskih postupaka prema procjeni karijes rizika	[144]
	National University of Singapore Caries Risk Assessment Tool (NUS-CRAT)	• Analiza karijes rizika kategorizira pacijenta u jednu od pet rizičnih skupina	[145]

Bitno je napomenuti da procjene preciznosti, osjetljivosti i specifičnosti ovih alata jako variraju zbog različitog načina primjene metodologije, interpretiranja rezultata i zbog činjenice da se ovim metodama rade dugoročna predviđanja, a bazirani su na podacima koji su dobiveni u datom trenutku. Neovisno o tome uporaba ovih metoda i alata za procjenu karijes rizika može uvelike pridonijeti uspješnosti kliničkog rada [134].

Najraširenija metoda za procjenu karijes rizika je Cariogram metoda. Cariogram je računalna aplikacija koja omogućava identifikaciju i kvantifikaciju čimbenika rizika za nastanak karijesa te na temelju unesenih podataka generira numerički i grafički prikaz šansi za nastanak ili izbjegavanje nastanka novih karijesnih lezija. Čimbenici koje Cariogram metoda uključuje u procjenu karijes

rizika su prethodno karijes iskustvo, pridružene bolesti, sadržaj prehrane, broj obroka u danu (uključeni međuobroci), stupanj nakupljanja dentalnog biofilma, prisutnost kariogenih bakterija u slini, pacijentov program fluoridacije, količina sline, puferski kapacitet sline i subjektivna klinička prosudba terapeuta. Dodatno, u aplikaciji je moguće podesiti stupnjeve rizika za populaciju i zemlju (geografsku zonu) boravka. Obje stavke moguće je podesiti na niski, standardni ili visoki stupanj rizika [142, 146].

Kako bi računalna aplikacija mogla generirati procjenu karijes rizika potrebno je unijeti vrijednost za sedam od deset traženih čimbenika. Rezultati analize prikazuju se u vidu šansi za izbjegavanje nastanka novih karijesnih lezija i šansi za nastanak novih karijesnih lezija zbog okolnosti, bakterija, podložnosti organizma i prehrane. Rezultati se prikazuju numerički, u vidu postotaka, i grafički u obliku tortnog dijagrama. Primjer rezultata vidljiv je na slici 1.9 [141, 142].



Slika 1.9. Cariogram analiza karijes rizika

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi:

1. Utvrditi i usporediti sastav bakterijskih mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilмова pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača
2. Procijeniti i usporediti rizičnost za razvoj karijesnih lezija pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača Cariogram metodom

Specifični ciljevi:

1. Procijeniti kariogeni potencijal supragingivnih dentalnih biofilмова pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača utvrđivanjem prisutnosti kariogenih bakterijskih vrsta i bakterijskih vrsta koje se povezuju sa stanjem odsutnosti karijesa
2. Istražiti povezanost prisutnosti kariogenih bakterija u biofilmu s kliničkim parametrima

Hipoteze

1. Sastavi bakterijskih mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilмова pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača će se razlikovati
2. Izgled za razvoj i izbjegavanje nastanka karijesnih lezija procijenjen Cariogram metodom razlikovat će se između skupina pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Ispitanici

Istraživanje je provedeno prema modelu presječne studije u kojoj je sudjelovalo 69 ispitanika. Ispitanici su prikupljeni među pacijentima Kliničkog bolničkog centra Rijeka koji su bili upućeni na Kliniku za dentalnu medicinu radi specijalističkog mišljenja i/ili terapije od strane primarnih doktora dentalne medicine u periodu između siječnja i prosinca 2023. godine. Ispitanici su bili podijeljeni u 3 skupine: pušače THS-a, pušače cigareta i nepušače, te je svaku skupinu sačinjavalo po 23 ispitanika. Sve skupine bile su usklađene po dobi i spolu ispitanika. Budući da je među istraživanom populacijom bilo najteže pronaći pušače THS-a ta je skupina prva oformljena te su ostale dvije oformljene prema ispitanicima koji su je sačinjavali.

Veličina uzorka izračunata je pomoću online alata za izračun veličine uzorka: Ristrl, R. Sample Size Calculator Version 1.061. Dostupno online: <https://homepage.univie.ac.at/robin.ristl/samplesize.php> (Pristupljeno 1. veljače 2022. godine). Izračun je proveden prema rezultatima pilot studije istog dizajna provedene na 30 ispitanika (10 pušača 10 THS-a, 10 pušača cigareta i 10 nepušača) čiji rezultati nisu objavljeni. Veličina uzorka je izračunata pomoću ANOVA-e koristeći vrijednosti aritmetičke sredine i standardne devijacije za KEP indeks uz snagu testa od 80% i razinu značajnosti od 0.05. Vrijednosti aritmetičke sredine i standardne devijacije u ispitivanim skupinama pilot studije prikazane su u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Vrijednosti aritmetičke sredine i standardne devijacije KEP indeksa u ispitivanim skupinama pilot studije

Skupina	Aritmetička sredina	Standardna devijacija
Pušači THS-a	17,3	13,2
Pušači cigareta	24,3	20,2
Nepušači	9,8	5,5

U izračunu je korištena aritmetička sredina vrijednosti standardnih devijacija, te je stopa otpadanja ispitanika također uzeta u obzir. Izračun pomoću korištenih parametara je utvrdio da je u svaku skupinu potrebno uključiti minimalno 20 ispitanika.

3.2 Kriteriji uključivanja/isključivanja ispitanika

Prije uključivanja u studiju svi ispitanici su pročitali i potpisali obrazac informiranog pristanka. Svi istraživački postupci poštivali su temeljne etičke i bioetičke principe propisane Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Protokol istraživanja validiran je i odobren od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Rijeka (Klasa: 003-05/22-1/19; Ur. broj: 2170-29-02/1-22-2), Etičkog povjerenstva Fakulteta dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci (Klasa: 035-01/22-01/150; Ur. broj: 2170-57-006-01-22-1) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (Klasa: 007-08/22-01/77; Ur. broj: 2170-24-04-3/1-22-6).

Kako bi se ispitanici smatrali pušačima THS-a ili cigareta morali su odgovoriti pozitivno na pitanje u istraživačkom upitniku koje glasi: "Jeste li tijekom svog života konzumirali najmanje 100 cigareta/duhanskih umetaka?". U istraživanje su bili uključeni samo ispitanici koji su konzumirali isključivo jedan od ispitivanih duhanski proizvoda unazad barem 6 mjeseci od trenutka uključivanja u istraživanje [147]. Dodatno zbog velike raznolikosti cigareta i sustava za zagrijavanje duhana na tržištu u istraživanje su uključeni isključivo pušači THS-a koji konzumiraju proizvod IQOS (Phillip Morris, Richmond, SAD) odnosno pušači cigareta koji konzumiraju Marlboro Gold cigareta (Marlboro, Richmond, SAD) Nepušačima su se smatrali ispitanici koji tijekom života nisu nikada pušili.

Kriteriji isključivanja ispitanika iz istraživanja odnose se na čimbenike koji imaju ili mogu imati utjecaj na formiranje biofilma ili proliferaciju bakterijskih vrsta. Stoga su iz istraživanja isključeni pacijenti koji su unazad 3 mjeseca konzumirali neki oblik antibiotske terapije, pacijenti koji svakodnevno koriste oralne antiseptike, pacijenti koji boluju od sustavnih bolesti kao što su diabetes melitus i autoimune bolesti (npr. reumatoidni artritis, sustavni lupus erythematosus i sl.), odnosno pacijenti koji uzimaju kortikosteroidnu ili druge oblike imunološke terapije, te pacijenti koji su u aktivnoj ortodontskoj terapiji [57, 148, 149]. Također, iz istraživanja su bili isključeni pacijenti koji su imali manje od 10 zuba [70].

3.3 Procjena intenziteta pušenja

Kako bi se procijenile pušačke navike ispitanika u pušača THS-a i pušača cigareta ispitanici su ispunjavali upitnik o pušenju. Intenzitet pušenja procijenjen je pomoću podataka o prosječnom broja konzumiranih cigareta/duhanskih umetaka i trajanja navike pušenja izražene u godinama [147]. Podaci o navikama pušenja (vrsta konzumiranog duhanskog proizvoda, godine pušačkog staža i broj konzumiranih duhanskih umetaka/cigareta) dobiveni su putem istraživačkog upitnika.

3.4 Analiza mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma

Radi procjene i usporedbe mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilмова pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača učinjena je metagenomska analiza bakterijskog sastava mikrobioma putem sekvencioniranja bakterijskog 16s rRNA gena metodom sekvencioniranja iduće generacije Ion Torrent tehnologijom.

3.5 Prikupljanje uzoraka supragingivnog dentalnog biofilma

Uzorci biofilмова prikupljeni su u jutarnjim satima (između 8.00 i 10.00 sati). Ispitanici su dobili upute da na dan uzorkovanja ujutro ne četkaju zube, a večer prije da zube četkaju između 20.00 i 22.00 sata kako bi uzorkovani biofilmovi bili podjednake zrelosti [141].

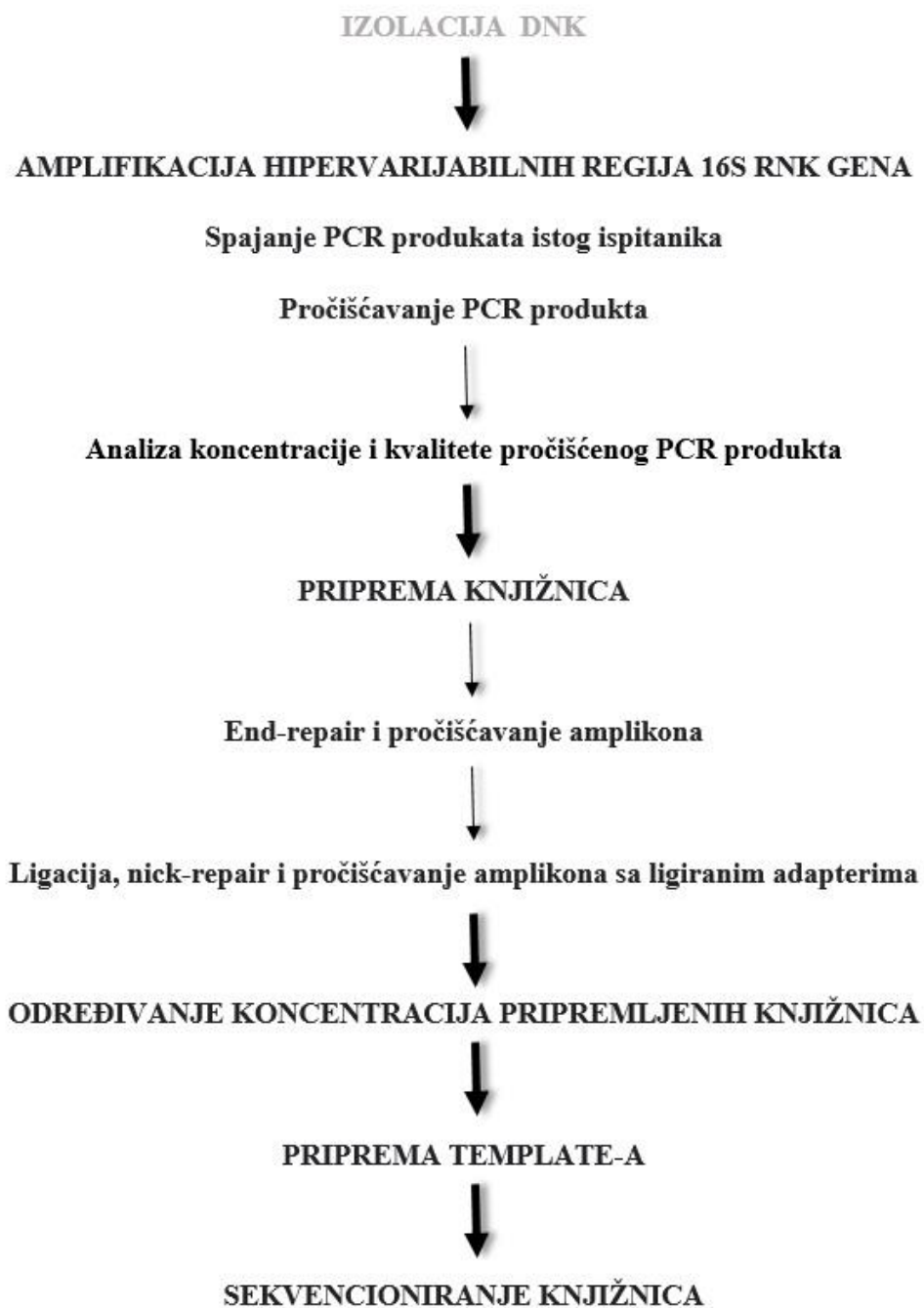
Uzorci su prikupljeni u uvjetima suhog radnog polja koji su bili osigurani vaterolama i sustavom aspiracije stomatološke jedinice pomoću sterilnih Gracey kireta sastrugivanjem biofilma s bukalnih i oralnih površina prvih trajnih kutnjaka. Ako su ispitanicima prvi trajni kutnjaci bili ekstrahirani uzorak se uzimao s bukalnih i oralnih ploha mezijalnog (drugi pretkutnjak) ili distalnog (drugi trajni kutnjak) zuba koji je bio prisutan u ustima ispitanika [70]. Prikupljeni uzorci biofilma pohranjivani su u sterilne Eppendorf tubice volumena 1,5 mL koje su sadržavale medij za pohranu. (750 μ L Tris-EDTA puferske otopine (pH=7,4) + 100 μ L 0,5M NaOH(0,5N)) te su skladišteni u zamrzivaču na -20 °C do trenutka kada se vršila izolacija bakterijske DNK.

3.6 Izolacija DNK iz uzoraka supragingivnog dentalnog biofilma

Izolacija DNK vršena je manualno pomoću komercijalnog Nucleospin Tissue kita (Macherey Nagel, Düren, Njemačka). Pohranjeni uzorci biofilмова su nakon što su izvađeni iz zamrzivača

ostavljeni 10 minuta na sobnoj temperature kako bi se odledili. U međuvremenu su pripremljeni reagensi kita za izolaciju DNK prema uputama proizvođača: 48 ml etanola dodano je u spremnik za B5 buffer reagens, a 1.35 mL Proteinase buffera dodano je u spremnik s Proteinase K reagensom. Proteinaza K pohranjena je na 4 °C. Za lizu bakterijskih stanica pripremljena je otopina svježeg lizozima otapanjem 0,02 g lizozima u 500 µl 20mM TrisHCl te G+ lizirajući pufer miješanjem otopina 20mM Tris/HCL, 2 mM EDTA i 1 % Triton X-100 s konačnim pH koji iznosi 8. Odmrznuti uzorci plaka zatim su centrifugirani u eppendorf tubicama u kojima su bili pohranjeni 5 min na 13000 okretaja u minuti te je po završetku centrifugiranja pipetom uklonjen supernatant i ostavljeno oko 50 µl sedimenta. U tubice sa sedimentom otpipetirano je 250 µl G+ lizirajućeg pufera i 40 µl svježe pripremljene otopine lizozima te je sadržaj kratko vorteksiran pa zatim inkubiran u termomikseru pri temperaturi od 37 °C na 850 okretaja u minuti tijekom 1 sata. Nakon inkubacije u svaki uzorak je otpipetirano 40 µl proteinaze K i lagano vorteksirano te je provedena inkubacija u trajanju od 2 h na 56°C, na termomikseru uz miješanje na 850 okretaja u minuti. Zatim je dodano 300 µl B3 pufera te su uzorci ponovno inkubirani tijekom 10 minuta na 70 °C. Nakon što su eppendorf tubice s uzorcima ostavljene 5 minuta na sobnoj temperaturi radi hlađenja u svaki uzorak je dodano 400 µl 96-100% etanola te su dobro vorteksirani tijekom 10 sekundi. Zatim je u prethodno pripremljene elucijske eppendorf tubice volumena 1,5 mL s postavljenim tissue kolonicama (po jedna za svaki uzorak) prebačeno pola sadržaja svakog uzorka te su iste centrifugirane 1 minutu na 11000 okretaja u minuti. Tekućina koja se skupila na dnu elucijskih tubica je uklonjena, a tissue kolonice su potom vraćene u tubice. Postupak je ponovljen s ostatkom volumena uzorka iz Eppendorf tubica u kojima je vršena liza stanica. U idućem koraku na svaku kolonicu je otpipetirano 500 µl pufera BW te su elucijske tubice s kolonom centrifugirane kroz 1 minutu na 11000 okretaja u minuti. Tekućina koja se skupila na dnu elucijskih tubica je uklonjena, a kolonice su vraćene u elucijske tubice. Postupak je zatim ponovljen s 600 µl pufera B5, te su naposljetku tissue kolonice u elucijskim tubicama osušene centrifugiranjem kroz 1 minutu na 11000 okretaja u minuti. Nakon sušenja kolonice su prebačene u prethodno pripremljene eppendorf tubice volumena od 1.5 mL te je u svaku otpipetirano 50 µl elucijskog pufera BE (ugrijanog na 70°C) te je provedena inkubacija u trajanju od 3 min na sobnoj temperaturi. Elucija DNK je potom provedena centrifugiranjem u trajanju od 1 minute pri 11000 okretaja u minuti. Nakon elucije izmjerena je koncentracija dobivene DNK pomoću Qubit fluorometra (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Za mjerenje koncentracije korišten je QubitDNABroad range

reagens pripremljen prema uputama proizvođača. Nakon mjerenja koncentracije DNK pripremljena su potrebna razrjeđenja DNK izolata za daljnji postupak izrade knjižnica koje će biti sekvencirane metodom NGS-a. Izmjerene koncentracije izolirane DNK iz uzoraka biofilma s razrjeđenjima prikazane su u Tablici 3.2. Uzorci iz kojih nije dobivena dovoljna količina DNK, nisu korišteni u daljnjim koracima (shema 3.1).



Shema 3.1. Postupak izrade knjižnica, pripreme templatea i sekvenciranja iduće generacije

Tablica 3.2. Koncentracije izolirane DNK iz uzoraka supragingivnog dentalnog biofilma

Br. Uzorka	Koncentracija izolirane DNK (ng/μl)	Br. Uzorka	Koncentracija izolirane DNK (ng/μl)	Br. Uzorka	Koncentracija izolirane DNK (ng/μl)	Br. Uzorka	Koncentracija izolirane DNK (ng/μl)
1	0	19	1,49	37	17,8	55	13,1
2	7,28	20	13,1	38	9,48	56	22
3	22	21	17,3	39	15,8	57	20,8
4	0	22	11,2	40	11	58	15,8
5	10,3	23	5,68	41	1,9	59	9,8
6	12,4	24	0	42	2,51	60	7,88
7	7,48	25	16,6	43	1,32	61	5,16
8	0	26	22,8	44	8,36	62	13,6
9	5,52	27	3,46	45	1,66	63	9,4
10	6,32	28	5,16	46	3,84	64	9,6
11	6,16	29	6,64	47	13,8	65	7,48
12	3,49	30	7,76	48	13,2	66	4
13	2,5	31	1	49	14,2	67	11,3
14	9,28	32	1,38	50	5,04	68	3,62
15	5,4	33	19,6	51	5,12	69	0
16	20,8	34	14,1	52	15,9		
17	10,9	35	17,4	53	16,4		
18	11,4	36	10,6	54	4,68		

3.7 Izrada knjižnica

U postupku izrade knjižnica korišten je Ion 16S Metagenomics Kit (TermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

3.7.1 Amplifikacija hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena

Prethodno pripremljena razrjeđenja izolata DNK korištena su u amplifikaciji (umnožavanju) hipervarijabilnih regija V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 i V9 16S rRNK gena. Za PCR reakcije korišten je 1 μ l ekstrahirane DNK pojedinog uzorka te je prema uputama proizvođača provedena amplifikacija u 25 ciklusa reakcije PCR-a. Za svaki uzorak pripremljena je PCR reakcija koristeći kombinaciju dva seta primera (Primer set V2-4-8 i Primer set V3-6, 7-9) te su pripremljene reakcije pozitivne i negativne kontrole. Prije pipetiranja reagensa svaki je vorteksiran i pulsno centrifugiran u originalnom spremniku. Volumeni reagensa u PCR reakcijama prikazani su u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Volumeni reagensa korišteni u PCR reakciji amplifikacija hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena

Komponenta	Uzorak/volumen pozitivne kontrole	Volumen negativne kontrole
2X Environmental Master Mix	15 μ l	15 μ l
16S Primer Set (Primer set V2-4-8 ili Primer set V3-6, 7-9)	3 μ l	3 μ l
Uzorak DNK	1 μ l uzorka	/
Voda	11 μ l	12 μ l
Ukupno	30 μl	30 μl

Reakcije su provedene na PCR pločici u termalnom cycleru prema programu koji je prikazan u tablici 3.4.

Tablica 3.4. Program PCR reakcije amplifikacije hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena

	Temperatura	Vrijeme
	95°C	10 min
25 ciklusa	95°C	30 s
	58°C	30 s
	72°C	20s
	72°C	7 min
	4°C	Do postizanja temperature

3.7.2 Pooliranje amplikona svakog ispitanika i pročišćavanje PCR produkta

Pročišćavanje dobivenih PCR produkata obavljeno je unutar 24 sata od završetka PCR reakcije amplifikacije u Eppendorf tubicama. U ovom postupku korišten je Agencourt AMPure XP beads reagens (TermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) i neposredno prije postupka pročišćavanja pripremljen 70% etilni alkohol. U posebno pripremljene Eppendorf tubice za svaki uzorak otpipetirano je po 20 µl PCR produkta obje PCR reakcije pojedinog uzorka i 72 µl Agencourt AMPure XP beads reagensa na sobnoj temperature. Nakon vorteksiranja i pulsnog centrifugiranja miješavina je ostavljena 5 minuta na sobnoj temperaturi radi inkubacije. Nakon pulsnog centrifugiranja tubice su postavljene na magnetno postolje DynaMag-2 magneta (TermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) na 3 minute dok se otopina nije razbistrila. U idućem koraku supernatant je uklonjen pipetom te je zatim u tubice dodano 500 µl 70% etilnog alkohola. Otopina je inkubirana 30 sekundi tijekom kojih su tubice 2 puta bile okretane na magnetnom postolju za 180 stupnjeva. Na taj način se Agencourt kuglice na kojima su vezani amplikoni hipervarijabilnih regija bakterijskog 16S RNK gena pomiču kroz 70 % etilni alkohol radi odstranjivanja ostataka PCR reakcija te ostalih nečistoća. Nakon što se otopina razbistrila supernatant je uklonjen pipetom. Postupak ispiranja etilnim alkoholom je zatim ponovljen, te su tubice pulsno centrifugirane kako bi se uklonili ostaci etilnog alkohola. Tubice su potom ponovno vraćene na magnetno postolje, a preostali supernatant uklonjen je 20 µl pipetom. Tubice su zatim vraćene na magnetno postolje kako bi se Agencourt kuglice osušile na zraku pri sobnoj temperaturi tijekom 4 minute. U tubice je nakon toga dodano 15 µl nuclease-free vode te su otopine vorteksirane kako bi se kuglice resuspendirale. U ovom postupku vezani pročišćeni amplikoni eluirani su s Agencourt kuglica. Nakon pulsnog centrifugiranja tubice su vraćene na magnetni

stalak kako bi se kuglice odvojile od supernatanta koji sadrži elutiranu DNK odnosno pročišćene amplikone hipervarijabilnih regija 16S RNK gena dobivenih u PCR reakcijama. Dobiveni supernatant pipetom je prebačen u Eppendorf LoBind tubice volumena 1.5 ml.

3.7.3 Analiza koncentracije i kvalitete pročišćenog PCR produkta

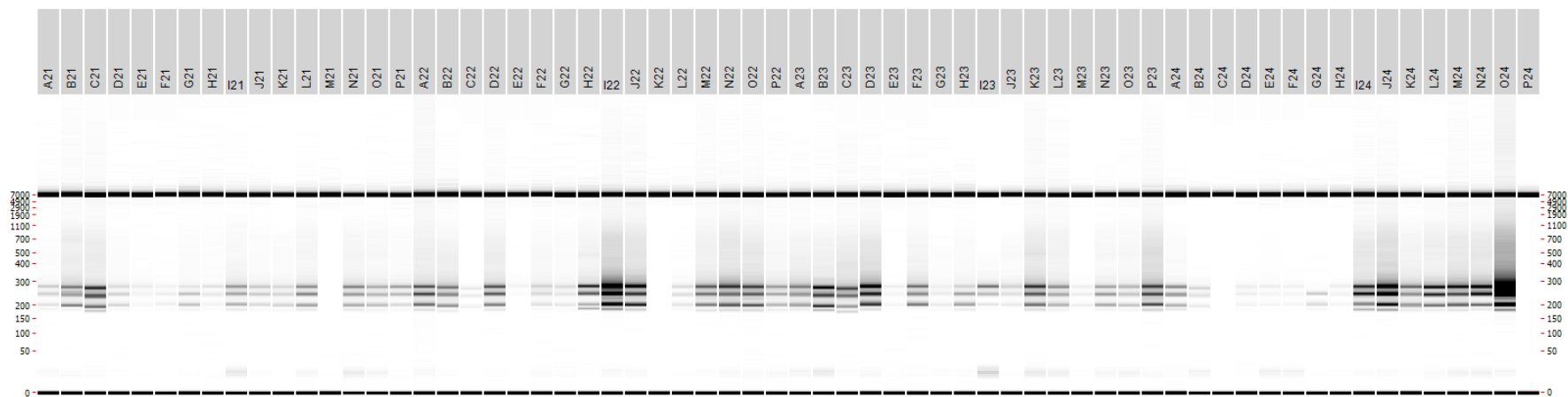
Kvantifikacija dobivenih pročišćenih PCR produkata provedena je na Agilent 2100 Bioanalyzer uređaju pomoću Agilent softwarea i Agilent High Sensitivity DNA kita (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD) prema uputama proizvođača. Spomenuti uređaj radi na temelju fragmente analize, odnosno automatizirane elektroforeze (odvajanje fragmenata -amplikona po veličini, te kvantifikacija amplikona u odnosu na standard). Za analizu su iskorištena po 2 μ l od svakog dobivenog PCR produkta razrijeđenih s 8 μ l vode. Rezultati analize dobiveni su u digitalnom obliku a tiču se veličine, količine, integriteta i čistoće pročišćenog PCR produkta. Zbog niske koncentracije dobivenih PCR produkata, postupak amplifikacije je ponovljen te su postignute dovoljne koncentracije za daljnji postupak pripreme knjižnica. Prema dobivenim rezultatima pripremljena su razrjeđenja pročišćenih PCR produkata od 150 ng/ μ l koja su potrebna u idućem koraku pripreme knjižnica. Rezultati provedene analize te izračuni potrebnih volumena pročišćenih PCR produkata i vode za postizanje potrebne koncentracije prikazani su u tablici 3.5 i na slici 3.1.

Tablica 3.5. Koncentracije pročišćenih PCR produkata i izračun volumena razrjeđenja nakon PCR amplifikacije hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena

Redni broj	Naziv uzorka	Oznaka uzorka	Ukupna koncentracija (ng/ul)	Koncentracija regije [180-350] (ng/ul)	Koncentracija nerazrjeđenog PCR produkta [ng/uL]	Količina PCR produkta (ng) u 13 uL
1	Sample 2	A21	0,06	0,08	0,4	5,2
2	Sample 3	B21	0,28	0,27	1,35	17,55
3	Sample 5	C21	0,4	0,39	1,95	25,35
4	Sample 6	D21	0,06	0,09	0,45	5,85
5	Sample 7	E21	0	0,04	0,2	2,6
6	Sample 9	F21	0	0,04	0,2	2,6
7	Sample 10	G21	0,06	0,09	0,45	5,85
8	Sample 11	H21	0,02	0,05	0,25	3,25
9	Sample 12	I21	0,19	0,23	1,15	14,95
10	Sample 13	J21	0,08	0,11	0,55	7,15
11	Sample 14	K21	0,07	0,11	0,55	7,15
12	Sample 15	L21	0,21	0,23	1,15	14,95
13	Sample 16	M21	0	0	0	0
14	Sample 17	N21	0,27	0,31	1,55	20,15
15	Sample 18	O21	0,16	0,2	1	13
16	Sample 19	P21	0,11	0,15	0,75	9,75
17	Sample 20	A22	0,28	0,32	1,6	20,8

18	Sample 21	B22	0,23	0,24	1,2	15,6
19	Sample 22	C22	0,02	0,04	0,2	2,6
20	Sample 23	D22	0,29	0,33	1,65	21,45
21	Sample 25	E22	0	0,01	0,05	0,65
22	Sample 26	F22	0,06	0,09	0,45	5,85
23	Sample 27	G22	0,04	0,07	0,35	4,55
24	Sample 28	H22	0,28	0,29	1,45	18,85
25	Sample 29	I22	1,04	1,01	5,05	65,65
26	Sample 30	J22	0,51	0,52	2,6	33,8
27	Sample 31	K22	0	0	0	0
28	Sample 32	L22	0,05	0,06	0,3	3,9
29	Sample 33	M22	0,34	0,34	1,7	22,1
30	Sample 34	N22	0,5	0,49	2,45	31,85
31	Sample 35	O22	0,41	0,41	2,05	26,65
32	Sample 36	P22	0,17	0,19	0,95	12,35
33	Sample 37	A23	0,3	0,3	1,5	19,5
34	Sample 38	B23	0,49	0,5	2,5	32,5
35	Sample 39	C23	0,35	0,35	1,75	22,75
36	Sample 40	D23	0,56	0,55	2,75	35,75
37	Sample 41	E23	0	0,03	0,15	1,95
38	Sample 42	F23	0,23	0,25	1,25	16,25
39	Sample 43	G23	0,01	0,05	0,25	3,25
40	Sample 44	H23	0,13	0,15	0,75	9,75
41	Sample 45	I23	0,17	0,18	0,9	11,7
42	Sample 46	J23	0,05	0,08	0,4	5,2
43	Sample 47	K23	0,43	0,42	2,1	27,3

44	Sample 48	L23	0,2	0,24	1,2	15,6
45	Sample 49	M23	0,01	0,04	0,2	2,6
46	Sample 50	N23	0,18	0,21	1,05	13,65
47	Sample 51	O23	0,12	0,15	0,75	9,75
48	Sample 52	P23	0,4	0,42	2,1	27,3
49	Sample 53	A24	0,16	0,18	0,9	11,7
50	Sample 54	B24	0,05	0,07	0,35	4,55
51	Sample 55	C24	0	0	0	0
52	Sample 56	D24	0,01	0,04	0,2	2,6
53	Sample 57	E24	0,01	0,04	0,2	2,6
54	Sample 58	F24	0	0,03	0,15	1,95
55	Sample 59	G24	0,05	0,06	0,3	3,9
56	Sample 60	H24	0,01	0,03	0,15	1,95
57	Sample 61	I24	0,41	0,42	2,1	27,3
58	Sample 62	J24	0,77	0,75	3,75	48,75
59	Sample 63	K24	0,26	0,29	1,45	18,85
60	Sample 64	L24	0,48	0,48	2,4	31,2
61	Sample 65	M24	0,5	0,51	2,55	33,15
62	Sample 66	N24	0,61	0,61	3,05	39,65
63	Sample 67	/	/	/	/	/
64	Sample 68	O24	1,9	1,73	8,65	112,45

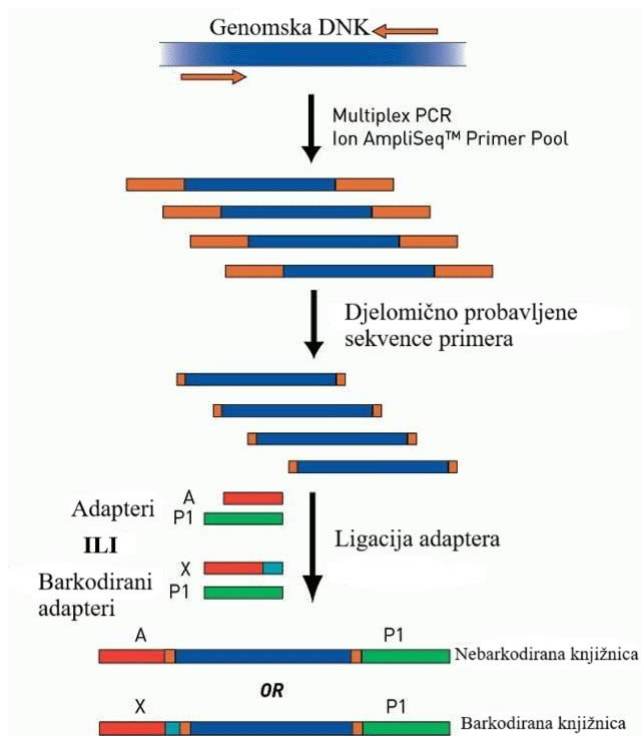


Slika 3.1. Snimak fragmentne analize pročišćenih PCR produkata nakon PCR amplifikacije

3.7.4 Priprema knjižnica

3.7.4.1 End-repair amplikona i pročišćavanje etanolom

Za pripremu knjižnica korišten je Ion Plus Fragment Library kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Cilj ovog koraka je modificiranje krajeva amplikona (djelomična digestija primera) kako bi se njih u idućem koraku mogli vezati ligirati adapteri i barkodovi koji su važni u idućim koracima (Slika 3.2).



Slika 3.2 Postupak end-repaira te ligiranja adaptera i barkodova na dobivene amplikone

Reakcije su učinjene u Eppendorf LoBind tubicama volumena 1.5 ml u koje je otpipetiran sadržaj prikazan u tablici 3.6.

Tablica 3.6. Komponente reakcije End-repair-a

Sadržaj	Volumen
Pročišćeni PCR produkt (150ng/μl)	79 μl
5X End repair Buffer	20 μl
End Repair Enzyme	1 μl
Ukupno	100 μl

Sadržaj svake tubice resuspendiran je te ostavljen na sobnoj temperature tijekom 20 minuta radi inkubacije. Zatim je u tubice dodano 180 μ l Agencourt AMPure XP reagensa, te je sadržaj tubica vorteksiran, pulsno centrifugiran i zatim inkubiran na sobnoj temperaturi tijekom 5 min. Otopina je zatim pulsno centrifugirana i postavljena na magnetno postolje na 3 minute dok se ne razbistri. Supernatant je zatim uklonjen pipetom, a u tubice je dodan 500 μ l 70% etilnog alkohola te je dva puta proveden postupak čišćenja rotacijom tubica na magnetnom postolju kako je ranije opisano. Nakon čišćenja i sušenja Agencourt kuglica na magnetnom postolju u tubice je dodano 25 μ l Low TE reagensa te su kuglice resuspendirane vorteksiranjem. Nakon pulsnog centrifugiranja tubice su vraćene na magnetno postolje kako bi se kuglice izdvojile iz otopine. Nakon 1 minute odvojeni supernatant koji sadrži eluiranu DNK je prebačen u Eppendorf LoBind tubice volumena 1.5 ml.

3.7.4.2 Ligacija, nick-repair i pročišćavanje amplikona s legiranim adapterima

U ovom koraku na prethodno pripremljene amplikone se vezuju adapteri i barkodovi koji su važni u klonalnoj amplifikaciji u idućim koracima. Reakcije ligacije i nick repaira rađene su u PCR tubicama volumena 0.2 ml u koje je otpipetiran sadržaj prikazan u tablici 3.7.

Tablica 3.7. Komponente reakcija ligacije i nick repair-a

Komponenta	Volumen
DNA (pročišćeni, end repairani amplikoni)	25 μ l
10X Ligase buffer	10 μ l
Ion P1 Adapter	2 μ l
Ion Xpress Barcode X*	2 μ l
dNTP mix	2 μ l
Nuclease-free voda	49 μ l
DNA ligaza	2 μ l
Nick repair polimeraza	8 μ l
Ukupno	100 μl

*X označava broj barkoda koji se pridružuje svakom pojedinom uzorku

Tubice sa sadržajem su zatim postavljene u termalni cycler prema programu prikazanom u tablici 3.8.

Tablica 3.8. Protokol termalnog cyclera za reakcije ligacije i nick repaira

Temperatura	Vrijeme
25° C	15 min
72° C	5 min
4° C	Do postizanja temperature

Nakon što su otopine postigle temperature od 4° C prebačene su Eppendorf Lobind tubice i podvrgnute postupku pročišćavanja. U pripremljene uzorke dodano je 140 µl Agencourt AMPure XP reagensa te su otopine vorteksirane, pulsno centrifugirane i zatim ostavljene na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta radi inkubacije. Nakon toga pročišćavanje amplikona s legiranim adapterima provedeno je na jednaki način kao i nakon amplifikacije s dva seta primera hipervarijabilnih regija.

Nakon sušenja Agencourt kuglica provedena je elucija barkodiranih amplikona dodavanjem 25 µl Low TE reagensa kako je prethodno opisano u postupku end repaira. Eluati koji su se nalazili u odvojenom supernatantu prebačeni su u Eppendorf LoBind tubice volumena 1.5 ml.

3.7.4.3 Određivanje koncentracija pripremljenih knjižnica

Kako bi se maksimizirao broj očitavanja prilikom postupka sekvencioniranja, važno je odrediti optimalnu koncentraciju knjižnica prije pripreme template-a. Previše razrjeđene knjižnice dati će jako mali broj očitavanja, a nedovoljno razrjeđene knjižnice rezultirat će nastajanjem previše poliklonalnih templatea u reakciji emulzijskog PCR-a koji su nepoželjni jer u postupku sekvencioniranja daju beskorisna očitavanja.

Koncentracija pripremljenih knjižnica određena je na Agilent 2100 Bioanalyzer uređaju pomoću Agilent softwarea i Agilent High Sensitivity DNA kita.

Prije određivanja koncentracije knjižnice su amplificirane pomoću komponenti Ion Plus Fragment Library kita (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Prema sljedećem postupku: 20 μ l svake pripremljene knjižnice pomiješano je s 5 μ l Low TE reagensa Low TE reagens je učinjena PCR reakcija s komponentama prikazanim u tablici 3.9

Tablica 3.9. Komponente PCR reakcije amplifikacije pripremljenih knjižnica

Komponenta	Volumen
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	100 μ l
Library Amplification Primer Mix	5 μ l
Neamplificirana knjižnica (razrijeđena s Low TE reagensom)	25 μ l
Ukupno	130 μ l

Ukupni reakcijski volumen od 130 μ l podijeljen je na dva podjednaka volumena od oko 65 μ l koji su otpipetirani u PCR tubicama volumena 0,2 μ l. Tubice su postavljene u Termal cycler i provedena je reakcija PCR po programu prikazanom u tablici 3.10.

Tablica 3.10. Protokol termalnog cyclera za PCR reakcije amplifikacije pripremljenih knjižnica

	Korak	Temperatura	Vrijeme
	Denaturacija	95°C	5 min
7 ciklusa	Denaturacija	95°C	15s
	Aneliranje	58°C	15s
	Ekstenzija	70°C	1 min
	-	4°C	Zadržati temperaturu do maksimalno 1 h

Nakon provedene amplifikacije sadržaj PCR tubica svakog pojedinog uzorka je ponovno udružen u Eppendorf LoBind tubicama volumena 1,5 ml.

Amplificirane knjižnice su zatim pročišćene pomoću Agencourt AMPure XP Reagent kuglica (195 μ l reagensu dodano je u svaku tubicu s amplificiranom knjižnicom), magnetnog postolja i 70% etilnog alkohola prema prethodno opisanom postupku.

Za određivanje koncentracija amplificiranih knjižnica Agilent 2100 Bioanalyzer uređajem pripremljena su razrjeđenja uzoraka koja su sadržavala 2 μ l amplificirane knjižnice i 8 μ l vode.

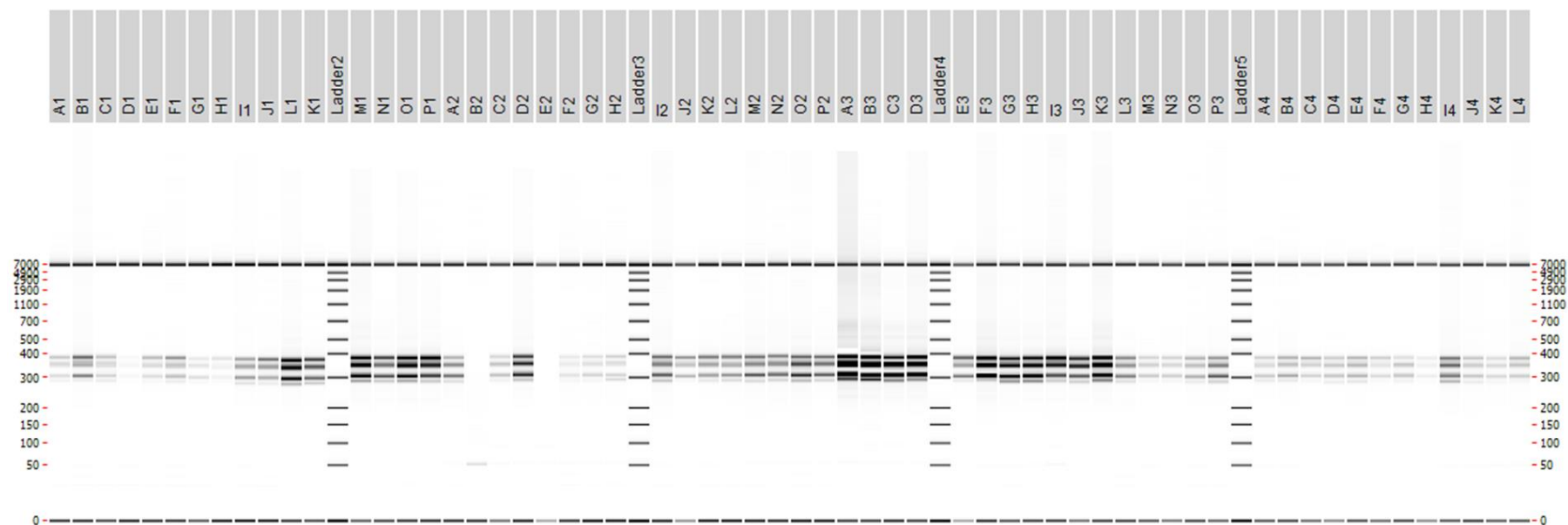
Prema rezultatima analize pripremljena su konačna potrebna razrjeđenja knjižnica (40 pM) koja su se koristila za pripremu template-a u idućem koraku. Pripremljena razrjeđenja su zatim bila pohranjena u zamrzivaču na -20°C . Rezultati analize koncentracija amplificiranih knjižnica prikazani su u tablici 3.11 i slici 3.3.

Tablica 3.11. Koncentracije amplificiranih knjižnica

Br.	Naziv uzorka	Oznaka uzorka	Ukupna konc. (ng/ul)	Konc. regije [270-420] (ng/ul)	Konc. Regije [270-420] Mol. (nmol/l)	Konc. Nerazrjedenih knjižnica (pM)	Konc. 30x razrjedenja (pM)	Faktor razrjedenja za 36 pM (x)	V knjiž. (uL)	V H ₂ O (uL)
1	Sample 2	A1	0,34	0,34	1,51	7550	251,7	7,0	2	12,0
2	Sample 3	B1	0,93	0,95	4,16	20800	693,3	19,3	2	36,5
3	Sample 5	C1	0,46	0,45	1,96	9800	326,7	9,1	2	16,1
4	Sample 6	D1	0,08	0,08	0,34	1700	/	47,2	2	92,4
5	Sample 7	E1	0,35	0,36	1,56	7800	260,0	7,2	2	12,4
6	Sample 9	F1	0,68	0,67	2,94	14700	490,0	13,6	2	25,2
7	Sample 10	G1	0,21	0,21	0,95	4750	158,3	4,4	2	6,8
8	Sample 11	H1	0,14	0,15	0,65	3250	108,3	3,0	2	4,0
9	Sample 12	I1	0,69	0,67	3,07	15350	511,7	14,2	2	26,4
10	Sample 13	J1	0,84	0,86	3,84	19200	640,0	17,8	2	33,6
11	Sample 14	L1	2,35	2,31	10,53	52650	1755,0	48,8	2	95,5
12	Sample 15	K1	1,35	1,35	6,11	30550	1018,3	28,3	2	54,6
13	Sample 16	M1	2,7	2,58	11,48	57400	1913,3	53,1	2	104,3
14	Sample 17	N1	1,48	1,48	6,6	33000	1100,0	30,6	2	59,1
15	Sample 18	O1	2,52	2,41	10,7	53500	1783,3	49,5	2	97,1
16	Sample 19	P1	2,13	2,12	9,25	46250	1541,7	42,8	2	83,6
17	Sample 20	A2	0,92	0,92	4,16	20800	693,3	19,3	2	36,5
18	Sample 21	J5	1,38	1,2	5,32	26600	886,7	24,6	2	47,3

19	Sample 22	C2	0,5	0,51	2,25	11250	375,0	10,4	2	18,8
20	Sample 23	D2	1,75	1,73	7,6	38000	1266,7	35,2	2	68,4
21	Sample 25	K5	1,46	1,19	5,29	26450	881,7	24,5	2	47,0
22	Sample 26	F2	0,2	0,21	0,97	4850	161,7	4,5	2	7,0
23	Sample 27	G2	0,29	0,28	1,26	6300	210,0	5,8	2	9,7
24	Sample 28	H2	0,35	0,35	1,56	7800	260,0	7,2	2	12,4
25	Sample 29	I2	1,43	1,4	6,24	31200	1040,0	28,9	2	55,8
26	Sample 30	J2	0,78	0,81	3,52	17600	586,7	16,3	2	30,6
27	Sample 31	K2	0,85	0,86	3,75	18750	625,0	17,4	2	32,7
28	Sample 32	L2	0,91	0,91	3,99	19950	665,0	18,5	2	34,9
29	Sample 33	M2	1,21	1,16	5,15	25750	858,3	23,8	2	45,7
30	Sample 34	N2	1,15	1,15	5,1	25500	850,0	23,6	2	45,2
31	Sample 35	O2	1,64	1,64	7,31	36550	1218,3	33,8	2	65,7
32	Sample 36	P2	1,25	1,25	5,5	27500	916,7	25,5	2	48,9
33	Sample 37	A3	4,84	4,62	20,56	102800	3426,7	95,2	2	188,4
34	Sample 38	B3	4,16	3,86	17,44	87200	2906,7	80,7	2	159,5
35	Sample 39	C3	3,26	3,13	14,06	70300	2343,3	65,1	2	128,2
36	Sample 40	D3	3,53	3,27	14,55	72750	2425,0	67,4	2	132,7
37	Sample 41	E3	1,4	1,41	6,19	30950	1031,7	28,7	2	55,3
38	Sample 42	F3	3,19	2,99	13,3	66500	2216,7	61,6	2	121,1
39	Sample 43	G3	2,56	2,51	11,3	56500	1883,3	52,3	2	102,6
40	Sample 44	H3	2,64	2,57	11,61	58050	1935,0	53,8	2	105,5

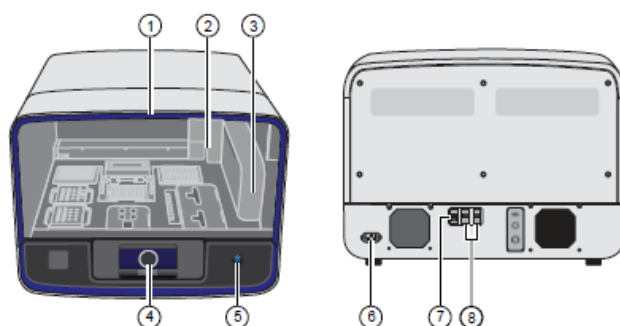
41	Sample 45	I3	2,37	2,19	9,52	47600	1586,7	44,1	2	86,1
42	Sample 46	J3	2,12	2,11	9,32	46600	1553,3	43,1	2	84,3
43	Sample 47	K3	3,46	3,21	14,27	71350	2378,3	66,1	2	130,1
44	Sample 48	L3	1,11	1,06	4,77	23850	795,0	22,1	2	42,2
45	Sample 49	M3	0,42	0,43	1,94	9700	323,3	9,0	2	16,0
46	Sample 50	N3	0,43	0,43	1,92	9600	320,0	8,9	2	15,8
47	Sample 51	O3	0,64	0,65	2,9	14500	483,3	13,4	2	24,9
48	Sample 52	P3	1,29	1,31	5,94	29700	990,0	27,5	2	53,0
49	Sample 53	A4	0,41	0,42	1,88	9400	313,3	8,7	2	15,4
50	Sample 54	B4	0,65	0,65	2,9	14500	483,3	13,4	2	24,9
51	Sample 55	C4	0,47	0,49	2,14	10700	356,7	9,9	2	17,8
52	Sample 56	D4	0,53	0,57	2,58	12900	430,0	11,9	2	21,9
53	Sample 57	E4	0,62	0,63	2,84	14200	473,3	13,1	2	24,3
54	Sample 58	F4	0,34	0,36	1,59	7950	265,0	7,4	2	12,7
55	Sample 59	G4	0,43	0,45	2,01	10050	335,0	9,3	2	16,6
56	Sample 60	H4	0,17	0,19	0,83	4150	138,3	3,8	2	5,7
57	Sample 61	I4	1,47	1,47	6,61	33050	1101,7	30,6	2	59,2
58	Sample 62	J4	0,49	0,52	2,34	11700	390,0	10,8	2	19,7
59	Sample 65	K4	0,38	0,38	1,72	8600	286,7	8,0	2	13,9
60	Sample 66	L4	1,21	0,87	3,81	19050	635,0	17,6	2	33,3



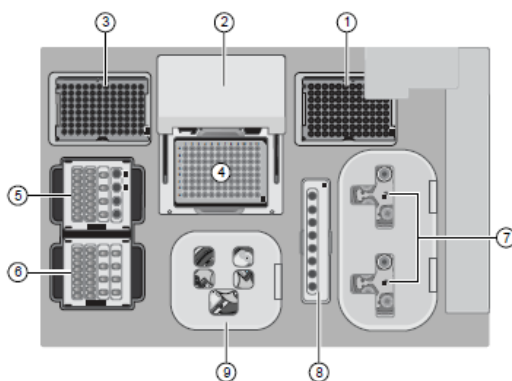
Slika 3.3. Snimka rezultata fragmentne analize amplificiranih knjižnica

2.8 Priprema template-a i punjenje čipova za sekvenciranje

Priprema predložaka i punjenje Ion 530™ čipa (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) učinjeno je u Ion Torrent Ion Chef uređaju (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) (Slika 3.4a i 3.4b) Laboratorija za molekularnu genetiku, MF Ljubljana, pomoću Ion PGM Hi-Q View Chef Kita (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača. Ion Chef je uređaj koji omogućuje automatiziran i pojednostavljen postupak pripreme template-a i punjenja čipova za sekvenciranje.



Slika 3.4a. Ion Torrent Ion Chef uređaj. 1- Vrata; 2- Mikropipetor; 3- Robotska ruka; 4- Touchscreen; 5- Gumb za uključivanje; 6- utor za napajanje; 7- Ethernet utor; 8- USB utor



Slika 3.4b. Ion Torrent Ion Chef uređaj. 1-spremnik za potrošene pipetne nastavke; 2- Automatizirani poklopac; 3- spremnik za nove pipetne nastavke; 4-Termal cycler; 5- postaja za reagense; 6- Postaja za otopine; 7- Recovery centrifuge; 8 –Enrichment station; 9-Centrifuga za punjenje čipova

Radni koraci

1. Kreiranje radnog programa na Ion Chef uređaju pomoću Ion Torrent Ion Suite softwarea
2. Priprema razrjeđenja knjižnica
3. Postava uzoraka knjižnica, regensa iz kita i čipa u Ion Chef uređaj
4. Pokretanje planiranog programa
5. Uklanjanje čipa iz uređaja

Kreiranje radnog programa

Radni program U Ion Suite softwareu kreira se na način da se u nizu padajućih izbornika odabiru kitovi i čipovi koji će se koristiti u postupku pripreme template-a te željeni uređaj za sekvenciranje. U slučaju ovog istraživanja to su Ion Torrent Ion 530 Kit –Chef, Ion 530™ Čip te Ion S5 system uređaj (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) za sekvenciranje. Dodatno potrebno je odabrati broj protoka (flows) ovisno o duljini planiranih sekvenci što je u ovom slučaju bio Chef Protocol – 400 bp (850 protoka), broj korištenih barkodova u knjižnicama koji je bio 60 te svakom barkodu dati naziv uzorka kojem odgovara.

Priprema razrjeđenja knjižnica

Od prethodno pripremljenih razrjeđenja knjižnica (40pM) uzeti su volumeni od 25 µl i udruženi u jedan zajednički uzorak (engl. *pooled sample*). Također su pripremljena i razrjeđenja kontrolnih knjižnica Human CEPH Control 200 library i E. Coli Control 400 Library prema uputama proizvođača.

Postava uzoraka knjižnica, regensa iz kita i čipa u Ion Chef uređaj, pokretanje programa i uklanjanje čipa iz uređaja

Sadržaj Ion Torrent Ion 530 Kit –Chef kita i Ion 530™ Čip postavljeni su u Ion Chef uređaj prema uputama proizvođača. Nakon provedbe planiranog programa čip je pažljivo uklonjen iz uređaja te je pohranjen u posebnom spremniku na 4°C.

2.9 Sekvenciranje knjižnica metodom Next generation sequencing-a

Sekvenciranje pooliranih (udruženih) knjižnica čiji su templatei prethodno napunjeni na Ion 530™ čip učinjeno je pomoću Ion S5 Ion GeneStudio S5 System uređaja.

Ion torrent tehnologija NGS-a bazirana je na tehnologiji semikonduktorskih čipova te detekciji promjene pH tijekom inkorporacije pojedinog nukleotida u sekvencijskim reakcijama. Čip se tijekom sekvenciranja prelijeva otopinom jednog od nukleotida A,T,C ili G te se promjena pH detektira kao taj nukleotid u pojedinačnoj jažici te pretvara u digitalni signal A,T,C ili G.



Slika 3.5. Ion S5 Ion GeneStudio S5 System uređaj 1 –Touchscreen; 2- Gumb za uključivanje; 3- Ion S5 Reagents spremnik; 4- utor za čip; 5- Boca za Ion S5 Solution wash solution; 6- Boca za Ion S5 Cleaning solution; 7- spremnik za otpad

2.10 Analiza rezultata sekvencioniranja

Identificirane sekvence amplicona odvojene su prema individualnim varijabilnim regijama 16s rRNK gena koristeći MetagenomicsPP plug-in u Ion Torrent Suite računalnom programu (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)[150]. Dobivene .fastq datoteke su ubačene u QIIME2 računalni program i obrađene putem QIIME2 DADA2 plug-ina pyro metodom[115, 116]. Dobivene tablice karakteristika (engl. feature tables) i reprezentativne sekvence svake varijabilne regije su zatim spojene. Taksonomske razine su bile uparene s reprezentativnim sekvencama varijabilnih regija koristeći VSEARCH baziranu funkciju taksonomske klasifikacije u sklopu QIIME2 programa [151]. Dobivene sekvence su uspoređivane s poznatim sekvencama u sklopu SILVA 132 baze podataka uz stopu sličnosti od 99%. Dodijeljene

taksonomske razine prikazane su u tablicama i izvedene su u .csv datoteci koristeći QIIME2 program. Generirana .csv datoteka uvedena je u MicrobiomeAnalyst platformu pomoću koje su učinjene grafičke vizualizacije i statističke analize sastava mikrobioma. Filtriranje i normalizacija uvezenih podataka učinjene su prema preporučenim postavkama unutar MicrobiomeAnalyst platforme [152].

Mikrobiomi ispitivanih skupina uspoređivani su na taksonomskim razinama Kruskal-Wallis testa (rod i vrsta) te pomoću engl. Heat tree analiza (koljeno, red, razred i obitelj). Heat tree analiza omogućava grafičko prikazivanje kvantitativnih (koristeći vrijednosti medijana zastupljenosti (engl. Abundance)) i statističkih (koristeći Wilcoxonov Rank Sum test) razlika između mikrobioma ispitivanih skupina na više taksonomskih razina istovremeno [153].

Bakterijska raznolikost mikrobioma između ispitivanih skupina procijenjena je kroz Alfa i Beta raznolikost.

Za procjenu alfa raznolikosti korišten je Observed taxa indeks koji govori o broju različitih detektiranih mikroorganizama na razini vrste u jednom uzorku [129].

Za procjenu beta raznolikosti korišten je Bray-Curtis indeks koji uspoređuje zastupljenost (engl. Abundance) i broj detektiranih bakterijskih vrsta između različitih uzoraka supragingivnog dentalnog biofilma. Vrijednosti Bray-Curtis indeksa vizualizirane su kroz 2D i 3D grafički prikaz koristeći engl. *Principal Coordinate Analysis* (PcoA) kao ordinacijsku metodu, a statistička značajnost testirana je PERMANOVA analizom. PcoA je metoda multidimenzionalne gradacije (engl. *Multi-Dimensional Scaling*) koja svoje izračune bazirana na dekompoziciji vlastitih vrijednosti (engl. *Eigenvalue decomposition*), odnosno utvrđivanju postojanja kombinacija podataka koje opisuju razlike među dobivenim rezultatima [130].

2.11 Karakteriziranje kariogenih bakterija

Pretraživanjem i uspoređivanjem rezultata relevantne znanstvene literature utvrđeno je da je među detektiranim bakterijskim vrstama njih 29 moguće povezati sa stanjem odsutnosti karijesa, a 53 vrste je moguće povezati sa stanjem prisutnosti i nastankom karijesnih lezija. Među detektiranim bakterijskim vrstama također su identificirane 2 vrste koje se prema relevantnoj znanstvenoj

literaturi mogu ujedno povezati i ne povezati s prisutnosti i nastankom karijesnih lezija [19, 55, 56,154-200].

2.12. Kliničke karakteristike i procjena karijes rizika Cariogram metodom

Procjena rizika za nastanak karijesa učinjena je zasebno za svakog ispitanika pomoću Cariogram aplikacije (AppBites, Priština, Kosovo). U tablici 3.12 su prikazani čimbenici koji se uključuju u Cariogram analizu.

Tablica 3.12. Čimbenici uključeni u procjenu karijes rizika Cariogram metodom

Čimbenik	Način procjene	Referentna skala	Ocjena
Prethodno karijes iskustvo	KEP indeks	Osoba bez karijes iskustva (KEP=0)	0
		KEP niži od prosjeka populacije	1
		KEP približno jednak prosjeku populacije	2
		KEP viši od prosjeka populacije	3
Pridružene bolesti	Medicinska anamneza	Zdrava osoba	0
		Blagi stupanj pridruženih bolesti	1
		Težak stupanj pridruženih bolesti	2
Sadržaj prehrane	Salivarna razina laktobacila	$\leq 10^3$ CFU/mL	0
		$<10^4$ CFU/mL	1
		$<10^5$ CFU/mL	2
		$\geq 10^6$ CFU/mL	3
Broj obroka u danu (uključeni međuobroci)	Intervju/upitnik	Do 3	0
		4-5	1
		6-7	2
		7+	3
Stupanj nakupljanja plaka	Full Mouth Plaque Score (FMPS) indeks	<5%	0
		5-20%	1

		20-50%	2
		>50%	3
Kariogene bakterije	Salivarna razina <i>S. mutans</i>	$\leq 2 \times 10^4$ CFU/ml	0
		$2 \times 10^4 - 10^5$ CFU/ml	1
		$10^5 - 10^6$ CFU/ml	2
		$\geq 10^6$ CFU/ml	3
Program fluoridacije	Intervju/upitnik	Ne koristi izvor fluorida	0
		Koristi samo pastu s fluoridima	1
		Uz pastu povremeno koristi i druge izvore fluorida	2
		Uz pastu učestalo koristi i druge izvore fluorida	3
Količina sline	Kvantum salivacije	Normalna sekrecija sline	0
		0.9-1.1 ml/min	1
		0.5-0.9 ml/min	2
		<0.5 ml/min	3
Puferski kapacitet sline	pH sline	>6.0	0
		4.5-5.5	1
		<4.0	2
Klinička prosudba	Subjektivna prosudba terapeuta pacijentovog općeg stanja, karijes aktivnosti, motiviranosti na dentalnu terapiju i socijalnih čimbenika	Pozitivan dojam	0
		Neutralan dojam	1
		Negativan dojam	2
		Izrazito negativan dojam	3

Podaci potrebni za provedbu Cariogram analize prikupljeni su putem razgovora s ispitanicima, kliničkim pregledom te provedbom kliničkih i laboratorijskih testovima.

Prije nego što su započeti pregledi ispitanika, istraživač je kalibriran za KEP indeks, KEP indeks po plohi zuba i FMPS indeks. Budući da ne postoji zlatni standard za detekciju karijesa [201], kalibracija je provedena provođenjem dvaju pregleda na 10 ispitanika u vremenskom razmaku od 2 tjedna (prikupljeni podaci nisu korišteni u istraživanju). Pouzdanost istraživača je utvrđena

izračunavanjem kappa vrijednosti koja je iznosila 0.84 za DMFT i DMFTs indeks i 0,92 za FMPS indeks.

Klinički pregledi provedeni su u jutarnjim satima (8.00-10.00) u sklopu kojih su prikupljeni i uzorci plaka za analizu sastava mikrobioma. Pregledi su učinjeni uz standardno osvjetljenje stomatološke jedinice. Uvjeti suhog radnog polja održavani su kombinacijom sisaljke, kirurškog aspiratora i postavljanjem svitaka staničevine. Instrumentarij korišten prilikom izvođenja kliničkih pregleda sastojao se od pusteru, stomatološkog zrcala i sonde zaobljenog vrha. Klasifikacija karijesnih lezija učinjena je prema WHO kriterijima, a za dijagnostiku korištene su vizualna i taktilna metoda detekcije lezija. Lezije su klasificirane kao „karijes“ ako je detektirana prisutnost kavitacije. Inicijalne karijesne lezije nisu klasificirane kao „karijes“ zbog njihove reverzibilne prirode i mogućnosti da se u u kliničkim uvjetima previde.

Prethodno karijes iskustvo procijenjeno je putem DMFT indeksa koji je izračunat prema dentalnom statusu ispitanika [133]. Referentne vrijednosti KEP indeksa za populaciju procijenjene su prema dostupnim podacima epidemioloških istraživanja za pripadajuću populaciju [20, 202]. Značajno odstupanje KEP indeksa ispitanika od referentnih vrijednosti smatralo se ako je iznosilo >5%.

Stupanj nakupljanja plaka procijenjen je pomoću FMPS indeksa, prema kojem je određen udio zubnih ploha prekrivnim dentalnim biofilmom [203].

Količina sline procijenjena je putem testa quantum stimulirane salivacije. Ispitanicima je radi stimulacije sline dano da žvaču kockicu pH neutralnog parafina veličine 10mm x 10mm x 10mm kroz 30 sekundi nakon čega su bili instruirani da skupljaju slinu u graduiranu sterilnu epruvetu tijekom 5 minuta [141]. Prikupljeni uzorak sline je iskorišten za utvrđivanje salivarnog pH uz pomoć pH indikatorskih trakica s rasponom pH 4.0 -7.0 (Merck KGA, Darmstadt, Njemačka) [204]

Sadržaj prehrane je procijenjen određivanjem salivarne razine *Lactobacillus spp.* zbog dobre korelacije s količinom unesenih ugljikohidrata [205]. Prisutnost kariogenih bakterija je procijenjena određivanjem salivarne razine *S. mutans*. Oba parametra određena su uzorkovanjem 1 ml sline te izradom i nasađivanjem deseterostrukih razrjeđenja uzorka na hranjive podloge Mitis salivarius agar s bacitracinom i Rogosa SL agar. Rezultati su izraženi u CFU/ml sline [140].

Stupanj pridruženih bolesti procijenjen je kroz anamnezu i intervjuiranjem pacijenta. Pacijenti koji su u anamnezi naveli da su zdravi uvršteni su u kategoriju 0- zdrava osoba, pacijenti koji su naveli

jednu dijagnozu u 1-blagi stupanj pridruženih bolesti, a pacijenti koji su naveli dvije ili više dijagnoza u 2-težak stupanj pridruženih bolesti. Broj obroka u danu i program fluoridacije također su utvrđeni putem intervjua s ispitanicima.

Čimbenik Kliničke prosudbe izostavljen je iz Cariogram analize zbog svoje subjektivnosti, a stupnjevi rizika za populaciju i zemlju (geografsku zonu) boravka su postavljeni na standardnu razinu.

Dobiveni rezultati analize koji su izraženi u vidu šansi, odnosno postotaka (%), pretvoreni su u decimalni oblik radi statističke analize podataka.

Statistička obrada podataka

Statistička obradba podataka je provedena uz pomoć statističkog programa IBM SPSS Statistics 29 (IBM, New York, SAD). Odabir mjera centralne tendencije i mjera varijabilnosti za ispitivane varijabli čije vrijednosti pripadaju u intervalnu mjernu ljestvicu dob utvrđena je pomoću Kolmogorov-Smirnovljeva testa. Podaci s normalnom raspodjelom prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD), podaci koji nemaju normalnu raspodjelu prikazani su medijanom i percentilama (5ta-95ta percentila). Podaci koji pripadaju u ordinalnu ili nominalnu mjernu ljestvicu prikazani su frekvencijama i postotnim udjelima. Komparativne statističke analize provedene su jednosmjernom analizom varijanci (one-way ANOVA), Mann-Whitneyevim i Kruskal-Wallisovim testom za podatke intervalne mjerne ljestvice te Chi kvadrat testom, Fisherovim egzaktnim testom i t-testom razlike proporcija za podatke omjerne i nominalne mjerne ljestvice. Korelacije između prikupljenih podataka učinjene su metodom Spearmanove korelacije. U svim testovima rezultati su smatrani statistički značajnima na razini $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Kliničke karakteristike pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Od 69 sudionika koji su sudjelovali u ovom istraživanju, 60 je bilo ženskog, a 9 muškog spola. Svaka ispitivana skupina sastojala se od 20 (87%) ženskih i 3 (13%) muška ispitanika. Ispitani uzorak sačinjavali su uglavnom mlađi ispitanici (medijan godina 29, IQR 24-45). U tablici 4.1 je prikazana deskriptivna statistika prikupljenih podataka koji se tiču dobi, navika pušenja te protektivnih i rizičnih čimbenika za nastanak karijesa korištenih u Cariogram analizi.

Tablica 4.1. Deskriptivna statistika kliničkih karakteristika prikupljenog uzorka

Varijabla	N	Aritmetička sredina $\pm$ Standardna devijacija	Medijan	Interkvartilni raspon(IQR)	Minimum	Maksimum
Dob	69	35,5 $\pm$ 12,9	29	24-45	21	61
Godine pušačkog staža	46	7,8 $\pm$ 7,7	5	3-8,5	1	30
Prosječan dnevni broj konzumiranih cigareta/duhanskih umetaka	46	10,5 $\pm$ 6,4	9,5	5-15,5	1	30
KEP	69	9,7 $\pm$ 6,5	9	5,5-14	0	26
KEP po plohi zuba	69	23,1 $\pm$ 23,9	14	6,5-29,5	0	107
Brojnost <i>S. mutans</i> u slini (log (CFU/ml))	69	3,60 $\pm$ 1,36	3,36	2,67 -4,14	1,15	6,89
Brojnost <i>Lactobacillus spp.</i> U slini (log (CFU/ml))	69	3,99 $\pm$ 1,65	4,30	2,82 – 5,22	0	6,95
Stupanj nakupljanja dentalnog biofilma (FMPS)	69	0,47 $\pm$ 0,20	0,45	0,31 – 0,63	0,09	0,88
Kvantum stimulirane salivacije (ml/min)	69	0,46 $\pm$ 0,17	0,44	0,32 – 0,6	0,1	0,8
pH sline	69	6,57 $\pm$ 0,39	6,5	6,1 – 7	5,8	7

4.2 Stupanj edukacije, program fluoridacije, prehrambene navike i prisutnost sustavnih bolesti

Među ispitivanim skupinama nisu pronađene značajne razlike u stupnju edukacije iako su ispitanici u skupinama pušača uglavnom imali srednjoškolsko obrazovanje (57% i 70%) dok su nepušači imali više stupnjeve obrazovanja. Značajne razlike u prosječnom broju dnevnih obroka također nisu detektirane iako su nepušači pokazivali tendenciju da konzumiraju više obroka od pušača. Nepušači su također pokazali sklonost da češće koriste više izvora fluoridacije nego skupine pušača. Prevalencija sustavnih bolesti među ispitivanim skupinama je bila približno podjednaka (74% pušača THS, 83% pušača cigareta i 83% nepušača u anamnezi nisu naveli niti jednu sustavnu bolest). Podaci su detaljno opisani u tablici 4.2.

Tablica 4.2. Stupanj obrazovanja, programi fluoridacije, broj obroka u danu i sustavne bolesti pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Varijabla		Skupina					
		Pušači THS	Pušači cigareta	Nepušači	Ukupno	p	V*
Stupanj obrazovanja	Srednja škola	13 (57%)	16 (70%)	8 (35%)	37 (54%)	0,058	0,288
	Prijediplomski studij ili više	10 (44%)	7 (30%)	15 (65%)	32 (46%)		
Program fluoridacije	Samo zubna pasta s fluoridima	22 (96%)	22 (96%)	21 (91%)	65 (94%)	0,767	0,088
	Zubna pasta s fluoridima + dodatni izvori fluorida	1 (4%)	1 (4%)	2 (9%)	4 (%)		
Prosječan broj obroka u danu	0-3	16 (70%)	15 (65%)	9 (39%)	40 (58%)	0,077	0,272
	4+	7 (30%)	8 (35%)	14 (61%)	29 (42%)		
Prisutnost sustavnih bolesti	Zdravi	17 (74%)	19 (83%)	19 (83%)	55 (80%)	0,699	0,102
	Boluju od barem 1 sustavne bolesti	6 (26%)	4 (17%)	4 (17%)	14 (20%)		

*veličina učinka procijenjena pomoću Cramerovog V uz χ^2 test.

4.3 Navike pušenja

Pušači cigareta imali su značajno dulji pušački staž od pušača THS-a uz jako veliku veličinu učinka (medijan 8 godina, IQR 6-21 naspram medijan 3 godine, IQR 2-5 godina, $p < 0,001$; $r = 0,708$). Prosječan dnevni broj konzumiranih cigareta/duhanskih umetaka nije se značajno razlikovao između skupina pušača, iako su pušači THS-a pokazali tendenciju da konzumiraju manje duhanskih umetaka nego pušači cigareta (medijan 8 duhanskih umetaka, IQR 5-17 naspram medijan 10 cigareta, IQR 6-15). Podaci su detaljno prikazani u tablici 4.3.

Tablica 4.3. Navike pušenja pušača THS-a i pušača cigareta

Variable (medijan (Interkvartilni raspon))	Skupina		p	r*
	Pušači THS-a	Pušači cigareta		
Godine pušačkog staža	3 (2-5)	8 (6-21)	<0,001	0,708
Prosječan dnevni broj konzumiranih cigareta/duhanskih umetaka	8 (5-17)	10 (6-15)	0,068	0,031

*veličina učinka uz Mann-Whitney test

4.4 Kliničke karakteristike

Podaci o kliničkim karakteristikama koje su značajne za razvoj karijesnih lezija prikazani su u tablici 4.4.

Tablica 4.4. Kliničke karakteristike pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Varijabla (medijan (Interkvartilni raspon))	Skupina			p	χ^2 *
	Pušači THS	Pušači cigareta	Nepušači		
KEP	8 (6-13)	11(6-14)	9 (3-14)	0,666	0,012
KEP po plohi zuba	12 (7-31)	21 (11-35)	14 (4-25)	0,451	0,023
Brojnost <i>S. mutans</i> u slini (log (CFU/ml))	3,18 ^a (1,94-3,66)	3,95 ^b (3,56-4,89)	2,96 ^a (2,56-3,69)	<0,001	0,248
Brojnost <i>Lactobacillus spp.</i> U slini (log (CFU/ml))	2,60 ^a (1,70 - 3,77)	4,34 ^b (2,95 - 5,00)	5,30 ^b (4,30 - 5,89)	<0,001	0,365
Stupanj nakupljanja dentalnog biofilma (FMPS)	0,48 (0,36-0,69) ^{ab}	0,51 (0,38-0,63) ^b	0,39 (0,20-0,51) ^a	0,034	0,099
Kvantum stimulirane salivacije (ml/min)	0,35 (0,24 - 0,42) ^a	0,44 (0,35 – 0,52) ^a	0,63 (0,55 – 0,70) ^b	<0,001	0,386
pH sline	6,5 (6,1-7,0) ^a	6,5 (6,1 – 6,8) ^a	7,0 (6,5 – 7,0) ^b	0,009	0,138

*Veličina učinka uz Kruskal-Wallis test

Skupine koje nemaju isto slovo u eksponentu pojedine varijable se statistički značajno razlikuju prema post-hoc Mann-Whitney testu uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe

Skupine se nisu razlikovale u indeksima koje opisuju prethodno karijes iskustvo (KEP i KEP po plohi zuba). Značajne razlike su pronađene u kvantumima sekrecije stimulirane sline, brojnosti laktobacila i *S.mutans* u slini, pH sline i stupnju nakupljanja dentalnog biofilma (Tablica 4.4).

Kvantum salivacije je bio značajno veći u nepušača naspram skupina pušača cigareta i THS-a uz umjerene veličine učinka ($p=0,012$; $r=0,420$ i $r=0,370$), dok se skupine pušača nisu međusobno značajno razlikovale (Tablica 4.4).

Brojnost laktobacila u slini pušača cigareta bila je značajno manja u pušača THS-a nego u pušača cigareta i nepušača iz velike veličine učinka ($p<0,001$; $r=0,671$ i $r=0,562$). Skupine pušača cigareta i nepušača nisu se značajno razlikovale u brojnosti laktobacila u slini (Tablica 4.4).

Pušači cigareta su imali značajno veću brojnost bakterije *S. Mutans* u slini nego skupine pušača THS-a i nepušača uz velike veličine učinka ($p < 0,001$; $r = 0,520$ i $r = 0,518$). Značajne razlike nisu pronađene između skupina pušača THS-a i nepušača (Tablica 4.4).

Razina pH sline je bila značajno veća u skupini nepušača naspram skupina pušača THS-a i cigareta uz umjerenu veličinu učinka ($p = 0,012$; $r = 0,420$ i $r = 0,370$) (Tablica 4.4).

Pušači cigareta pokazali su najveći stupanj akumulacije dentalnog biofilma, koji je bio značajno veći od skupine nepušača ($p = 0,015$; $r = 0,360$), ali ne od skupine pušača THS-a. Skupina pušača THS-a i nepušača nisu se značajno razlikovale u stupnju nakupljanja biofilma (Tablica 4.4).

4.5 Procjena rizika za razvoj karijesnih lezija Cariogram metodom

Šanse za izbjegavanje nastanka karijesnih lezija i rizičnosti za nastanak novih karijesnih lezija ispitivanog uzorka prikazane su u tablici 4.5.

Tablica 4.5. Deskriptivna statistika šansi za izbjegavanje nastanka i nastanak novih karijesnih lezija prikupljenog uzorka

Varijabla	N	Aritmetička sredina $\pm$ Standardna devijacija	Medijan	Interkvartilni raspon(IQR)	Minimum	Maksimum
Cariogram, šanse za izbjegavanje nastanka novih karijesnih lezija	69	$0,70 \pm 0,22$	0,78	0,64 – 0,84	0,04	0,99
Cariogram, šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog okolnosti	69	$0,03 \pm 0,02$	0,05	0,02 – 0,05	0	0,09
Cariogram, šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog bakterija	69	$0,10 \pm 0,09$	0,08	0,04 – 0,11	0	0,39
Cariogram, šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog podložnosti organizma	69	$0,11 \pm 0,15$	0,04	0,03 - 0,11	0	0,82
Cariogram, šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog prehrambenih navika	69	$0,06 \pm 0,06$	0,03	0,01 - 0,10	0	0,27

Rezultati usporedbe Cariogram analiza ispitivanih skupina prikazani su tablici 4.6.

Tablica 4.6. Šanse za izbjegavanje i nastanak karijesnih lezija u pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

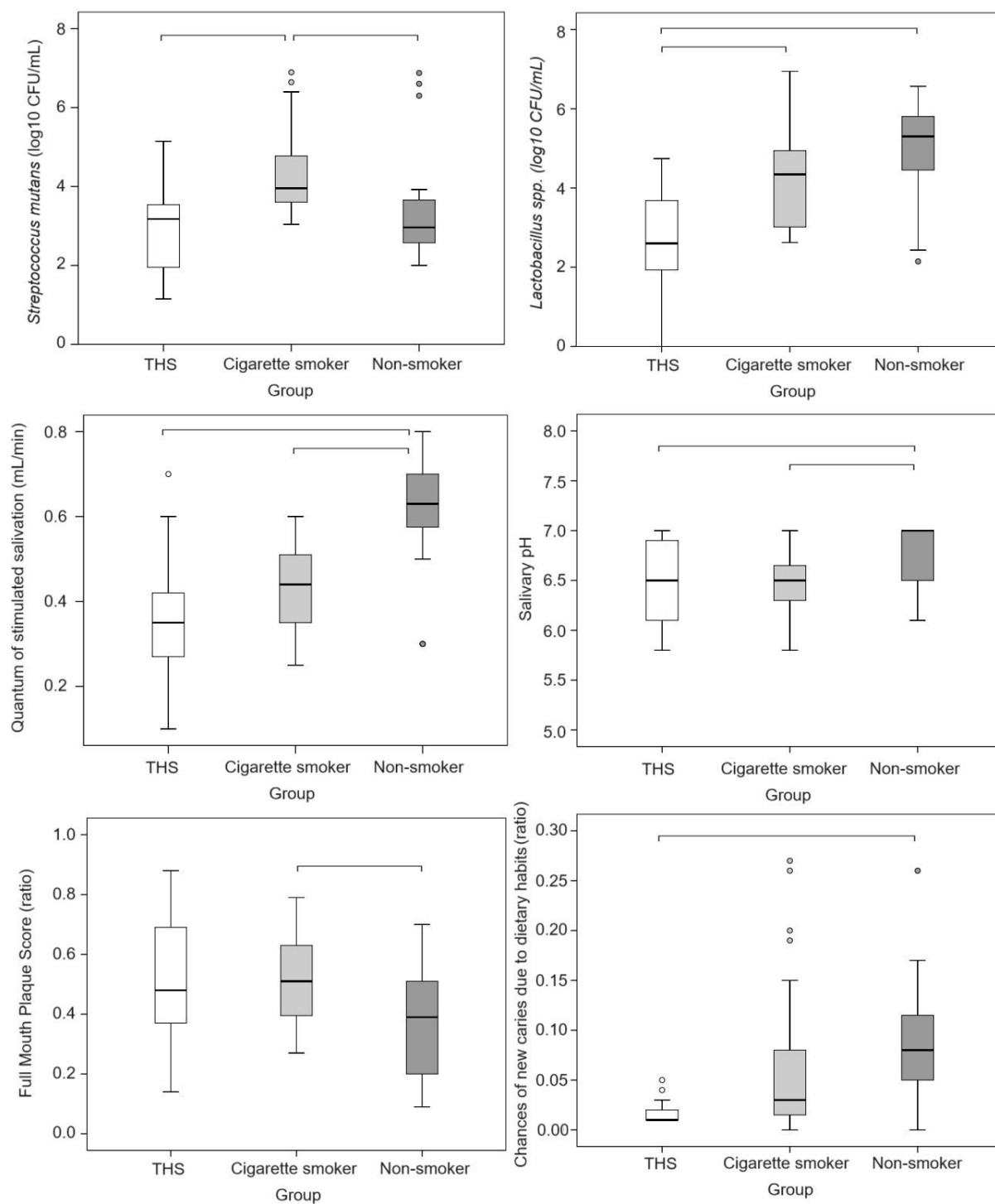
Variable (medijan (Interkvartilni raspon))	Skupina			p	ϵ^2 *
	Pušači THS	Pušači cigareta	Nepušači		
Cariogram, šanse za izbjegavanje nastanka novih karijesnih lezija	0,78 (0,64 - 0,88)	0,78(0,44 - 0,86)	0,79 (0,68 – 0,87)	0,675	0,012
Cariogram, šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog okolnosti	0,02 (0,02 – 0,05)	0,03 (0,02 – 0,04)	0,02 (0,02 – 0,06)	0,828	0,006
Cariogram, šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog bakterija	0,07 (0,05 – 0,11)	0,09 (0,07 - 0,12)	0,07 (0,04 – 0,11)	0,223	0,044
Cariogram, šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog podložnosti organizma	0,07 (0,02, – 0,28)	0,06 (0,03 – 0,11)	0,03 (0,03 – 0,05)	0,166	0,053
Cariogram, šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog prehrambenih navika	0,01 (0,01 – 0,02) ^a	0,03 (0,01 – 0,10) ^b	0,08 (0,04 – 0,12) ^a	<0,001	0,246

* Veličina učinka uz Kruskal-Wallis test.

Skupine koje nemaju isto slovo u eksponentu pojedine varijable se statistički značajno razlikuju prema post-hoc Mann-Whitney testu uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe

Usporedba Cariogram analiza otkrila je značajno veće šanse za nastanak novih karijesnih lezija zbog prehrambenih navika među ispitivanim skupinama ($p < 0,001$), u ostalim elementima Cariogram analize skupine se nisu razlikovale. Skupina nepušača je imala značajno veće šanse za razvoj novih karijesnih lezija od skupine pušača cigareta uz veliku veličinu učinka ($p < 0,001$; $r = 0,607$), ali ne i od skupine pušača THS-a (Tablica 4.6).

Kliničke karakteristike i elementi Cariogram analize koji se statistički značajno razlikuju među ispitivanim skupinama grafički su prikazane na slici 4.1.

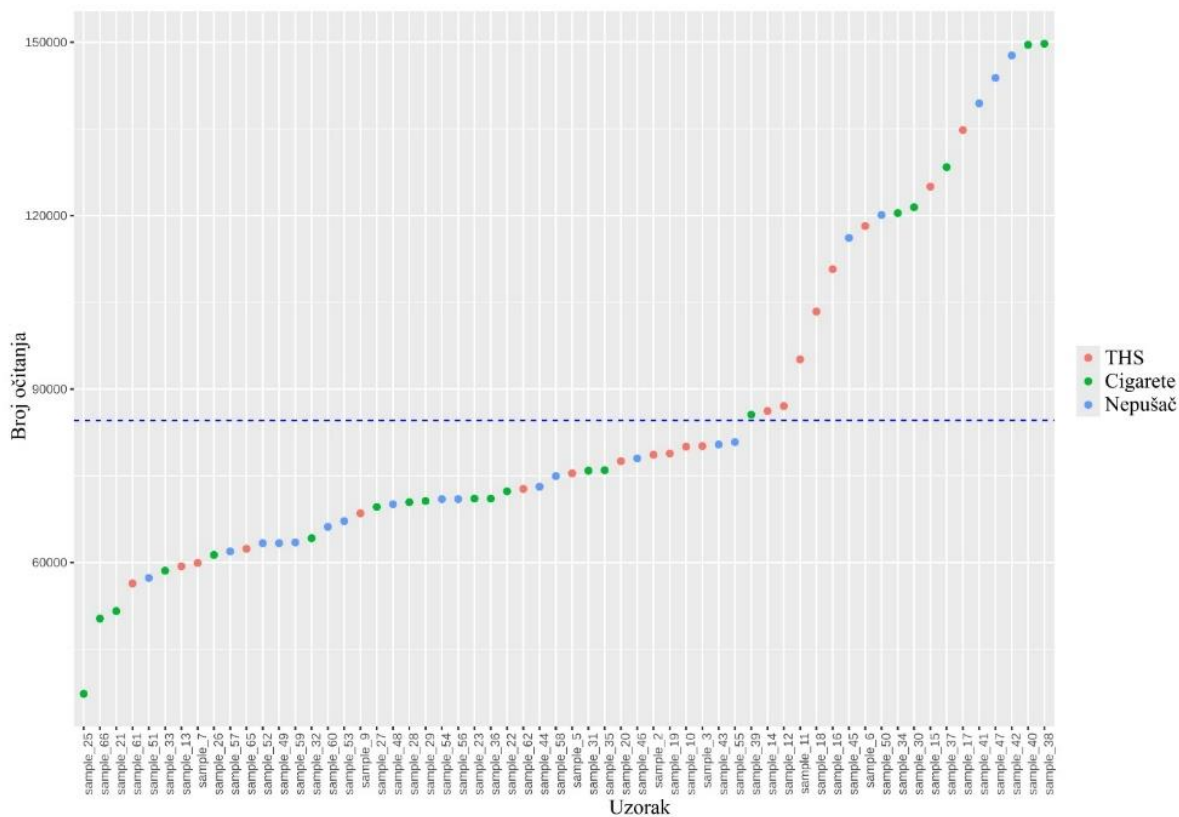


Slika 4.1. Značajne razlike u kliničkim karakteristikama i Cariogram analizi među skupinama pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

4.6 Analiza bakterijskog sastava mikrobioma

4.6.1 Analiza ASV sekvenci

Podaci o broju ASV očitavanja prikazani su na slici 4.2 i tablici 4.7.



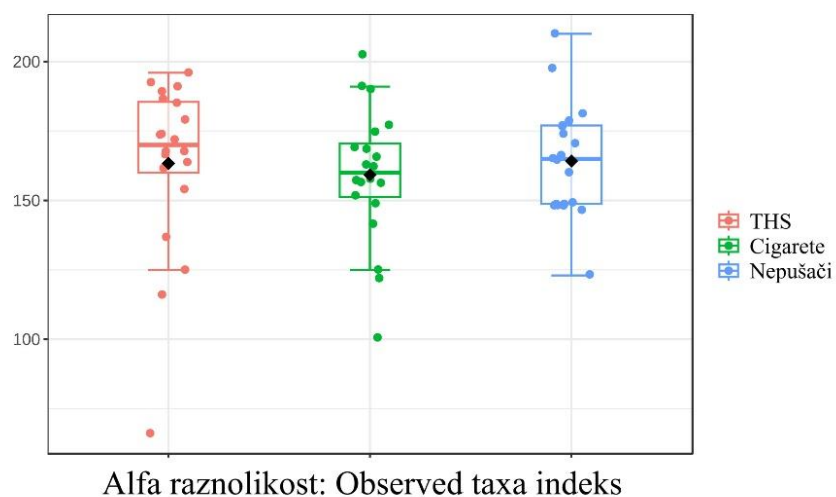
Slika 4.2 Broj očitanih ASV sekvenci u ispitivanim uzorcima

Tablica 4.7. Broj ASV sekvenci u analiziranim uzorcima

Ukupan broj očitanih ASV sekvenci	5074107
Prosječan broj očitanih ASV sekvenci po uzorku	84568
Maksimalan broj očitanih ASV sekvenci u uzorku	149700
Minimalan broj očitanih ASV sekvenci u uzorku	37286

4.6.2 Alfa raznolikost

Alfa raznolikost je testirana pomoću observed taxa indeksa na taksonomskoj razini vrste. Prosječne vrijednosti observed taxa indexa izražene mjerama aritmetičke sredine i standardne devijacije $163,25 \pm 31,67$ u skupini pušača THS-a; iznosile su $159,35 \pm 24,22$ u skupini pušača cigareta i $164,2 \pm 20,37$ u skupini nepušača. Razlike između ispitivanih skupina testirane su Mann-Whitneyevim/Kruskal-Wallisovim testom unutar MicrobiomeAnalyst platforme, a statistički značajne razlike između ispitivanih skupina nisu pronađene ($p = 0.489$).



Slika 4.3. Usporedba alfa raznolikosti mikrobioma pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

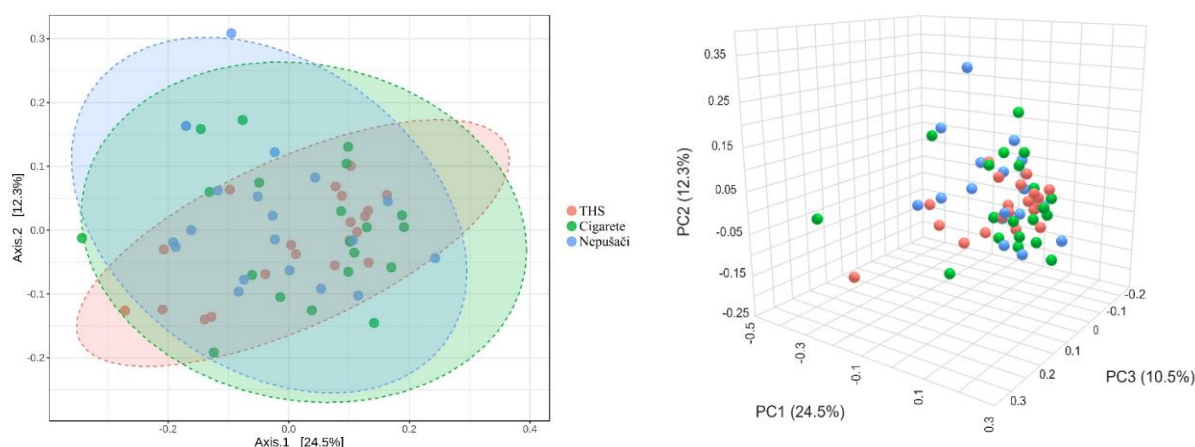
4.6.3 Beta raznolikost

Beta raznolikost procijenjena je putem Bray-Curtis indeksa na taksonomskoj razini vrste pri čemu je *Principal Coordinate analysis* (PCoA) korištena kao ordinacijska metoda, a PERMANOVA analiza je korištena za testiranje statističke značajnosti razlika između skupina. Statistički značajne razlike između skupina nisu pronađene, a rezultati PERMANOVA analize su prikazani u tablici 4.8.

Tablica 4.8. Rezultati PERMANOVA analize – Beta raznolikost u ispitivanim skupinama izražena kroz Bray-Curtis indeks

Test	F	R ²	p
THS - Cigarette	0,54793	0,014214	0,911
THS-Nepušači	1,3695	0,034789	0,169
Cigareta - Nepušači	1,2533	0,031928	0,217

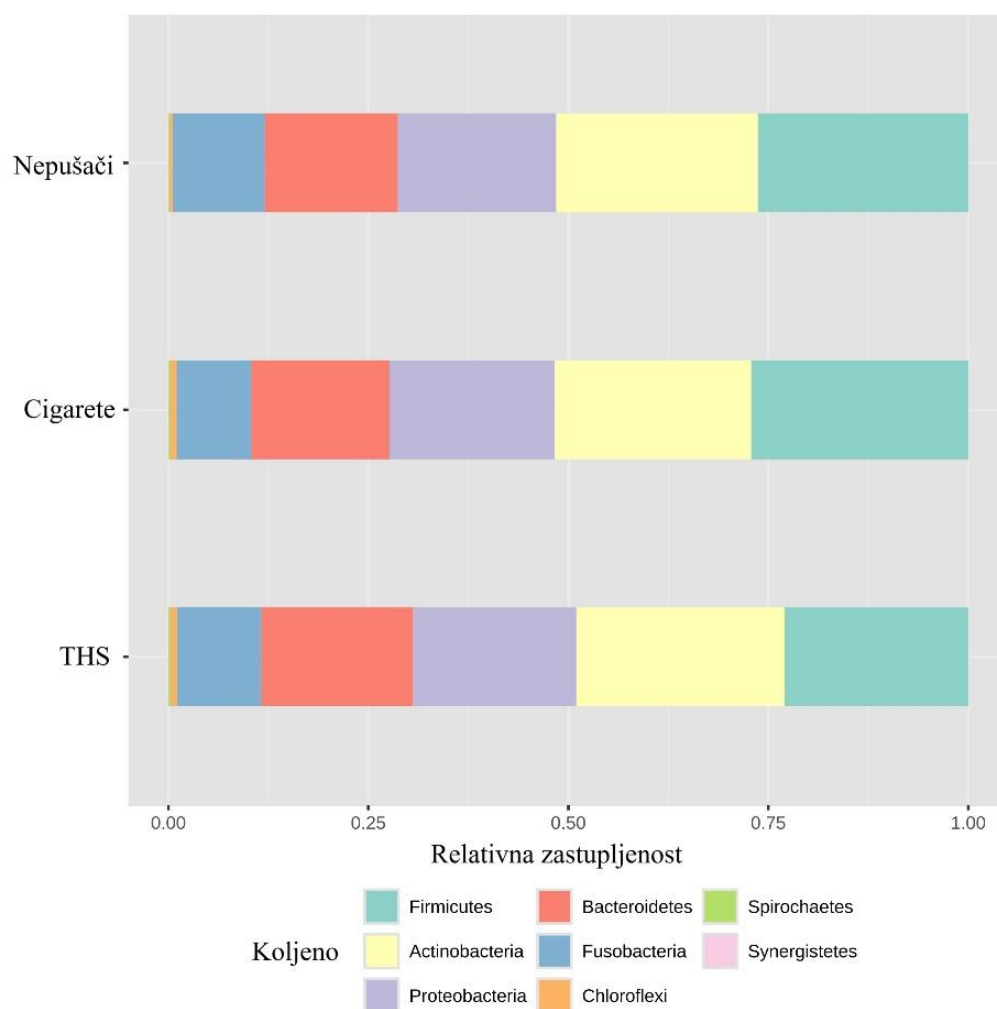
Na slikama 4.4a i 4.4b su prikazani 2D i 3D grafički prikazi Beta raznolikosti procijenjene pomoću Bray-Curtis indeksa. Međusobna udaljenost između ispitivanih uzoraka utvrđena je pomoću PcoA analize. Udaljenost između uzoraka testirana je PERMANOVA analizom (F-vrijednost: 1.0512; R²:0.035571; p=0.35)



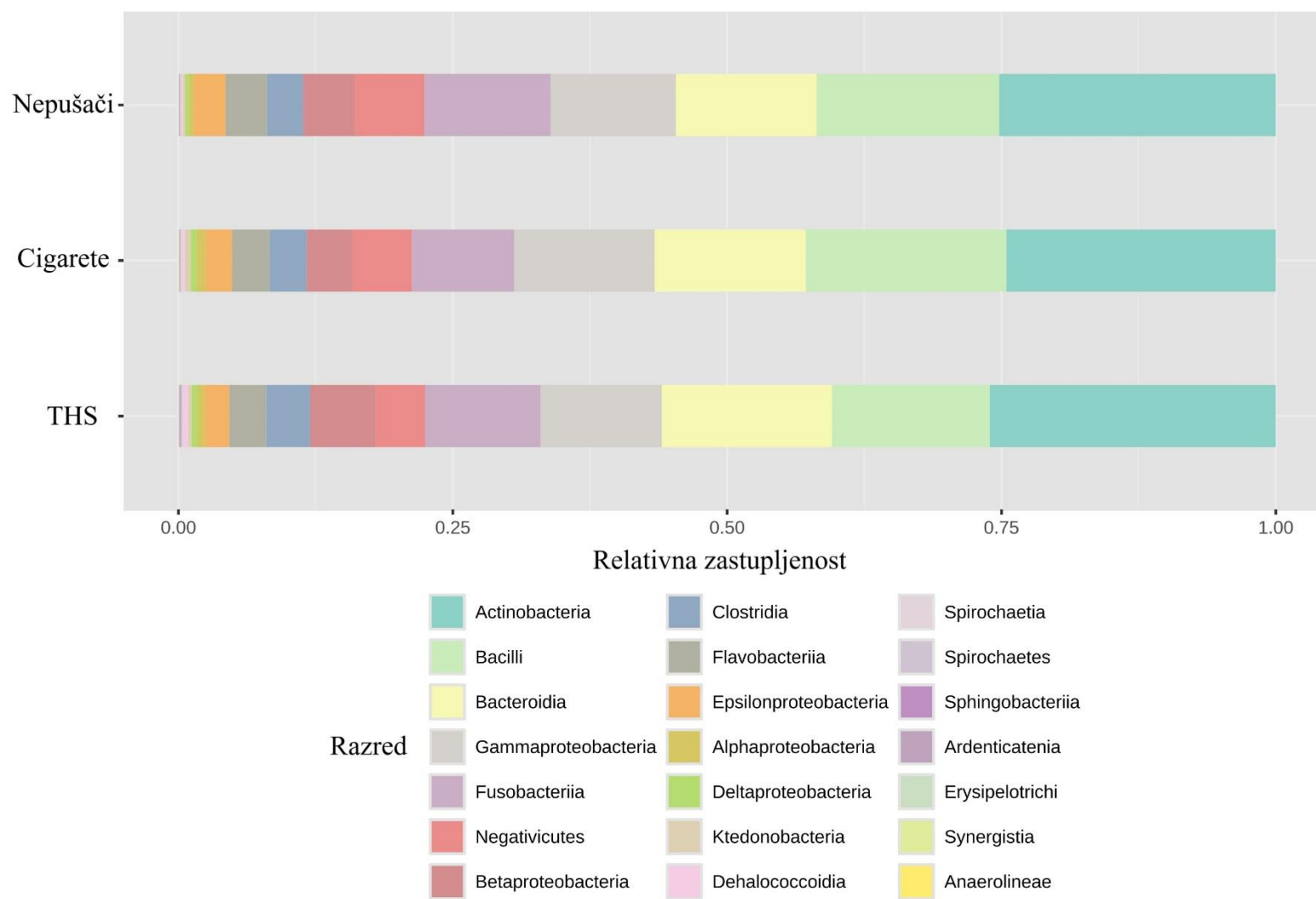
Slike 4.4a (lijevo) i 4.4b (desno). 2D i 3D prikaz Beta raznolikosti između ispitivanih skupina na taksonomskoj razini vrste

4.6.4 Bakterijska raznolikost na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji

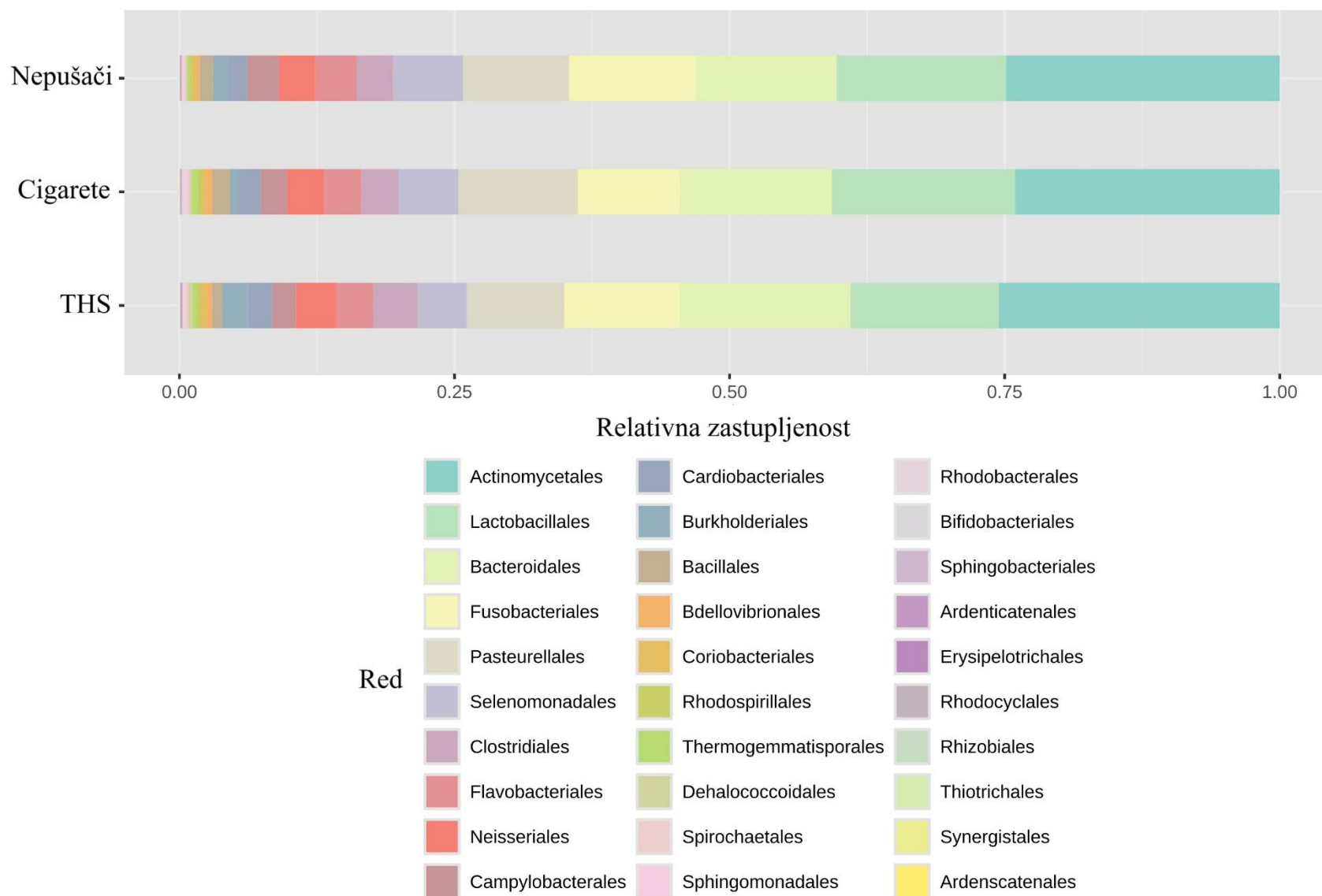
Bioinformatičkom analizom utvrđena je prisutnost ukupno 8 bakterijskih koljena, 21 bakterijskih razreda, 30 bakterijskih redova i 52 bakterijske obitelji. Relativna zastupljenost bakterija po taksonomskim razinama prikazana je na slikama 4.5, 4.6, 4.7 i 4.8.



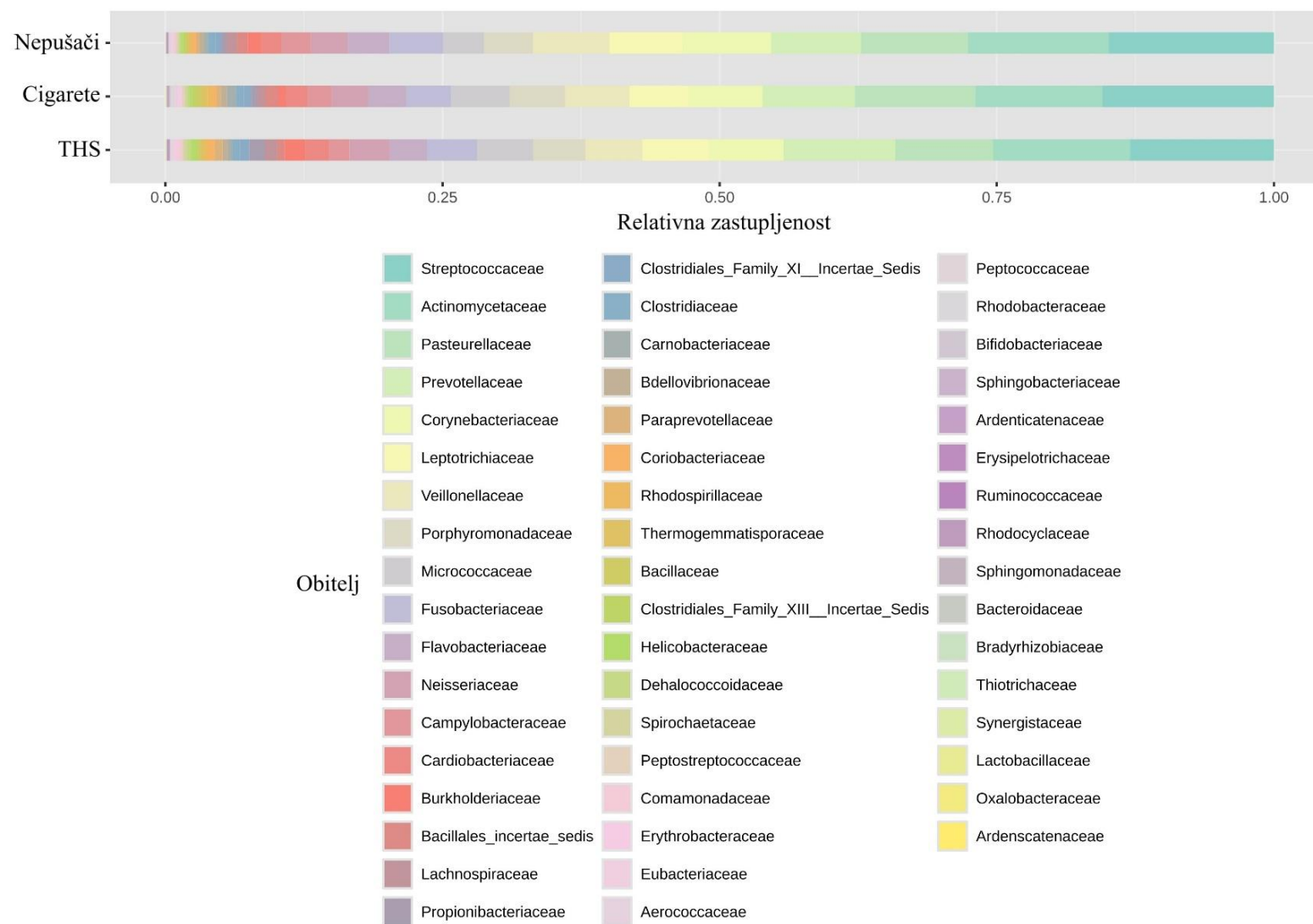
Slika 4.5. Detektirana bakterijska koljena u ispitivanim skupinama



Slika 4.6. Detektirani bakterijski razredi u ispitivanim skupinama

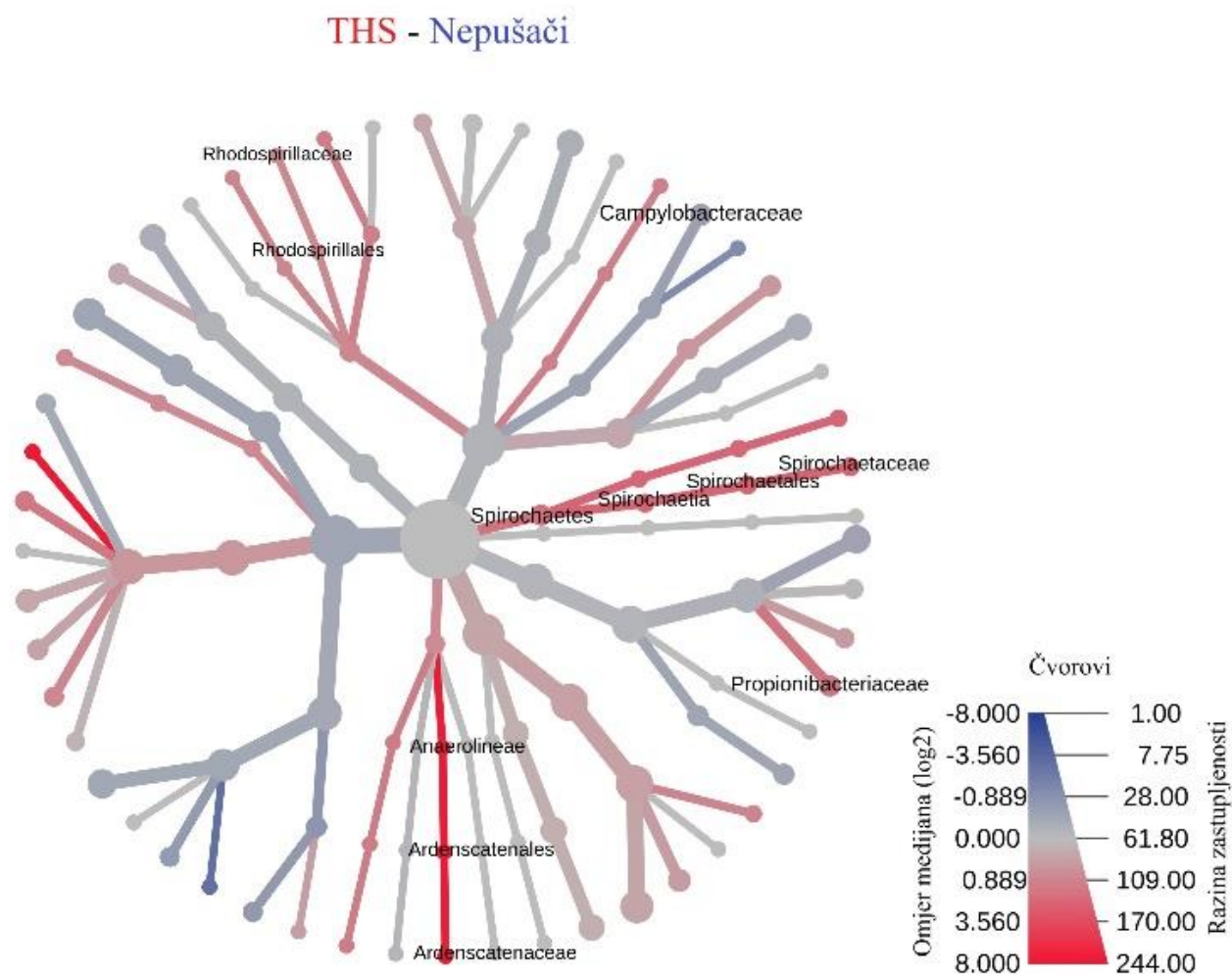


Slika 4.7. Detektirani bakterijski redovi u ispitivanim skupinama



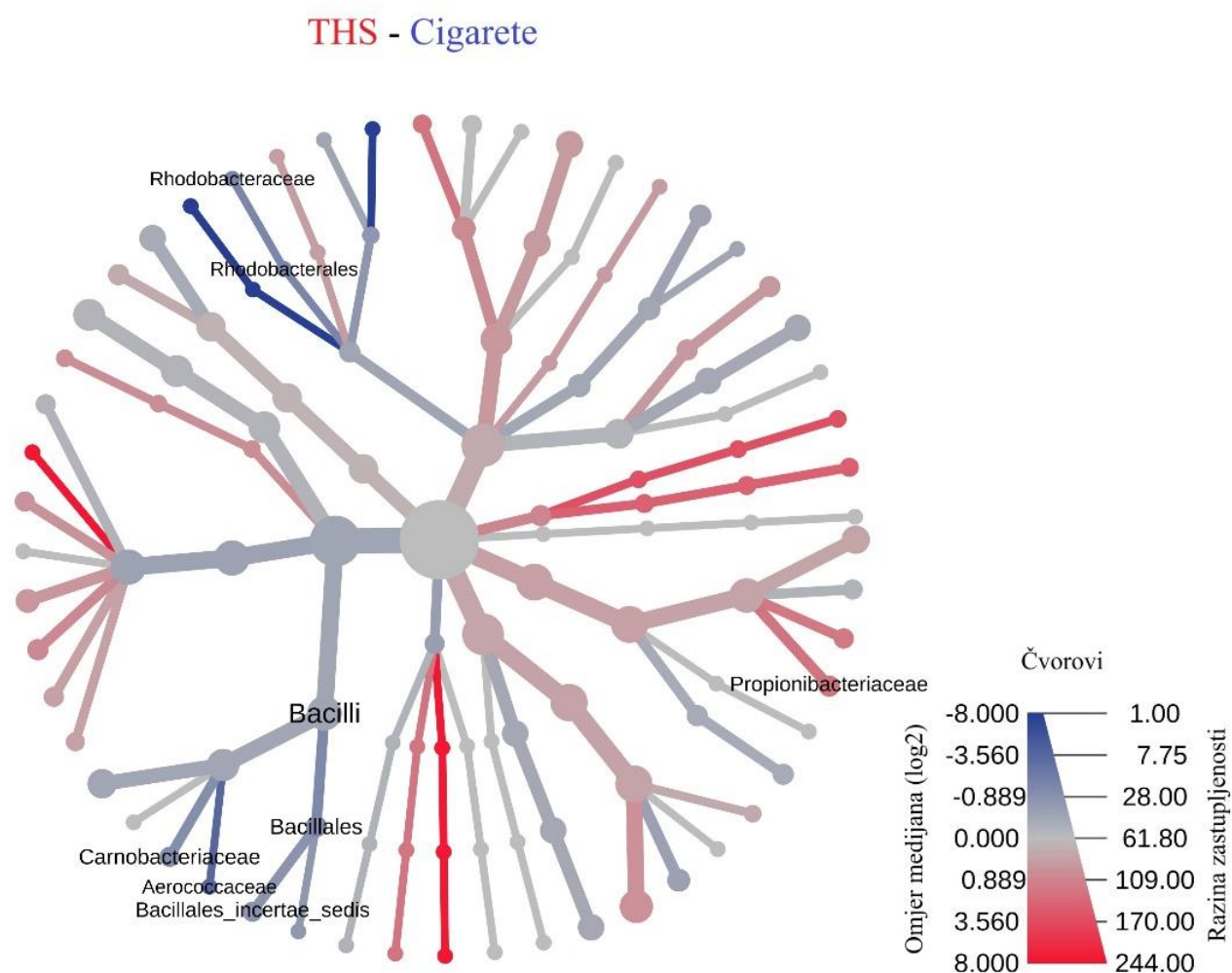
Slika 4.8. Detektirane bakterijske obitelji u ispitivanim skupinama

Razlike u bakterijskoj zastupljenosti na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji između ispitivanih skupina ispitivane su Heat tree analizama koje se temelje na Wilcoxon Rank Sum testu ($p < 0.05$). Rezultati analiza prikazani su u grafičkom obliku (slike 4., 4.10 i 4.11). Grafikoni se sastoje od čvorova koji predstavljaju taksonomske razine i linija koje ih hijerarhiski povezuju. Intenzitet boja u grafikonima predstavlja povećanu bakterijsku zastupljenost na određenoj taksonomskoj razini u skupini kojoj je boja dodijeljena. Bakterijske taksonomske razine na kojima su pronađene statistički značajne razlike ($p < 0.05$) u grafikonima su istaknute tekstom.



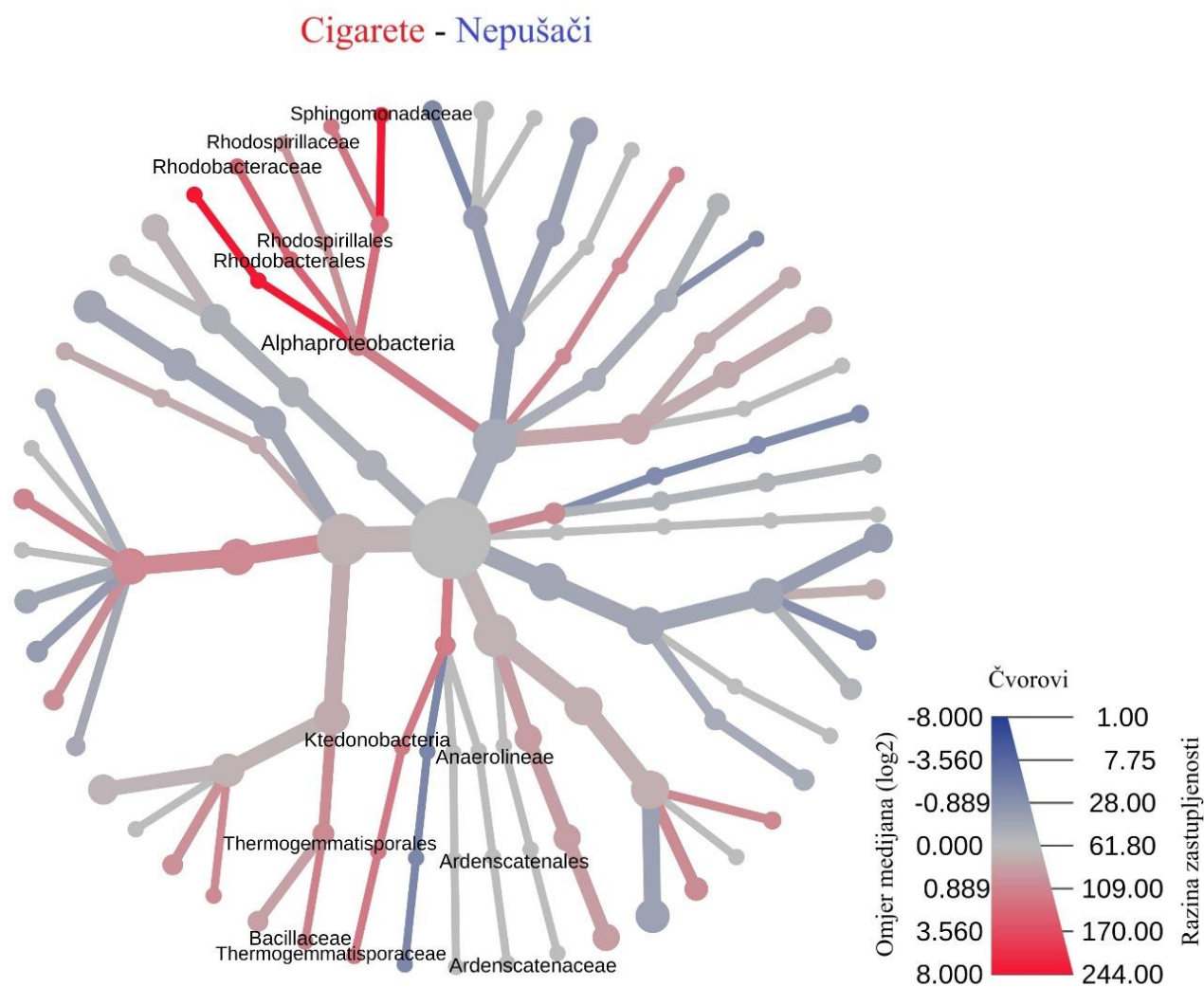
Slika 4.9. Razlike u bakterijskoj zastupljenosti na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji između skupina pušača THS-a i Nepušača.

U skupini pušača THS pronađena je značajno veća zastupljenost bakterijskog roda *Spirochaetas*, bakterijskih razreda *Spirochaetia* i *Anaerolineae*, bakterijskih redova *Spirochaetales*, *Ardenscatenales* i *Rhodospirillales*, te bakterijskih obitelji *Spirochaetaceae*, *Ardeascatenaceae*, *Rhodospirillaceae* i *Propionibacteriaceae* nego u skupini nepušača. Obitelj *Campylobacteraceae* bila je zastupljenije u skupini nepušača.



Slika 4.10. Razlike u bakterijskoj zastupljenosti na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji između skupina pušača THS-a i pušača cigareta.

Između skupina pušača THS-a i pušača cigareta nisu pronađene značajne razlike u bakterijskoj zastupljenosti na razini koljena. Bakterijska raznolikost bila je značajno povećana u skupini pušača cigareta u obitelji *Bacilli*, u razredima *Bacillales* i *Rhodobacterales* te u obiteljima *Carnobacteriaceae*, *Aerococcaceae*, *Rhodobacteraceae* i nejasno detektirane obitelji koja pripada u red *Bacillales* nego u skupini pušača THS-a. Bakterijska raznolikost je bila povećana u skupini THS-a u bakterijskoj obitelji *Propionibacteriaceae*.



Slika 4.11. Razlike u bakterijskoj zastupljenosti na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji između skupina pušača cigareta i Nepušača.

U skupinama pušača cigareta i nepušača nisu pronađene statistički značajne razlike na razini bakterijskih koljena. U skupini pušača cigareta značajno je bila povećana raznolikost u razredima *Ktedonobacteria* i *Alphaproteobacteria*, dok je u skupini nepušača bila značajno povećana raznolikost u razredu *Anaerolineae*. U skupini pušača cigareta značajno je bila povećana raznolikost u redovima *Termogemmatissporales*, *Rhodobacterales* i *Rhodospirillales*, a u skupini nepušača značajno je bila povećana raznolikost u bakterijskom redu *Ardenscatenales*. Skupina pušača cigareta imala je značajno povećan stupanj bakterijske raznolikosti u obiteljima *Bacillaceae*, *Thermogemmatissporaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillaceae* i *Sphingomonadaceae*, dok je skupina nepušača imala značajno povećanu raznolikost u obitelji *Ardenscatenaceae*.

4.6.5 Bakterijska raznolikost na razini roda

Bioinformatičkom analizom ustanovljena je prisutnost ukupno 88 bakterijska roda u ispitivanim uzorcima. Detektirani bakterijski rodovi s njihovom razinom zastupljenosti u ispitivanim skupinama prikazani su u tablici 4.9. Rezultati su izraženi u vidu udjela (%) koji pojedini bakterijski rod zauzima unutar bakterijskog mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma.

Tablica 4.9 Zastupljenost bakterijskih rodova u skupinama pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

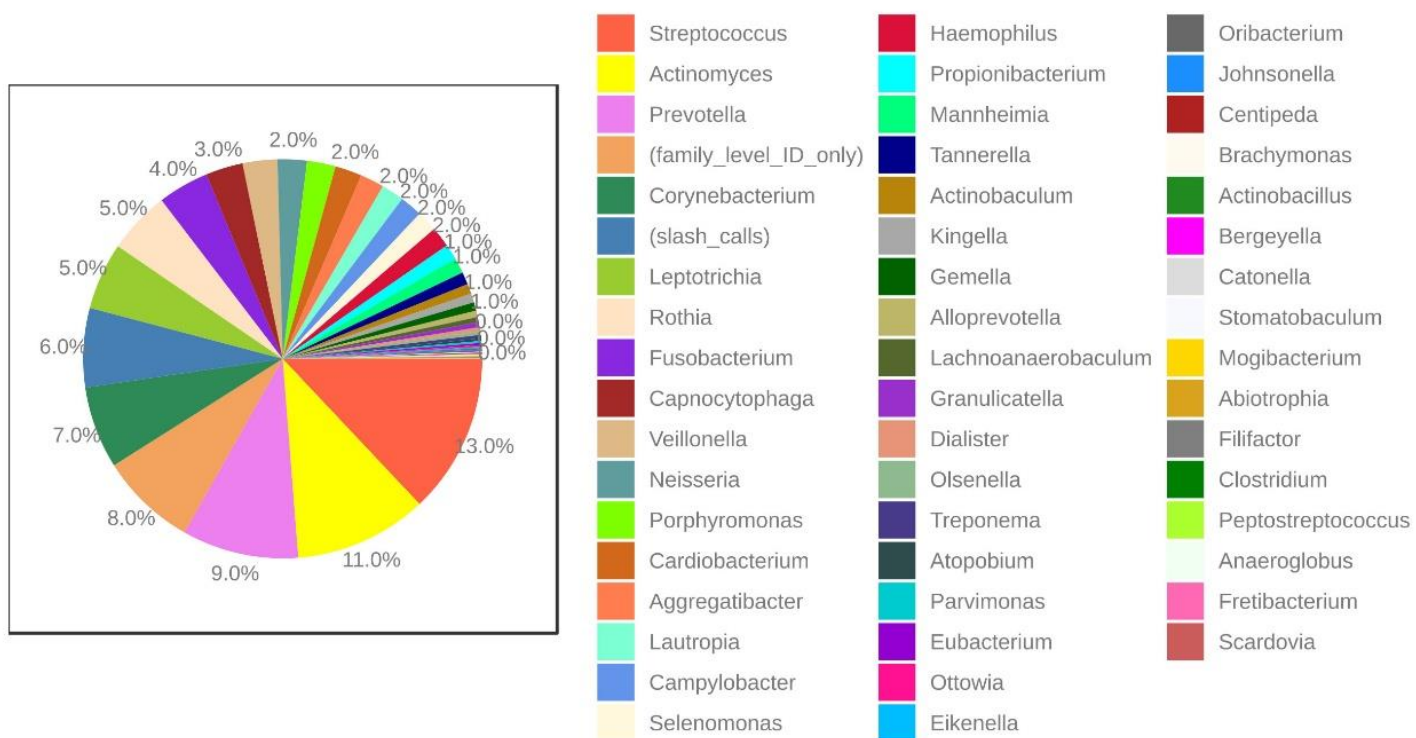
Rod	Pušači THS-a Aritm. Sredina (%)	Pušači THS-a Std. Dev. (%)	Pušači Cigaret a Aritm. Sredina (%)	Pušači Cigareta Std. Dev. (%)	Nepušač i Aritm. Sredina (%)	Nepušači Std. Dev. (%)	Veličin a učinka η^2	P vrijednos t Kruskal- Wallis
<i>Actinobaculum</i>	0,745	0,655	0,248	0,342	1,016	1,539	0,094	0,004
<i>Avibacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,193	0,398	0,135	0,015
<i>Alysiella</i>	0,016	0,045	0,002	0,006	0,000	0,000	0,073	0,016
<i>Propionibacterium</i>	1,198	1,413	0,570	0,643	0,439	0,486	0,111	0,025
<i>Haemophilus</i>	1,773	3,376	1,641	1,899	2,305	1,640	0,014	0,030
<i>Megasphaera</i>	0,004	0,015	0,012	0,031	0,000	0,000	0,055	0,052
<i>Campylobacter</i>	1,851	0,721	2,142	0,688	2,682	1,085	0,141	0,061
<i>Treponema</i>	0,358	0,378	0,250	0,318	0,167	0,214	0,060	0,070
<i>Kingella</i>	0,739	0,579	0,515	0,624	0,673	0,341	0,030	0,077
<i>Filifactor</i>	0,040	0,051	0,084	0,204	0,021	0,045	0,043	0,084
<i>Granulicatella</i>	0,380	0,365	0,695	0,581	0,407	0,234	0,104	0,108
<i>Centipeda</i>	0,091	0,114	0,045	0,080	0,080	0,100	0,037	0,109
<i>Tissierella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,019	0,063	0,131
<i>Vagococcus</i>	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000	0,000	0,069	0,131
<i>Moryella</i>	0,000	0,000	0,002	0,005	0,000	0,000	0,069	0,131
<i>Serratia</i>	0,000	0,000	0,004	0,013	0,000	0,000	0,056	0,131
<i>Abiotrophia</i>	0,049	0,095	0,325	0,631	0,091	0,116	0,095	0,141
<i>Lactobacillus</i>	0,025	0,095	0,059	0,219	0,082	0,160	0,020	0,169
<i>Bergeyella</i>	0,061	0,106	0,094	0,149	0,093	0,077	0,017	0,171
<i>Slackia</i>	0,001	0,004	0,010	0,022	0,003	0,008	0,088	0,179
<i>Selenomonas</i>	1,655	1,166	1,641	1,158	2,861	2,401	0,104	0,208
<i>Gemella</i>	0,615	0,442	1,121	0,861	0,998	0,939	0,071	0,218
<i>Bulleidia</i>	0,004	0,015	0,006	0,017	0,000	0,000	0,039	0,224
<i>Brachymonas</i>	0,084	0,133	0,009	0,019	0,008	0,015	0,172	0,235
<i>Ottowia</i>	0,147	0,235	0,016	0,037	0,017	0,034	0,164	0,237
<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0,371	0,480	0,174	0,188	0,322	0,329	0,054	0,245
<i>Otariodibacter</i>	0,238	1,036	0,798	1,637	0,701	1,338	0,031	0,259
<i>Eubacterium</i>	0,112	0,117	0,077	0,090	0,050	0,047	0,075	0,262
<i>Porphyromonas</i>	2,345	2,382	2,707	1,691	2,260	1,945	0,009	0,271
<i>Lautropia</i>	1,928	3,394	0,724	0,854	1,088	1,055	0,054	0,275
<i>Olsenella</i>	0,332	0,438	0,158	0,198	0,266	0,288	0,047	0,277
<i>Streptococcus</i>	12,613	4,771	14,252	5,247	14,527	6,810	0,022	0,323
<i>Rothia</i>	4,848	4,614	4,749	8,096	3,784	3,319	0,007	0,338
<i>Phocaeicola</i>	0,000	0,000	0,011	0,036	0,001	0,004	0,054	0,343
<i>Prevotella</i>	9,604	4,508	7,464	3,770	8,136	3,715	0,047	0,345
<i>Eggerthia</i>	0,002	0,010	0,000	0,000	0,006	0,021	0,029	0,355
<i>Xylanimicrobium</i>	0,001	0,003	0,001	0,003	0,000	0,000	0,030	0,355
<i>Mycoplasma</i>	0,000	0,000	0,001	0,005	0,003	0,010	0,040	0,355
<i>Parascardovia</i>	0,013	0,046	0,004	0,017	0,000	0,000	0,033	0,355
<i>Streptobacillus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,010	0,034	0,368

<i>Acinetobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,006	0,034	0,368
<i>Ralstonia</i>	0,001	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Bergeriella</i>	0,009	0,041	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Tessaracoccus</i>	0,002	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Ferrimonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Gallibacterium</i>	0,000	0,000	0,001	0,002	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Howardella</i>	0,000	0,000	0,001	0,002	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Desulfobulbus</i>	0,000	0,000	0,001	0,004	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Hylemonella</i>	0,000	0,000	0,001	0,004	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Moraxella</i>	0,000	0,000	0,002	0,008	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Clostridium</i>	0,042	0,082	0,052	0,057	0,051	0,061	0,005	0,451
<i>Eikenella</i>	0,110	0,133	0,073	0,090	0,069	0,078	0,032	0,470
<i>Cardiobacterium</i>	2,119	1,194	2,005	1,420	1,725	1,169	0,017	0,476
<i>Stomatobaculum</i>	0,060	0,126	0,020	0,034	0,059	0,086	0,042	0,488
<i>Mannheimia</i>	1,267	1,543	1,162	1,522	1,258	1,049	0,001	0,531
<i>Aggregatibacter</i>	1,795	1,595	2,350	1,481	2,246	2,006	0,020	0,532
<i>Fretibacterium</i>	0,023	0,045	0,043	0,080	0,016	0,028	0,043	0,539
<i>Mogibacterium</i>	0,063	0,076	0,046	0,064	0,045	0,075	0,012	0,539
<i>Shuttleworthia</i>	0,014	0,056	0,032	0,107	0,005	0,010	0,024	0,540
<i>Oribacterium</i>	0,095	0,106	0,086	0,180	0,058	0,086	0,014	0,542
<i>Fusobacterium</i>	4,062	1,863	3,883	2,437	4,730	2,545	0,024	0,580
<i>Butyrivibrio</i>	0,001	0,002	0,000	0,000	0,001	0,004	0,019	0,601
<i>Zoogloea</i>	0,001	0,004	0,001	0,003	0,000	0,000	0,018	0,601
<i>Lactococcus</i>	0,001	0,005	0,003	0,013	0,000	0,000	0,023	0,601
<i>Actinomyces</i>	10,656	5,777	9,448	5,007	10,575	4,245	0,012	0,620
<i>Johnsonella</i>	0,084	0,135	0,080	0,163	0,064	0,139	0,004	0,622
<i>Veillonella</i>	2,818	3,137	3,173	3,139	3,771	3,415	0,015	0,657
<i>Tannerella</i>	0,931	0,827	1,330	1,271	0,995	0,496	0,035	0,659
<i>Anaeroglobus</i>	0,022	0,052	0,037	0,075	0,022	0,041	0,015	0,693
<i>Dialister</i>	0,342	0,352	0,475	0,543	0,326	0,353	0,024	0,733
<i>Actinobacillus</i>	0,067	0,078	0,134	0,170	0,069	0,090	0,064	0,740
<i>Pasteurella</i>	0,009	0,027	0,008	0,017	0,011	0,021	0,002	0,767
<i>Solobacterium</i>	0,008	0,030	0,003	0,005	0,002	0,005	0,020	0,773
<i>Parvimonas</i>	0,168	0,241	0,155	0,194	0,113	0,160	0,013	0,782
<i>Peptostreptococcus</i>	0,034	0,042	0,041	0,067	0,115	0,222	0,067	0,798
<i>Schwartzia</i>	0,007	0,028	0,002	0,009	0,005	0,019	0,012	0,807
<i>Capnocytophaga</i>	3,105	1,545	3,333	1,829	3,247	1,270	0,004	0,809
<i>Bifidobacterium</i>	0,100	0,267	0,019	0,076	0,082	0,216	0,028	0,841
<i>Peptoanaerobacter</i>	0,029	0,057	0,026	0,047	0,025	0,052	0,001	0,844
<i>Leptotrichia</i>	5,503	3,202	5,034	2,608	5,552	2,386	0,007	0,871
<i>Peptococcus</i>	0,008	0,017	0,005	0,010	0,009	0,023	0,008	0,884
<i>Propionivibrio</i>	0,006	0,016	0,004	0,009	0,029	0,087	0,048	0,926
<i>Alloprevotella</i>	0,538	0,944	0,376	0,598	0,333	0,392	0,016	0,942
<i>Scardovia</i>	0,023	0,037	0,086	0,202	0,020	0,046	0,059	0,960
<i>Catonella</i>	0,056	0,062	0,047	0,042	0,076	0,092	0,029	0,970
<i>Atopobium</i>	0,242	0,458	0,178	0,274	0,104	0,133	0,030	0,970
<i>Corynebacterium</i>	6,521	3,359	7,459	5,187	7,255	3,353	0,010	0,971
<i>Neisseria</i>	2,428	2,116	2,549	2,417	2,178	1,415	0,006	0,997

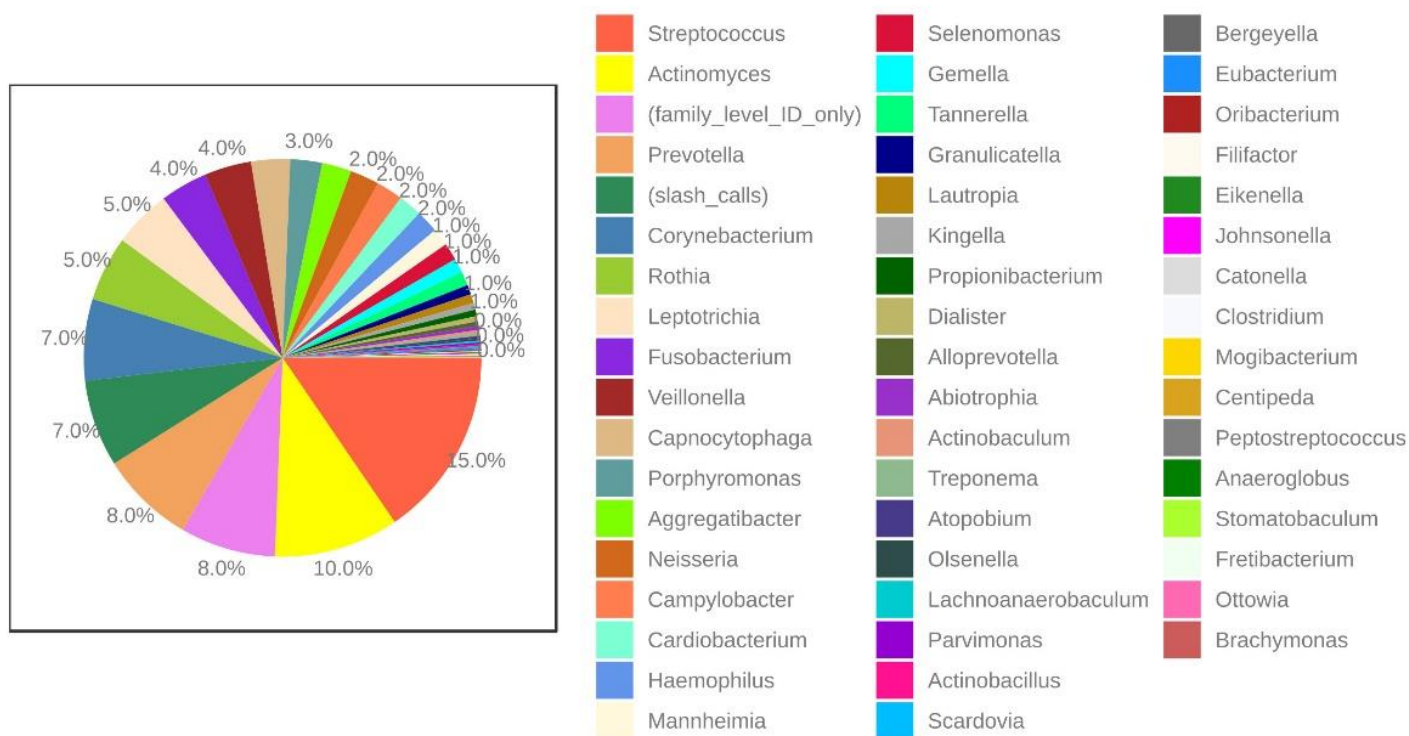
*Crnom bojom su označeni bakterijski rodovi koji su bili statistički značajno različito zastupljeni između ispitivanih skupina

Na taksonomskoj razini roda pronađene su značajne razlike u bakterijskoj zastupljenosti unutar rodova *Actinobaculum* ($p=0,004$), *Avibacterium* ($p=0,015$), *Alysiella* ($p=0,016$), *Propionibacterium* ($p=0,025$) i *Haemophilus* ($p=0,030$). Rod *Actinobaculum* bio je najzastupljeniji u skupini nepušača ($1.02\% \pm 1.54\%$), a najmanje zastupljen u skupini pušača cigareta ($0.25\% \pm 0.34\%$). Rod *Avibacterium* detektiran je isključivo unutar skupine nepušača ($0.19\% \pm 0.40\%$). U skupinama pušača detektirana je prisutnost bakterijskog roda *Alysiella* koji je bio zastupljeniji u skupini pušača THS-a ($0.02\% \pm 0.05\%$) nego u skupini pušača cigareta ($0.002\% \pm 0.006\%$). Rod *Propionibacterium* bio je najzastupljeniji u skupini pušača THS-a ($1.20\% \pm 1.41\%$), a najmanje zastupljen u skupini nepušača ($0.44\% \pm 0.47\%$). Bakterije iz roda *Haemophilus* bile su najzastupljenije u skupini nepušača ($2.31\% \pm 1.64\%$), a najmanje zastupljene u skupini pušača cigareta ($1.64\% \pm 1.90\%$).

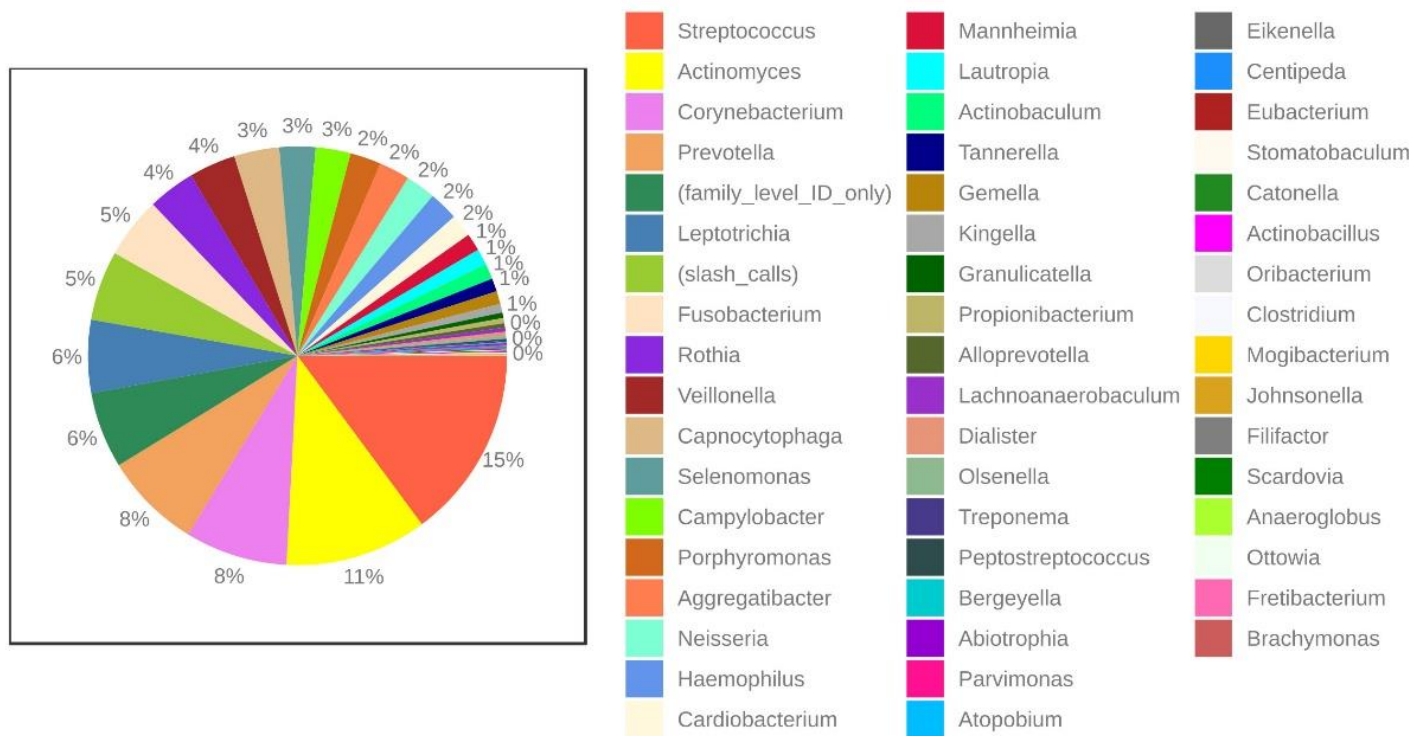
Zastupljenost bakterijskih rodova u ispitivanim skupinama prikazana je grafički na slikama 4.12, 4.13 i 4.14.



Slika 4.12. Zastupljenost bakterijskih rodova u skupini pušača THS-a



Slika 4.13. Zastupljenost bakterijskih rodova u skupini pušača cigareta



Slika4.14. Zastupljenost bakterijskih rodova u skupini nepušača



Slika 4.14. Usporedba relativne zastupljenosti bakterijskih rodova u ispitivanim skupinama

4.6.6 Bakterijska raznolikost na razini vrste

Bioinformatičkom analizom ustanovljena je prisutnost ukupno 232 bakterijske vrste u ispitivanim uzorcima. Detektirane bakterijske vrste s njihovom razinom zastupljenosti u ispitivanim skupinama prikazani su u tablici 4.10. Rezultati su izraženi u vidu udjela (%) koji pojedina bakterijska vrsta zauzima unutar bakterijskog mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma u pojedinom ispitivanom uzorku.

Tablica 4.10. Zastupljenost bakterijskih vrsta u skupinama pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Vrsta	Pušači THS-a Aritm. sredina	Pušači THS- a Dev.	Pušači Cigareta Aritm. sredina	Pušači Cigareta Std. Dev.	Nepušači Aritm. sredina	Nepušači Std. Dev.	Veličina učinka η^2	P vrijednost Kruskal- Wallis
<i>Alysiella filiformis</i>	0,016	0,045	0,000	0,002	0,000	0,000	0,079	0,006
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,193	0,398	0,135	0,015
<i>Prevotella multiformis</i>	0,131	0,409	0,115	0,461	0,134	0,200	0,001	0,016
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0,000	0,000	0,003	0,013	0,061	0,118	0,146	0,018
<i>Actinomyces massiliensis</i>	0,640	0,503	0,643	0,797	1,222	0,845	0,123	0,022
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,022	0,089	0,000	0,000	0,009	0,025	0,028	0,025
<i>Propionibacterium propionicum</i>	0,649	0,670	0,357	0,383	0,226	0,272	0,123	0,027
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,460	3,374	1,165	1,897	1,981	1,612	0,019	0,028
<i>Prevotella pleuritidis</i>	0,254	0,799	0,105	0,179	0,042	0,121	0,033	0,029
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,010	0,032	0,009	0,015	0,000	0,000	0,046	0,035
<i>Kingella oralis</i>	0,602	0,573	0,419	0,595	0,573	0,347	0,024	0,038
<i>Streptococcus caballi</i>	0,005	0,009	0,000	0,000	0,007	0,017	0,064	0,042
<i>Streptococcus lactarius</i>	0,030	0,028	0,044	0,028	0,023	0,027	0,088	0,050
<i>Selenomonas sputigena</i>	0,188	0,267	0,042	0,064	0,156	0,187	0,096	0,056
<i>Slackia exigua</i>	0,001	0,004	0,005	0,013	0,000	0,000	0,079	0,058
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	0,264	0,249	0,432	0,432	0,747	1,165	0,070	0,072
<i>Eubacterium infirmum</i>	0,023	0,072	0,013	0,021	0,001	0,004	0,039	0,080
<i>Filifactor alocis</i>	0,040	0,051	0,084	0,204	0,021	0,045	0,043	0,084
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	0,280	0,253	0,136	0,209	0,647	1,800	0,040	0,084
<i>Treponema socranskii</i>	0,112	0,163	0,061	0,088	0,074	0,128	0,027	0,091
<i>Gemella morbillorum</i>	0,293	0,268	0,613	0,463	0,511	0,466	0,096	0,092
<i>Streptococcus tigurinus</i>	0,021	0,028	0,026	0,058	0,010	0,028	0,028	0,102
<i>Granulicatella adiacens</i>	0,335	0,306	0,619	0,523	0,367	0,201	0,106	0,109

<i>Megasphaera micronuciformis</i>	0,004	0,015	0,009	0,025	0,000	0,000	0,045	0,117
<i>Prevotella denticola</i>	0,519	1,378	0,295	0,989	0,347	0,429	0,009	0,121
<i>Rothia mucilaginosa</i>	0,018	0,038	0,003	0,014	0,006	0,016	0,066	0,121
<i>Lachnoanaerobaculum saburreum</i>	0,267	0,361	0,091	0,115	0,220	0,312	0,065	0,128
<i>Moryella indoligenes</i>	0,000	0,000	0,002	0,005	0,000	0,000	0,069	0,131
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0,015	0,046	0,000	0,000	0,000	0,000	0,064	0,131
<i>Vagococcus lutrae</i>	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000	0,000	0,069	0,131
<i>Abiotrophia defectiva</i>	0,048	0,093	0,323	0,624	0,091	0,116	0,096	0,141
<i>Streptococcus sobrinus</i>	0,004	0,016	0,143	0,527	0,370	0,826	0,066	0,142
<i>Prevotella saccharolytica</i>	0,284	0,313	0,214	0,174	0,119	0,146	0,084	0,143
<i>Gemella sanguinis</i>	0,000	0,002	0,004	0,011	0,000	0,000	0,080	0,146
<i>Centipeda periodontii</i>	0,046	0,065	0,014	0,022	0,032	0,040	0,073	0,150
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0,171	0,179	0,217	0,275	0,280	0,202	0,039	0,151
<i>Streptococcus constellatus</i>	0,030	0,073	0,037	0,077	0,004	0,014	0,052	0,154
<i>Prevotella baroniae</i>	0,001	0,004	0,030	0,092	0,002	0,007	0,060	0,156
<i>Neisseria polysaccharea</i>	0,008	0,024	0,000	0,000	0,003	0,014	0,040	0,163
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0,267	0,250	0,179	0,208	0,119	0,186	0,073	0,172
<i>Treponema maltophilum</i>	0,014	0,032	0,001	0,004	0,001	0,004	0,092	0,175
<i>Streptococcus peroris</i>	0,020	0,089	0,007	0,022	0,029	0,068	0,018	0,194
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0,465	0,438	0,521	0,439	0,712	0,499	0,050	0,194
<i>Selenomonas infelix</i>	0,105	0,130	0,111	0,145	0,143	0,113	0,016	0,201
<i>Lachnoanaerobaculum orale</i>	0,007	0,009	0,005	0,014	0,010	0,017	0,023	0,202
<i>Olsenella uli</i>	0,008	0,022	0,002	0,009	0,011	0,042	0,018	0,204
<i>Granulicatella elegans</i>	0,030	0,042	0,051	0,047	0,025	0,023	0,079	0,205
<i>Cardiobacterium valvarum</i>	0,389	0,437	0,555	0,623	0,195	0,301	0,088	0,213
<i>Prevotella enoeca</i>	0,000	0,000	0,002	0,007	0,008	0,026	0,054	0,214
<i>Streptococcus gordonii</i>	0,126	0,238	0,153	0,158	0,072	0,049	0,039	0,217
<i>Streptococcus australis</i>	0,045	0,148	0,048	0,085	0,059	0,106	0,003	0,218
<i>Rothia aeria</i>	1,208	1,186	1,159	2,129	0,836	0,651	0,013	0,219
<i>Prevotella nigrescens</i>	1,067	1,733	0,623	0,842	1,128	1,250	0,028	0,219
<i>Selenomonas noxia</i>	0,896	0,850	1,138	0,984	1,783	1,927	0,072	0,220
<i>Bulleidia extructa</i>	0,004	0,015	0,006	0,017	0,000	0,000	0,039	0,224
<i>Prevotella salivae</i>	0,071	0,138	0,127	0,162	0,082	0,122	0,029	0,224
<i>Streptococcus minor</i>	0,000	0,000	0,008	0,031	0,005	0,014	0,029	0,228
<i>Fretibacterium fastidiosum</i>	0,006	0,014	0,025	0,042	0,006	0,019	0,091	0,233
<i>Treponema medium</i>	0,084	0,109	0,052	0,084	0,035	0,040	0,057	0,237
<i>Corynebacterium durum</i>	1,037	1,192	0,805	1,162	1,187	1,426	0,015	0,239
<i>Capnocytophaga haemolytica</i>	0,039	0,149	0,002	0,010	0,007	0,020	0,034	0,240
<i>Actinomyces naeslundii</i>	3,094	2,209	2,344	1,879	2,902	1,912	0,025	0,243

<i>Veillonella rodentium</i>	0,006	0,016	0,003	0,009	0,013	0,024	0,058	0,249
<i>Prevotella oralis</i>	0,059	0,198	0,008	0,023	0,004	0,015	0,045	0,251
<i>Otariodibacter oris</i>	0,238	1,036	0,798	1,637	0,701	1,338	0,031	0,259
<i>Olsenella profusa</i>	0,097	0,124	0,062	0,074	0,096	0,089	0,026	0,264
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0,640	0,959	0,253	0,427	0,210	0,236	0,089	0,270
<i>Leptotrichia trevisanii</i>	0,109	0,187	0,115	0,205	0,079	0,174	0,007	0,272
<i>Actinomyces viscosus</i>	0,980	1,108	0,622	0,680	0,875	0,622	0,032	0,274
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0,032	0,049	0,106	0,132	0,047	0,076	0,107	0,293
<i>Streptococcus cristatus</i>	0,252	0,306	0,167	0,203	0,384	0,440	0,068	0,301
<i>Haemophilus sputorum</i>	0,002	0,007	0,004	0,011	0,014	0,042	0,042	0,305
<i>Actinomyces bowdenii</i>	0,275	0,298	0,300	0,533	0,145	0,161	0,034	0,314
<i>Atopobium rimae</i>	0,145	0,364	0,141	0,250	0,089	0,115	0,009	0,316
<i>Capnocytophaga granulosa</i>	0,502	0,617	0,579	0,727	0,304	0,420	0,036	0,324
<i>Prevotella oulorum</i>	0,290	0,295	0,183	0,179	0,352	0,360	0,055	0,324
<i>Campylobacter gracilis</i>	1,119	0,450	1,246	0,757	1,699	0,987	0,096	0,327
<i>Gemella haemolysans</i>	0,037	0,079	0,032	0,074	0,038	0,052	0,002	0,329
<i>Leptotrichia hofstadii</i>	0,915	0,856	0,896	1,051	1,400	1,257	0,046	0,330
<i>Streptococcus sinensis</i>	0,043	0,179	0,077	0,181	0,072	0,125	0,009	0,336
<i>Veillonella denticariosi</i>	0,002	0,006	0,016	0,045	0,031	0,069	0,058	0,339
<i>Actinomyces timonensis</i>	0,014	0,043	0,001	0,004	0,000	0,000	0,063	0,343
<i>Phocaeicola abscessus</i>	0,000	0,000	0,009	0,029	0,001	0,004	0,057	0,343
<i>Actinobacillus ureae</i>	0,000	0,000	0,002	0,007	0,001	0,004	0,045	0,343
<i>Veillonella dispar</i>	0,057	0,069	0,035	0,037	0,049	0,091	0,018	0,346
<i>Rothia dentocariosa</i>	3,040	2,822	3,099	5,425	2,439	2,198	0,006	0,347
<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	0,123	0,206	0,054	0,115	0,080	0,151	0,029	0,348
<i>Streptococcus hyointestinalis</i>	0,004	0,013	0,001	0,005	0,000	0,000	0,048	0,348
<i>Parascardovia denticolens</i>	0,013	0,046	0,004	0,017	0,000	0,000	0,033	0,355
<i>Neisseria animaloris</i>	0,002	0,008	0,003	0,009	0,000	0,000	0,026	0,355
<i>Prevotella fusca</i>	0,007	0,028	0,002	0,009	0,000	0,000	0,033	0,355
<i>Streptococcus gallinaceus</i>	0,003	0,010	0,000	0,000	0,002	0,007	0,033	0,355
<i>Mycoplasma salivarium</i>	0,000	0,000	0,001	0,005	0,003	0,009	0,032	0,355
<i>Treponema vincentii</i>	0,002	0,010	0,007	0,024	0,000	0,000	0,040	0,355
<i>Mogibacterium diversum</i>	0,002	0,005	0,001	0,004	0,000	0,000	0,032	0,368
<i>Actinobacillus equuli</i>	0,001	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Kingella kingae</i>	0,001	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Lactobacillus graminis</i>	0,000	0,000	0,002	0,010	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Kingella potus</i>	0,008	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Mogibacterium timidum</i>	0,001	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Brachymonas denitrificans</i>	0,000	0,000	0,001	0,004	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Eggerthia cateniformis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,004	0,034	0,368
<i>Scardovia inopinata</i>	0,004	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Streptococcus massiliensis</i>	0,002	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368

<i>Streptococcus troglodytidis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,004	0,034	0,368
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,034	0,368
<i>Ralstonia pickettii</i>	0,001	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	0,000	0,000	0,005	0,020	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Streptococcus downei</i>	0,000	0,000	0,004	0,018	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Lactobacillus secaliphilus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,006	0,034	0,368
<i>Streptococcus equi</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,034	0,368
<i>Campylobacter rectus</i>	0,001	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,008	0,034	0,368
<i>Alysiella crassa</i>	0,000	0,000	0,001	0,005	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Eubacterium saphenum</i>	0,000	0,000	0,001	0,005	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Actinobacillus minor</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Streptococcus ferus</i>	0,001	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Bergeriella denitrificans</i>	0,009	0,041	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Neisseria weaveri</i>	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i>	0,001	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Lactobacillus oris</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,034	0,368
<i>Prevotella nanceiensis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002	0,034	0,368
<i>Haemophilus simiae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,005	0,034	0,368
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,006	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Actinomyces cardiffensis</i>	0,000	0,000	0,018	0,078	0,000	0,000	0,034	0,368
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	0,004	0,017	0,004	0,015	0,020	0,048	0,058	0,372
<i>Streptococcus mutans</i>	0,559	1,160	1,091	3,313	0,809	1,336	0,010	0,379
<i>Prevotella pallens</i>	0,004	0,012	0,025	0,067	0,068	0,155	0,070	0,385
<i>Treponema denticola</i>	0,019	0,047	0,011	0,034	0,011	0,026	0,009	0,396
<i>Aggregatibacter segnis</i>	1,066	1,201	1,445	1,103	1,412	1,392	0,019	0,408
<i>Treponema amylovorum</i>	0,060	0,115	0,063	0,101	0,023	0,048	0,037	0,420
<i>Leptotrichia shahii</i>	0,175	0,407	0,109	0,171	0,164	0,174	0,011	0,426
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,011	0,040	0,025	0,065	0,008	0,020	0,025	0,428
<i>Prevotella tanneriae</i>	0,158	0,306	0,100	0,211	0,054	0,097	0,036	0,431
<i>Prevotella loescheii</i>	0,431	0,379	0,490	1,081	0,386	0,428	0,004	0,437
<i>Prevotella copri</i>	0,005	0,022	0,003	0,009	0,001	0,002	0,018	0,442
<i>Mannheimia varigena</i>	1,237	1,551	1,102	1,474	1,230	1,036	0,002	0,447
<i>Neisseria subflava</i>	0,162	0,333	0,211	0,387	0,063	0,151	0,039	0,448
<i>Leptotrichia hongkongensis</i>	0,443	0,453	0,769	1,105	0,876	0,858	0,045	0,452
<i>Prevotella marshii</i>	0,017	0,026	0,025	0,070	0,011	0,023	0,017	0,464
<i>Tannerella forsythia</i>	0,024	0,061	0,030	0,068	0,027	0,054	0,002	0,494
<i>Leptotrichia wadei</i>	0,409	0,586	0,771	1,160	0,695	0,852	0,029	0,496
<i>Stomatobaculum longum</i>	0,059	0,122	0,020	0,034	0,058	0,084	0,041	0,499
<i>Atopobium parvulum</i>	0,095	0,319	0,029	0,039	0,015	0,022	0,034	0,504

<i>Streptococcus merionis</i>	0,001	0,002	0,007	0,025	0,001	0,004	0,042	0,506
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,019	0,014	0,026	0,018	0,026	0,019	0,032	0,511
<i>Shuttleworthia satelles</i>	0,014	0,056	0,032	0,107	0,005	0,010	0,024	0,540
<i>Eikenella corrodens</i>	0,105	0,132	0,068	0,088	0,069	0,078	0,028	0,542
<i>Veillonella caviae</i>	0,009	0,031	0,005	0,016	0,015	0,061	0,011	0,543
<i>Capnocytophaga leadbetteri</i>	0,377	0,475	0,553	0,614	0,374	0,387	0,027	0,552
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	0,027	0,042	0,039	0,066	0,115	0,222	0,075	0,555
<i>Neisseria bacilliformis</i>	0,235	0,304	0,440	0,818	0,649	0,965	0,048	0,562
<i>Veillonella alcalescens</i>	1,917	2,387	2,033	1,737	2,395	2,237	0,009	0,563
<i>Prevotella intermedia</i>	0,265	0,394	0,184	0,288	0,232	0,644	0,005	0,565
<i>Fusobacterium hwasookii</i>	0,010	0,022	0,018	0,034	0,011	0,029	0,016	0,565
<i>Haemophilus pittmaniae</i>	0,001	0,003	0,003	0,010	0,004	0,013	0,021	0,569
<i>Veillonella parvula</i>	0,233	0,211	0,354	0,539	0,477	0,503	0,048	0,573
<i>Eubacterium brachy</i>	0,072	0,116	0,042	0,055	0,030	0,046	0,048	0,579
<i>Actinomyces meyeri</i>	0,006	0,016	0,004	0,016	0,003	0,011	0,007	0,585
<i>Actinomyces georgiae</i>	0,157	0,163	0,165	0,152	0,202	0,196	0,013	0,589
<i>Aggregatibacter raphrophilus</i>	0,511	0,721	0,608	0,584	0,469	0,458	0,009	0,592
<i>Actinomyces israelii</i>	0,004	0,019	0,000	0,000	0,001	0,006	0,025	0,601
<i>Lactococcus lactis</i>	0,001	0,005	0,003	0,013	0,000	0,000	0,023	0,601
<i>Treponema lecithinolyticum</i>	0,006	0,024	0,003	0,013	0,000	0,000	0,020	0,601
<i>Actinomyces howellii</i>	0,002	0,007	0,001	0,006	0,000	0,000	0,017	0,601
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	0,020	0,048	0,033	0,064	0,021	0,041	0,013	0,605
<i>Campylobacter concisus</i>	0,091	0,115	0,077	0,085	0,158	0,210	0,055	0,606
<i>Veillonella rogosae</i>	0,231	0,151	0,291	0,415	0,417	0,445	0,044	0,611
<i>Oribacterium sinus</i>	0,002	0,009	0,002	0,005	0,002	0,009	0,000	0,622
<i>Prevotella buccae</i>	0,002	0,006	0,032	0,075	0,014	0,055	0,049	0,622
<i>Actinobacillus lignieresii</i>	0,060	0,077	0,131	0,167	0,065	0,091	0,069	0,632
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	0,013	0,058	0,007	0,025	0,005	0,014	0,009	0,633
<i>Prevotella scopos</i>	0,077	0,150	0,054	0,180	0,007	0,021	0,044	0,636
<i>Streptococcus mitis</i>	0,087	0,070	0,097	0,159	0,078	0,069	0,005	0,639
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	0,003	0,012	0,035	0,142	0,005	0,013	0,031	0,641
<i>Streptococcus infantis</i>	0,063	0,128	0,027	0,028	0,031	0,052	0,037	0,651
<i>Neisseria elongata</i>	0,450	0,777	0,391	0,556	0,355	0,329	0,004	0,654
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2,094	1,068	2,169	1,404	2,481	1,177	0,018	0,670
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	0,053	0,087	0,078	0,123	0,145	0,230	0,056	0,677
<i>Streptococcus salivarius</i>	0,047	0,174	0,024	0,049	0,027	0,051	0,009	0,680
<i>Johnsonella ignava</i>	0,078	0,130	0,067	0,155	0,043	0,115	0,012	0,697
<i>Actinomyces oris</i>	0,291	0,378	0,199	0,214	0,188	0,140	0,030	0,698
<i>Prevotella shahii</i>	0,171	0,167	0,233	0,268	0,172	0,245	0,016	0,701
<i>Prevotella micans</i>	0,122	0,163	0,094	0,123	0,065	0,082	0,033	0,707

<i>Kingella denitrificans</i>	0,103	0,203	0,085	0,158	0,035	0,055	0,035	0,711
<i>Prevotella maculosa</i>	0,506	0,298	0,617	0,394	0,616	0,378	0,021	0,717
<i>Streptococcus oralis</i>	0,014	0,030	0,025	0,043	0,028	0,043	0,022	0,717
<i>Dialister invisus</i>	0,291	0,247	0,432	0,492	0,291	0,307	0,032	0,730
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	0,117	0,394	0,031	0,069	0,112	0,315	0,018	0,732
<i>Neisseria flavescens</i>	0,187	0,235	0,332	0,609	0,163	0,291	0,032	0,747
<i>Prevotella dentalis</i>	0,000	0,002	0,010	0,031	0,004	0,016	0,036	0,748
<i>Streptococcus anginosus</i>	0,037	0,076	0,098	0,365	0,028	0,047	0,020	0,755
<i>Selenomonas flueggei</i>	0,044	0,100	0,015	0,023	0,019	0,033	0,039	0,765
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0,009	0,027	0,008	0,017	0,011	0,021	0,002	0,767
<i>Mogibacterium neglectum</i>	0,001	0,003	0,001	0,003	0,002	0,006	0,012	0,769
<i>Actinobacillus parahaemolyticus</i>	0,003	0,009	0,001	0,002	0,002	0,006	0,023	0,771
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	0,242	0,344	0,364	0,586	0,196	0,413	0,023	0,772
<i>Solobacterium moorei</i>	0,008	0,030	0,003	0,005	0,002	0,005	0,020	0,773
<i>Selenomonas artemidis</i>	0,073	0,080	0,099	0,173	0,061	0,085	0,017	0,781
<i>Neisseria dentiae</i>	0,003	0,010	0,004	0,012	0,001	0,004	0,015	0,789
<i>Parvimonas micra</i>	0,158	0,213	0,148	0,187	0,109	0,154	0,012	0,799
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0,263	0,511	0,323	0,420	0,195	0,194	0,017	0,800
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,020	0,051	0,105	0,305	0,076	0,193	0,027	0,801
<i>Dialister pneumosintes</i>	0,035	0,103	0,012	0,021	0,028	0,069	0,018	0,802
<i>Prevotella oris</i>	0,863	0,783	0,742	0,704	1,268	1,991	0,029	0,804
<i>Cardiobacterium hominis</i>	1,140	0,838	1,143	0,803	1,054	0,909	0,002	0,817
<i>Neisseria oralis</i>	0,533	1,305	0,232	0,382	0,251	0,476	0,027	0,825
<i>Leptotrichia buccalis</i>	1,086	1,240	1,144	1,291	1,076	1,550	0,000	0,836
<i>Bifidobacterium dentium</i>	0,060	0,179	0,008	0,030	0,062	0,171	0,029	0,841
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	0,002	0,009	0,001	0,005	0,001	0,005	0,002	0,841
<i>Scardovia wiggsiae</i>	0,019	0,035	0,086	0,202	0,020	0,046	0,063	0,843
<i>Eubacterium yurii</i>	0,029	0,057	0,026	0,047	0,025	0,052	0,001	0,844
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,252	0,933	1,519	1,284	1,386	0,915	0,010	0,876
<i>Prevotella histicola</i>	0,552	2,249	0,065	0,101	0,063	0,097	0,030	0,882
<i>Veillonella atypica</i>	0,039	0,114	0,020	0,044	0,029	0,050	0,010	0,885
<i>Prevotella veroralis</i>	0,179	0,369	0,077	0,118	0,097	0,126	0,034	0,887
<i>Alloprevotella rava</i>	0,014	0,021	0,013	0,027	0,013	0,020	0,001	0,893
<i>Porphyromonas catoniae</i>	1,038	2,073	0,623	0,522	0,548	0,500	0,028	0,895
<i>Alloprevotella tannerae</i>	0,520	0,928	0,361	0,593	0,309	0,400	0,017	0,906
<i>Actinomyces dentalis</i>	0,860	0,773	1,116	1,373	1,257	1,430	0,018	0,926
<i>Campylobacter showae</i>	0,034	0,047	0,037	0,052	0,047	0,097	0,006	0,934
<i>Campylobacter curvus</i>	0,083	0,094	0,099	0,126	0,154	0,361	0,018	0,936
<i>Fusobacterium canifelinum</i>	0,477	0,402	0,470	0,312	0,454	0,342	0,001	0,937

<i>Corynebacterium matruchotii</i>	5,098	3,016	5,726	4,600	5,591	3,377	0,005	0,939
<i>Streptococcus intermedius</i>	0,351	0,552	0,319	0,529	0,355	0,526	0,001	0,942
<i>Veillonella tobetsuensis</i>	0,054	0,049	0,071	0,073	0,096	0,183	0,021	0,953
<i>Catonella morbi</i>	0,056	0,061	0,047	0,042	0,071	0,081	0,023	0,959
<i>Neisseria canis</i>	0,027	0,089	0,025	0,062	0,009	0,018	0,016	0,980
<i>Lachnoanaerobaculum umeaense</i>	0,089	0,131	0,073	0,099	0,085	0,104	0,004	0,989
<i>Selenomonas diana</i>	0,002	0,005	0,011	0,035	0,004	0,012	0,035	0,990
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0,002	0,007	0,006	0,025	0,002	0,008	0,014	0,999
<i>Gemella bergeri</i>	0,021	0,092	0,010	0,041	0,001	0,004	0,020	0,999

*Crnom bojom su istaknute bakterijske vrste koje su statistički bile značajno različito zastupljene između ispitivanih skupina

Biostatistička analiza otkrila je značajne razlike u zastupljenosti 13 bakterijskih vrsta između ispitivanih skupina (tablica 4.10). *Alysiella filiformis* detektirana je isključivo u skupinama pušača, a bila je zastupljenija u skupini pušača THS-a ($0,020\% \pm 0,050\%$) nego u skupini pušača cigareta ($0,000\% \pm 0,002\%$). *Avibacterium paragallinarum* detektiran je isključivo u skupini nepušača. *Prevotella multiformis* je bila najzastupljenija u skupini nepušača ($0,134\% \pm 0,200\%$), a najmanje u skupini pušača cigareta ($0,120\% \pm 0,460\%$). *Lactobacillus salivarius* nije detektiran u skupini pušača THS-a, a zastupljeniji je bio u skupini nepušača ($0,06\% \pm 0,12\%$), nego u skupini pušača cigareta ($0,003\% \pm 0,013\%$). *Actinomyces massiliensis* je najzastupljeniji bio u skupini nepušača ($1,22\% \pm 0,85\%$), a najmanje zastupljen u skupini pušača THS-a ($0,64\% \pm 0,53\%$). *Streptococcus thermophilus* nije detektiran u skupini pušača cigareta, a bio je zastupljeniji u skupini THS-a ($0,02\% \pm 0,09\%$) nego u skupini nepušača ($0,003\% \pm 0,013\%$). *Propionibacterium propionicum* je bio najzastupljeniji u skupini pušača THS-a ($0,65\% \pm 0,67\%$), a najmanje zastupljen u skupini nepušača ($0,23\% \pm 0,27\%$). *Haemophilus parainfluenzae* je bio najzastupljeniji u skupini nepušača ($1,98\% \pm 1,61\%$), a najmanje zastupljen u skupini pušača cigareta ($1,17\% \pm 1,90\%$). *Prevotella pleuritidis* je bila najzastupljenija u skupini pušača THS-a ($0,25\% \pm 0,80\%$), a najmanje je bila zastupljena u skupini nepušača ($0,04\% \pm 0,12\%$). *Streptococcus pyogenes* nije detektiran u skupini nepušača, a bio je zastupljeniji u skupini pušača THS-a ($0,010\% \pm 0,032\%$) nego u skupini pušača cigareta ($0,009\% \pm 0,015\%$). *Kingella oralis* je bila najzastupljenija u skupini pušača THS-a ($0,60\% \pm 0,57\%$), a najmanje zastupljena u skupini pušača cigareta ($0,41\% \pm 0,60\%$). *Streptococcus caballi* nije detektiran u skupini pušača cigareta, a bio je zastupljeniji u skupini nepušača ($0,007\% \pm 0,017\%$) nego u skupini pušača THS-a ($0,005\% \pm 0,009\%$). *Streptococcus*

lactarius je bio najzastupljeniji u skupini pušača cigareta ($0,044\% \pm 0,028\%$), a najmanje je bio zastupljen u skupini nepušača ($0,023\% \pm 0,027\%$).

4.6.7 Kariogeni potencijal biofilma

Kariogeni potencijali supragingivnih dentalnih biofilмова ispitivanih skupina procijenjeni su uspoređivanjem učestalosti prisutnosti bakterijskih vrsta koje se povezuju/ne povezuju s prisutnosti karijesa. Dodatno je kariogeni potencijal biofilмова procijenjen i usporedbama broja različitih bakterijskih vrsta koje se povezuju/ne povezuju sa stanjem prisutnosti karijesa i ukupnog udjela ASV očitavanja koje odgovaraju spomenutim bakterijama.

4.6.7.1 Prisutnost kariogenih vrsta u ispitivanim skupinama

Podaci o broju detektiranih ASV bakterija koje se povezuju sa stanjem prisutnosti/odsutnosti karijesnih lezija dihotomizirani su u podatke koji opisuju prisutnost/odsutnost bakterije u svakom pojedinom uzorku (1 – bakterija je detektirana; 0 – bakterija nije detektirana). Značajnost prisutnosti spomenutih bakterija u ispitivanim skupinama testirana je χ^2 testom. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 4.11, 4.12. i 4.13.

Tablica 4.11. Prisutnost bakterija unutar mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma koje se povezuju s prisutnosti karijesa

Br.	Bakterije koje se povezuju s prisutnosti karijesa	Učestalost pojave bakterije u uzorcima po ispitivanoj skupini			p
		Pušači THS-a (%)	Pušači cigareta (%)	Nepušači (%)	
1.	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	95	65	85	0,044
2.	<i>Selenomonas sputigena</i>	60	45	85	0,030
3.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	95	100	100	0,362
4.	<i>Campylobacter gracilis</i>	100	100	100	/
5.	<i>Leptotrichia hofstadii</i>	85	90	100	0,217
6.	<i>Leptotrichia buccalis</i>	80	80	85	0,895
7.	<i>Prevotella oris</i>	100	95	100	0,362
8.	<i>Streptococcus mutans</i>	40	70	55	0,162
9.	<i>Actinomyces viscosus</i>	100	100	100	/
10.	<i>Leptotrichia hongkongensis</i>	95	90	95	0,765
11.	<i>Leptotrichia wadei</i>	70	85	85	0,392

12.	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	85	90	85	0,866
13.	<i>Alloprevotella tannerae</i>	65	80	70	0,551
14.	<i>Neisseria bacilliformis</i>	75	60	60	0,517
15.	<i>Rothia dentocariosa</i>	100	100	100	/
16.	<i>Prevotella denticola</i>	40	60	70	0,150
17.	<i>Veillonella parvula</i>	95	90	90	0,804
18.	<i>Dialister invisus</i>	85	90	95	0,574
19.	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	85	70	85	0,392
20.	<i>Prevotella intermedia</i>	50	40	35	0,619
21.	<i>Prevotella histicola</i>	35	40	40	0,932
22.	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	70	85	70	0,449
23.	<i>Actinomyces georgiae</i>	85	90	95	0,574
24.	<i>Leptotrichia shahii</i>	60	50	65	0,619
25.	<i>Parvimonas micra</i>	85	80	75	0,732
26.	<i>Streptococcus sobrinus</i>	5	10	20	0,322
27.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	100	100	100	/
28.	<i>Atopobium rimae</i>	30	45	65	0,084
29.	<i>Streptococcus mitis</i>	85	70	80	0,503
30.	<i>Prevotella salivae</i>	40	70	65	0,119
31.	<i>Olsenella profusa</i>	75	55	85	0,100
32.	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	60	60	55	0,934
33.	<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	20	35	20	0,449
34.	<i>Catonella morbi</i>	70	80	70	0,711
35.	<i>Scardovia wiggsiae</i>	25	30	35	0,788
36.	<i>Veillonella dispar</i>	75	60	45	0,153
37.	<i>Atopobium parvulum</i>	40	55	40	0,545
38.	<i>Granulicatella elegans</i>	60	75	75	0,490
39.	<i>Bifidobacterium dentium</i>	20	15	15	0,887
40.	<i>Anaeroglobus geminatus</i>	25	40	30	0,583
41.	<i>Veillonella denticariosi</i>	10	15	25	0,432
42.	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	5	10	10	0,804
43.	<i>Eubacterium infirmum</i>	10	30	5	0,064
44.	<i>Olsenella uli</i>	25	5	10	0,153
45.	<i>Solobacterium moorei</i>	10	20	15	0,676
46.	<i>Parascardovia denticolens</i>	10	5	0	0,349
47.	<i>Streptococcus downei</i>	0	5	0	0,362

48.	<i>Slackia exigua</i>	5	20	0	0,059
49.	<i>Actinomyces israelii</i>	5	0	5	0,596
50.	<i>Bifidobacterium longum</i>	5	0	0	0,362
51.	<i>Scardovia inopinata</i>	5	0	0	0,362
52.	<i>Streptococcus massiliensis</i>	5	0	0	0,362
53.	<i>Campylobacter rectus</i>	5	0	0	0,362

Statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u prisutnosti bakterijskih vrsta u mikrobiomu supragingivnog dentalnog biofilma koje se povezuju s karijesom utvrđene su za bakterijske vrste *Actinomyces gerencseriae* ($p=0,044$) i *Selenomonas sputigena* ($p=0,030$). *Actinomyces gerencseriae* je vrsta koja se najviše javljala u skupini pušača THS-a (95 % uzoraka), a najrjeđe u skupini pušača cigareta (65 % uzoraka). *Selenomonas sputigena* je najčešće detektirana u skupini nepušača (85 % uzoraka), a najrjeđe u skupini pušača cigareta (45 % uzoraka) (tablica 4.11).

Tablica 4.12. Prisutnost bakterija unutar mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma koje se mogu povezati s odsutnosti karijesa

Br.	Bakterije koje se povezuju sa stanjima odsutnosti karijesa	Učestalost pojave bakterije u uzorcima po ispitivanoj skupini			p
		Pušači THS-a (%)	Pušači cigareta (%)	Nepušači (%)	
1.	<i>Kingella oralis</i>	95	80	100	0,050
2.	<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	5	20	0,050
3.	<i>Selenomonas noxia</i>	90	100	100	0,126
4.	<i>Corynebacterium durum</i>	95	75	95	0,075
5.	<i>Porphyromonas catoniae</i>	95	90	90	0,804
6.	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	95	100	100	0,362
7.	<i>Neisseria oralis</i>	60	60	80	0,301
8.	<i>Neisseria elongata</i>	75	80	85	0,732
9.	<i>Cardiobacterium valvarum</i>	80	75	80	0,906
10.	<i>Prevotella melaninogenica</i>	95	80	85	0,364
11.	<i>Veillonella rogosae</i>	100	95	100	0,362
12.	<i>Streptococcus cristatus</i>	80	90	85	0,676
13.	<i>Streptococcus intermedius</i>	80	85	90	0,676

14.	<i>Neisseria flavescens</i>	70	75	70	0,921
15.	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	90	85	95	0,574
16.	<i>Streptococcus gordonii</i>	85	85	80	0,887
17.	<i>Campylobacter concisus</i>	70	80	75	0,766
18.	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	50	55	55	0,935
19.	<i>Streptococcus australis</i>	25	50	45	0,233
20.	<i>Streptococcus salivarius</i>	25	35	30	0,788
21.	<i>Streptococcus oralis</i>	30	35	40	0,803
22.	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	95	100	100	0,362
23.	<i>Rothia mucilaginosa</i>	30	5	15	0,102
24.	<i>Actinomyces meyeri</i>	20	10	10	0,562
25.	<i>Megasphaera micronuciformis</i>	10	20	0	0,108
26.	<i>Lactobacillus gasseri</i>	5	5	5	1,000
27.	<i>Lactococcus lactis</i>	5	5	0	0,596
28.	<i>Streptococcus ferus</i>	5	0	0	0,362
29.	<i>Prevotella nanceiensis</i>	0	0	5	0,362

Statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u prisutnosti bakterijskih vrsta u mikrobiomu supragingivnog dentalnog biofilma koje se povezuju s odsutnosti karijesa utvrđene su za bakterijske vrste *Kingella oralis* ($p=0,05$) i *Lactobacillus salivarius* ($p=0,05$). *Kingella oralis* je vrsta koja se najviše javljala u skupini nepušača (100% uzoraka), a najrjeđe u skupini pušača cigareta (80% uzoraka). *Lactobacillus salivarius* je vrsta koja se najviše javljala u skupini nepušača (20% uzoraka), rjeđe u skupini pušača cigareta (80% uzoraka), a u skupini pušača THS-a nije detektirana (tablica 4.12).

Tablica 4.13. Prisutnost bakterija unutar mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma koje se mogu podjednako povezati s prisutnosti i odsutnosti karijesa

Br.	Bakterije koje se povezuju sa stanjem prisutnosti/odsutnosti karijesa	Zastupljenost bakterije u uzorcima po ispitivanoj skupini			p
		Pušači THS-a (%)	Pušači cigareta (%)	Nepušači (%)	
1.	<i>Shuttleworthia satelles</i>	10	15	25	0,432
2.	<i>Abiotrophia defectiva</i>	50	70	65	0,400

Statistički značajne razlike u prisutnosti bakterija unutar mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma koje se mogu podjednako povezati sa stanjem prisutnosti i odsutnosti karijesa nisu pronađene između ispitivanih skupina (tablica 4.13).

4.6.7.2 Broj detektiranih vrsta koje se povezuju sa stanjima prisutnosti i odsutnosti karijesa

Broj detektiranih vrsta koje se povezuju s prisutnosti karijesnih lezija i vrsta koje se povezuju sa stanjima odsutnosti karijesnih lezija određen je pomoću zbrajanjem dihotomiziranih podataka o prisutnosti, odnosno odsutnosti pojedinih bakterijskih vrsta. Bakterijske vrste *Shuttleworthia satelles* i *Abiotrophia defectiva* nisu pribrojene u niti jednu kategoriju. Razlike su testirane pomoću Kruskal-Wallisovog testa.

Tablica 4.14. Broj bakterijskih vrsta koje se povezuju s prisutnosti i odsutnosti karijesa u sastavu mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilmova ispitivanih skupina

Varijabla (aritmetička sredina + std. dev.)	Skupina			p
	Pušači THS-a	Pušači cigareta	Nepušači	
Broj detektiranih vrsta koje se povezuju sa stanjima prisutnosti karijesa	27,65±6,24	28,55±5,66	28,40±5,51	0,591
Broj detektiranih vrsta koje se povezuju sa stanjima odsutnosti karijesa	16,60±2,68	16,60±12,56	16,85±2,44	0,600

Ispitivane skupine nisu se značajno razlikovale u broju prisutnih bakterijskih vrsta unutar mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma koje se povezuju sa stanjima prisutnosti i odsutnosti karijesa (tablica 4.14).

4.6.7.3 Broj detektiranih kariogenih i nekariogenih očitavanja u ispitivanim skupinama

Kariogeni potencijal mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilma procijenjen je usporedbom suma udjela ASV očitavanja koje odgovaraju bakterijskim vrstama povezanim sa stanjem

odsutnosti/prisutnosti karijesa od ukupnog broja detektiranih ASV očitavanja po ispitivanom uzorku. Razlike su testirane Kruskal-Wallisovim testom.

Tablica 4.15. Udio detektiranih ASV sekvenci koje odgovaraju bakterijskim vrstama koje se povezuju s prisutnosti i odsutnosti karijesa u sastavu mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilmova ispitivanih skupina

Varijabla (aritmetička sredina + std. dev.)	Skupina			p
	Pušači THS-a	Pušači cigareta	Nepušači	
Udio detektiranih očitavanja koje odgovaraju bakterijama povezanim s prisutnosti karijesa (%)	36,96±7,46	35,43±9,41	36,75±6,02	0,680
Udio detektiranih očitavanja koje odgovaraju bakterijama povezanim s odsutnosti karijesa (%)	25,09±7,18	24,43±9,72	24,71±7,90	0,600

Nisu pronađene statistički značajne razlike u ukupnim udjelima ASV sekvenci koje odgovaraju bakterijama povezanim sa stanjem prisutnosti/odsutnosti karijesa u ispitivanim skupinama (tablica 4.15).

4.6.7.4 Korelacije kliničkih parametara sa sastavom mikrobioma

Klinički parametri koji opisuju karijesnu aktivnost (KEP indeks, KEP indeks po plohi zuba, broj zubi s aktivnim karijesnim lezijama i broj ploha zuba s aktivnim karijesnim lezijama) koreliran je s udjelima ASV sekvenci bakterijskih vrsta povezanim sa stanjima odsutnosti/prisutnosti karijesa. Korelacija spomenutih parametara učinjena je metodom Spearmanove korelacije (ρ). U tablicama 4.16, 4.17, 4.18 i 4.19 su prikazane korelacije koje su pokazale statističku značajnost.

Tablica 4.16. Statistički značajne korelacije KEP indeksa s bakterijskim vrstama povezanim sa stanjima prisutnosti/odsutnosti karijesa

Klinički parametar	Bakterijska vrsta	Spearmanova korelacija ρ	p
KEP	<i>Leptotrichia wadei</i>	0,462	<0,001
	<i>Prevotella salivae</i>	0,290	0,024
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	-0,275	0,033
	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	0,265	0,041
	<i>Streptococcus gordonii</i>	0,263	0,042
	<i>Parvimonas micra</i>	-0,259	0,046
	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0,258	0,047

Bakterijske vrste *Leptotrichia wadei*, *Prevotella salivae*, *Capnocytophaga granulosa*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces odontolyticus* pokazale su pozitivnu korelaciju s KEP indeksom uz mali stupanj ($\rho < 0.4$) korelacije osim *Leptotrichia wadei* koja je pokazala umjeren stupanj korelacije ($0.4 < \rho < 0.6$). Bakterijske vrste *Fusobacterium periodonticum* i *Parvimonas micra* pokazale su negativnu korelaciju s KEP indeksom uz mali stupanj korelacije ($\rho < 0.4$) (tablica 4.16).

Tablica 4.17. Statistički značajne korelacije KEP indeksa po plohi zuba s bakterijskim vrstama povezanim sa stanjima prisutnosti/odsutnosti karijesa

Klinički parametar	Bakterijska vrsta	Spearmanova korelacija ρ	p
KEP po plohi zuba	<i>Leptotrichia wadei</i>	0,481	<0,001
	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0,327	0,011
	<i>Prevotella salivae</i>	0,326	0,011
	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	0,310	0,016
	<i>Streptococcus gordonii</i>	0,293	0,023
	<i>Actinomyces georgiae</i>	0,256	0,048

Bakterijske vrste *Leptotrichia wadei*, *Actinomyces odontolyticus*, *Prevotella salivae*, *Capnocytophaga granulosa*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces georgiae* pokazale su pozitivnu korelaciju s KEP indeksom po plohi zuba uz mali stupanj korelacije ($\rho < 0.4$) osim *Leptotrichia wadei* koja je pokazala umjeren stupanj korelacije ($0.4 < \rho < 0.6$) (tablica 4.17).

Tablica 4.18. Statistički značajne korelacije broja zuba s aktivnim karijesnim lezijama s bakterijskim vrstama povezanim sa stanjima prisutnosti/odsutnosti karijesa

Klinički parametar	Bakterijska vrsta	Spearmanova korelacija ρ	p
Zubi s aktivnim karijesnim lezijama	<i>Atopobium rimae</i>	0,368041	0,003814
	<i>Prevotella salivae</i>	0,336773	0,008511
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	-0,32313	0,011794
	<i>Streptococcus mutans</i>	0,312163	0,015176
	<i>Prevotella denticola</i>	0,301322	0,019305
	<i>Megasphaera micronuciformis</i>	0,29599	0,021664
	<i>Scardovia wiggisiae</i>	0,287914	0,025699
	<i>Selenomonas sputigena</i>	0,274795	0,033598
	<i>Prevotella histicola</i>	0,266739	0,039382

Bakterijske vrste *Atopobium rimae*, *Prevotella salivae*, *Streptococcus mutans*, *Prevotella denticola*, *Megasphaera micronuciformis*, *Scardovia wiggisiae*, *Selenomonas sputigena* i *Prevotella histicola* pokazale su pozitivnu korelaciju s brojem zuba s aktivnim karijesnim lezijama uz mali stupanj korelacije ($\rho < 0.4$). *Fusobacterium periodonticum* je pokazao negativnu korelaciju s brojem zubi s aktivnim karijesnim lezijama uz mali stupanj korelacije ($\rho < 0.4$) (tablica 4.18.).

Tablica 4.19. Statistički značajne korelacije broja zubnih ploha s aktivnim karijesnim lezijama s bakterijskim vrstama povezanim sa stanjima prisutnosti/odsutnosti karijesa

Klinički parametar	Bakterijska vrsta	Spearmanova korelacija ρ	p
Plohe zuba s aktivnim karijesnim lezijama	<i>Atopobium rimae</i>	0,368	0,004
	<i>Prevotella salivae</i>	0,341	0,007
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	-0,329	0,010
	<i>Streptococcus mutans</i>	0,312	0,015
	<i>Prevotella denticola</i>	0,297	0,021
	<i>Scardovia wiggsiae</i>	0,289	0,025
	<i>Megasphaera micronuciformis</i>	0,281	0,029
	<i>Selenomonas sputigena</i>	0,270	0,037

Bakterijske vrste *Atopobium rimae*, *Prevotella salivae*, *Streptococcus mutans*, *Prevotella denticola*, *Megasphaera micronuciformis*, *Scardovia wiggsiae* i *Selenomonas sputigena* pokazale su pozitivnu korelaciju s brojem zubnih ploha s aktivnim karijesnim lezijama uz mali stupanj korelacije ($\rho < 0.4$). *Fusobacterium periodonticum* je pokazao negativnu korelaciju s brojem zubnih ploha s aktivnim karijesnim lezijama uz mali stupanj korelacije ($\rho < 0.4$) (tablica 4.19).

5.RASPRAVA

5.1 Uzorak

Većinu ispitanika sačinjavale su osobe ženskog spola (87%) što ne daje reprezentativan omjer spolova u općoj populaciji. No ipak je bitno napomenuti da se takav nalaz slaže s rezultatima prethodnih studija provedenih na populaciji istih prostora [206]. Najvjerojatniji razlog tome jest veća motiviranost osoba ženskog spola za očuvanje općeg i dentalnog zdravlja [15, 16]. Dodatno ograničenje istraživanja bi moglo postojati zbog potencijalno različitog stupanja karijesne aktivnosti ispitanog uzorka i opće populacije. Prethodno iskustvo karijesnom procijenjeno pomoću KEP indeksa predstavlja dobar prediktor za procjenu rizika za nastanak karijesa [20]. Budući da ne postoji mnogo studija na Hrvatskoj populaciji koje su istraživale KEP indeks, a postojeće studije provedene su na specifičnim skupinama unutar opće populacije, nepouzdanost je rezultate ovog istraživanja uspoređivati s rezultatima takvih istraživanja. Na primjer, prethodno provedena studija provedena na ročnicima detektirala je medijan KEP indeksa 6, a slična studija provedena na skupini studenata dentalne medicine utvrdila je vrijednosti KEP indeksa čiji je medijan iznosio 5 [202]. Obje skupine pokazale su niže vrijednosti KEP indeksa nego ispitivane skupine u ovom istraživanju. Osim navedenih, postoji i istraživanje provedeno na odrasloj populaciji s područja grada Knina koja je utvrdila prosječnu vrijednost KEP indeksa koja je iznosila 17,3. Ovakav nalaz se pripisuje posljedicama rata 1990-ih godina, periodu ekonomske tranzicije i nedostatku nacionalnih programa za promociju i očuvanje oralnog zdravlja [207].

5.2 Navike pušenja

Rezultati ovog istraživanja su potencijalno pristrani budući da su duhanski proizvodi bazirani na zagrijavanju duhana prisutni na tržištu od 2014. godine [72] a postoji mogućnost da je većina pušača THS prethodno pušila cigarete barem 6 mjeseci prije trenutka od kada su uključeni u istraživanje. Ova mogućnost je vrlo vjerojatna budući da rezultati istraživanja ukazuju na znatno dulji pušački staž pušača cigareta nego pušača THS-a. (medijan 8 godina naspram 3 godine). Ta mogućnost je i potencijalno objašnjenje nepostojećih razlika u KEP indeksu i KEP indeksu po plohama između skupina pušača.

5.3 Kliničke karakteristike

Iako prikupljeni uzorak potencijalno ne prikazuje dovoljno dobro situaciju prisutnu u općoj populaciji, bitno je naglasiti da su pronađene značajne razlike u kliničkim parametrima između

ispitivanih skupina. Razlike su pronađene među parametrima koji se tiču salivarne razine bakterija *S. mutans* i *Lactobacillus spp.* te stupnja nakupljanja supragingivnog dentalnog biofilma (procijenjen FMPS indeksom). Rezultati nekolicine *in vitro* istraživanja potvrđuju da komponente cigaretnog dima, koje se isto tako nalaze i u sastavu aerosola nastalog iz sustava za zagrijavanje duhana, ali u različitim koncentracijama [71, 72], imaju utjecaj na bakterijsku proliferaciju, metabolizam, agregaciju stanica te proces formiranja biofilma. Utjecaj komponenti cigaretnog dima na spomenute bakterijske aktivnosti ovisi o koncentraciji pojedinih komponenti od kojih je najistraživanija nikotin [65-68]. Skupine pušača u ovom istraživanju imale su povišene vrijednosti kliničkih parametara koje opisuju spomenute bakterijske aktivnosti, iako neki nisu pokazivali značajnu razliku, pokazivali su tendenciju ka povišenim vrijednostima naspram skupine nepušača. Jedina iznimka pronađena je u salivarnoj razini bakterija *Lactobacillus spp.*, koja je bila povišena u skupini nepušača. Potencijalni uzrok tome je visok stupanj korelacije između salivarnog broja *Lactobacillus spp.* s količinom konzumiranih ugljikohidrata [205], i iako značajna razlika nije pronađena, skupina nepušača je pokazala tendenciju da konzumira veći broj obroka u danu naspram dvaju skupina pušača. Moguće objašnjenje leži u činjenici da pušenje suprimira apetit te da nepušači, kada su se nalaze u stanjima povišenog stresa postaju skloni konzumaciji većeg broja međuobroka [208-210]. Navedeno treba oprezno shvatiti, budući da postoje studije čiji rezultati sugeriraju da cigaretni dim utječe na aktivnost *Lactobacillus spp.*, a uvelike ovisi o koncentraciji nikotina [211-213].

Količina salivacije i pH sline značajno su bili sniženi u skupinama pušača naspram skupine nepušača. Ovakvi rezultati potvrđuju nalaz prethodnih studija [214, 215], iako su vrijednosti količine izlučene sline pušača u ovoj studiji bile niže nego vrijednosti pronađene u sličnoj studiji [216]. Također je važno naglasiti da je kvantum salivacije u ovom istraživanju procijenjen kliničkim testom stimuliranog kvantuma salivacije, iako je je količinu izlučene sline bolje procijeniti putem testa nestimuliranog kvantuma salivacije budući da bolje prikazuje stupanj bazalnog izlučivanja sline [217]. Spomenuto je učinjeno iz razloga što su rezultati stimuliranog kvantuma salivacije potrebni parametar u procjeni karijes rizika pomoću Cariogram aplikacije [142].

5.4 Procjena karijes rizika

Ako bi se procjena karijes rizika temeljila na zasebnoj analizi kliničkih parametara koji opisuju čimbenike rizika za nastanak karijesa, moglo bi se utvrditi da skupine pušača posjeduju značajno veći stupanj rizika za nastanak karijesa od skupine nepušača. Radi preciznije procjene, i činjenice da je etiologija nastanka karijesnih lezija multifaktorijalne prirode, na ispitanicima je provedena procjena karijes rizika Cariogram metodom putem istoimene računalne aplikacije. Iako postoje brojne relevantne metode procjene karijes rizika koje uzimaju u obzir više rizičnih i protektivnih čimbenika za nastanak karijesa, za procjenu je odabrana Cariogram metoda budući da je najčešće korištena metoda u znanstvenim istraživanjima. Dodatni razlog je što su za procjenu prethodnog karijes iskustva karijesom putem KEP indeksa i KEP indeksa po plohi zuba prethodne studije, koje su u svojoj metodologiji koristile Cariogram metodu, također su koristile WHO sustav kriterija za detekciju karijesnih lezija, a isti je sustav kriterija korišten i u ovom istraživanju [140, 146]. Glavni je benefit korištenja metoda za procjenu karijes rizika kao što je Cariogram u tome što u svoju procjenu istovremeno uključuju više rizičnih i protektivnih čimbenika za nastanak karijesa te na taj način izbjegavaju mogućnost korelacije isključivo jednog čimbenika s potencijalno većim rizikom za nastanak karijesnih lezija.

5.5 Mikrobiom supragingivnog dentalnog biofilma

Bakterijski sastav supragingivnog dentalnog biofilma pod utjecajem je brojnih okolišnih čimbenika i promjene u bakterijskom sastavu mogu izazvati pojavu karijesa i parodontnih bolesti [29].

U ovom istraživanju nisu pronađene značajne razlike između skupinama pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača u metrikama koje opisuju bakterijsku raznolikost (Alfa i Beta raznolikost), a razlog tome su veličina i disperzija ispitivanog uzorka na što ukazuju brojne metagenomske studije [218]. Usprkos tome pronađene su statistički značajne razlike u zastupljenosti pojedinih bakterija u sastavu mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilmova na višim i nižim taksonomskim razinama što se može pripisati uparivanju ispitanika u ispitivanim skupinama, te velikom broju faktora uključivanja i isključivanja u studiju [219].

Usporedbe mikrobioma ispitivanih skupina pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača učinjene heat tree analizama otkrile su značajne razlike u nekoliko taksonomskih linija. Ipak, ukazane razlike treba uzeti s rezervom budući da zbog vrste provedenog istraživanja (presječna studija) nije

moгуće potvrditi uzročno posljedične veze odnosno je li konzumacija određenog duhanskog proizvoda uzrok razlikama u mikrobiomima supragingivnog dentalnog biofilma.

Usporedba mikrobioma pušača THS-a i nepušača ukazala je na veću bakterijsku raznolikost i brojnost u korist pušača THS-a. Spomenuto se najviše odnosi na bakterije iz obitelji *Rhodospirillaceae*, *Spirochetaceae*, *Propionibacteriaceae* i *Ardenscatenaceae*. Bakterije iz roda *Rhodospirillaceae* spadaju u fakultativne anaerobe koji preferiraju anaerobne uvjete. Ovi mikroorganizmi imaju izuzetno prilagodljiv metabolizam u sklopu kojeg posjeduju nekolicinu metaboličkih puteva razgradnje glukoze i posljedično tome proizvodnje kiselina [220]. Slično se ponašaju i bakterije iz obitelji *Spirochetaceae* budući da su uglavnom obligatni anaerobi ili fakultativni anaerobi, koji za proizvodnju energiju metaboliziraju saharozu [221]. Obitelj *Propionibacteriaceae* također pokazuje slična svojstva, radi se o anaerobnim bakterijama koje svojim metabolizmom proizvode propionsku kiseline posljedično snižavajući pH razinu biofilma u kojem se nalaze [222]. Povećana brojnost i zastupljenost ovih obitelji ukazuje na povećanu zastupljenost anaerobnih bakterija u pušača THS-a naspram nepušača. Potencijalni uzrok tome je stvaranje anaerobnih i mikroaerofilnih uvjeta okoline u ranim fazama stvaranja biofilma koji mogu pospješiti vezivanje ranih kolonizatora koji će omogućiti povećanu agregaciju anaerobnih vrsta u strukturu biofilma. Posljedično tome može se pretpostaviti da će supragingivni dentalni biofilm pušača THS-a imati veći patogeni, odnosno kariogeni potencijal nego supragingivni dentalni biofilm nepušača. To potvrđuje i nalaz povećane brojnosti i zastupljenosti bakterija iz obitelji *Campylobacter* u skupini nepušača. Radi se o mikroaerofilnim bakterijama čija se prisutnost u usnoj šupljini uglavnom povezuje sa stanjima odsutnosti karijesa [173, 223]. U mikrobiomu pušača THS-a također je pronađena povećana zastupljenost i brojnost bakterija iz obitelji *Ardenscatenaceae*. Radi se o termofilnim bakterijama što može ukazivati na stimulativni učinak THS-a na ove bakterije zbog povišenja temperature u usnoj šupljini prilikom konzumacije [224].

Slične rezultate pokazala je usporedba mikrobioma pušača cigareta i nepušača. U skupini pušača detektirano je više bakterija iz obitelji *Rhodobacteriaceae*, *Rhodospirillaceae* i *Sphingomonadaceae*. Sve navedene obitelji obuhvaćaju bakterije koje su striktni ili fakultativni anaerobi, a imaju sposobnost stvaranja ekstracelularnih polisaharida što su svojstva kariogenih bakterija [220, 225, 226]. Također, rezultati ove analize ukazuju da su termofilne bakterije iz

obitelji *Ardenscatenaceae* i *Thermogemmatisporaceae* bile zastupljenije u skupini pušača cigareta nego u skupini nepušača [227].

Povećana zastupljenost različitih obitelji termofilnih bakterija u skupinama pušača THS-a i cigareta naspram skupine nepušača potencijalno ukazuje na tendenciju da različiti porasti temperature prilikom konzumacije THS-a i cigareta mogu imati različit utjecaj na mikrobiom supragingivnog dentalnog biofilma. Uzrok tome jesu različite temperature izgaranja (konzumacija cigareta) i zagrijavanja duhana razlikuju (konzumacija THS-a) razlikuju [72]. Usprkos tome, bitno je napomenuti da usporedbom mikrobioma pušača i nepušača nisu pronađene značajne razlike u zastupljenosti termofilnih bakterija između skupine pušača THS-a i pušača cigareta.

Dodatno, usporedbe mikrobioma pušača THS-a i pušača cigareta ukazale su na veću zastupljenost obitelj *Propionibacteriaceae* u skupini pušača THS-a nego u pušača cigareta, a za bakterije iz obitelji *Rhodobacteriaceae* vrijedi obrnuto. Ovakav nalaz potencijalno potvrđuje rezultate *in vitro* istraživanja koje navode različit utjecaj koncentracija komponenti cigaretnog dima na bakterije u supragingivnom dentalnom biofilmu [65-68]. Potencijalno štetniji učinak cigareta potvrđuje nalaz većeg broja bakterija iz obitelji *Carnobacteriaceae*, *Aerococcaceae* i reda *Bacillales*. Radi se uglavnom o fakultativnim anaerobima koji imaju sposobnost produkcije mliječne kiseline metaboliziranjem ugljikohidrata što je svojstvo kariogenih bakterija (acidogenost)[228, 229].

Razlike između ispitivanih skupina također su pronađene i na razini roda. Potencijalno različiti utjecaj konzumacije THS i duhanskih proizvoda na sastav supragingivnog dentalnog biofilma potvrđuju i rezultati analize provedene na razini roda budući da su rodovi *Allysiella* i *Propionibacterium* bili najzastupljeniji u skupini pušača THS-a, a rodovi *Avibacterium* i *Haemophilus* su najviše detektirani u skupini nepušača. Stupanj kariogenih potencijala supragingivnih dentalnih biofilmova na razini roda ne može se u potpunosti potvrditi budući da su neki kariogeni rodovi bili zastupljeniji u skupini nepušača (*Actinobaculum*), a pojedini zastupljeni u skupinama pušača (*Propionibacterium*).

Rezultati istraživanja su utvrdili prisutnosti bakterijskog roda *Avibacterium* u čiji sastav spadaju mikroaerofilne gram negativne bakterije, a prethodno nije opisan u sastavu supragingivnog dentalnog biofilma.

Rezultati ovog istraživanja negiraju rezultate dviju *in vitro* studija koje negiraju učinak komponenti cigaretnog dima na rodove *Propionibacterium* i *Haemophilus* [230, 231]. Potencijalno objašnjenje može se pripisati utjecaju više okolišnih čimbenika koji utječu na metabolizam i aktivnost ovih bakterija u kliničkim uvjetima. Ovakvi rezultati ukazuju na važnost kliničkih studija u istraživanju okolišnih čimbenika koje za razliku *in vitro* studija, istražuju realno stanje u mikrobiomu supragingivnog dentalnog biofilma, kao specifične niše unutar usne šupljine.

Usporedba sastava supragingivnih mikrobioma na nivou vrste ukazuju na utjecaj duhanskih proizvoda na bakterijsku raznolikost budući da su različite bakterijske vrste različito zastupljene u ispitivanim skupinama. Potrebno je napomenuti da bakterije u čijim su zastupljenostima pronađene značajne razlike zauzimaju mali udio unutar svih bakterijskih vrsta mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma, ali predstavljaju dio mikrobioma te pridonose i mijenjaju ukupni metabolizam i biodinamiku biofilma [232]. Bakterijske vrste čija se zastupljenost između ispitivanih skupina značajno razlikuje povezuju se sa stanjima odsutnosti karijesa, a to su *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, *Haemophilus parainfluenze* i *Kingella oralis*. Rezultati ukazuju da određene nekariogene vrste mogu biti zastupljenije u mikrobiomima supragingivnog dentalnog biofilma pušača THS-a (*Kingella oralis* i *Streptococcus thermophilus*) nego u nepušača.

Dodatno, rezultati potvrđuju nalaze prethodne studije koja povezuju bakteriju *Prevotella pleuritidis* s pušenjem duhanskih proizvoda. Istraživanje ukazuje da se prisutnost spomenute bakterije u oralnim biofilmovima povezuje s ranim razvojem reumatoidnog artritisa, što bi moglo implicirati da pušenje pogotovo THS-a (u čijoj je skupini zastupljenost bila najviša) povećava rizik za nastanak bolesti [233]. Dodatno rezultati ukazuju na prisutnost bakterijskih vrsta u nepušača koje do sada nisu bile detektirane u sastavu supragingivnog dentalnog biofilma, a to su: *Avibacterium paragallinarum* i *Streptococcus caballi*. Takvi rezultati upućuju na vrijednost provedbe istraživanja na razini vrste što u metagenomskim istraživanjima nije generalna praksa.

Karakterizacija bakterija kao bakterije koje se povezuju s karijesom i bakterije koje se ne povezuju s karijesom te analize učestalosti njihove detekcije i broja očitavanja u uzorcima pojedine skupine nije ukazala da neka od ispitivanih skupina ima značajno veći kariogeni potencijal supragingivnog dentalnog biofilma. Također, rezultati ovih analiza predlažu da konzumacija ili ne konzumacija nekog od ispitivanih duhanskih proizvoda nema utjecaja na brojnost vrsta koje se povezuju i ne povezuju s karijesom i njihovu zastupljenost u supragingivnom dentalnom biofilmu iako su

određene vrste bile češće detektirane u uzorcima pojedine skupine (*Actynomices gerenceseriae* (THS), *Selenomonas sputigena* (Nepušači), *Kingella oralis* (nepušači), *Lactobacillus salivarius* (nepušači).

Kako bi se utvrdila povezanost prisutnosti neke bakterije s karijesnom aktivnošću ispitanika učinjeni su testovi korelacije kliničkih čimbenika koji opisuju iskustvo karijesom/karijesnu aktivnost (KEP, KEP indeks po plohi zuba, broj zuba s aktivnom karijesnom lezijom, broj ploha zuba s aktivnom karijesnom lezijom). Rezultati ove analize ukazali su na postojeću povezanost zastupljenosti većeg broja bakterija sa spomenutim parametrima. Ovakav rezultat potvrđuje multifaktorijalnu prirodu karijesa kao bolesti[2].

5.6 Ograničenja studije

Budući da je istraživanje provedeno po modelu presječne studije nije moguće potvrditi postojanje uzročno-posljedične veze između pušenja, bilo cigareta ili THS-a s kliničkim parametrima koji utječu ili su pokazatelji karijesne aktivnosti. Studija također ima nekoliko ograničenja. Istraživani uzorak sačinjen je od pacijenata koju su upućeni na specijalistički pregled i/ili terapiju što ukazuje na postojanje dentalnih problema u ispitanika. Zbog toga postoji mogućnost da su se klinički i mikrobiološki parametri ispitanika bitno razlikovali od nalaza u općoj populaciji.

Dodatno ograničenje ovog istraživanja je što nije postojala mogućnost praćenja sustavnih razina nikotina te stoga nije bilo moguće analizirati potencijalne korelacije s kliničkim parametrima. Stoga bi se buduće studije trebale usredotočiti na praćenje sustavne razine nikotina prilikom praćenja i analiziranja kliničkih parametara i njihove ovisnosti o konzumaciji duhanskih proizvoda, što nije učinjeno u ovom istraživanju.

5. ZAKLJUČCI

5.1 Sastavi bakterijskih mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilмова pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača se razlikuju

Analize sastava mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma ukazale su na značajne razlike u bakterijskim sastavima ispitivanih skupina, ali zbog prirode studije nije moguće potvrditi jesu li pronađene razlike posljedica konzumacije ili ne konzumacije nekog od ispitivanih duhanskih proizvoda. Rezultati ukazuju na povećanu zastupljenost anaerobnih i termofilnih bakterija u skupinama pušača. Anaerobne bakterije koje su zastupljenije u skupinama pušača češće se povezuju sa stanjima prisutnosti karijesa. Stoga se može potvrditi hipoteza da supragingivni dentalni biofilmovi pušača THS-a i cigareta imaju veći kariogeni potencijal od nego supragingivni dentalni biofilm nepušača.

5.2. Izgledi za izbjegavanje nastanka novih karijesnih lezija pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača se ne razlikuju, ali postoje razlike u kliničkim parametrima koji imaju ulogu razvoju bolesti

Iako Cariogram analiza nije otkrila značajne razlike u izgledima za nastanak novih karijesnih lezija između ispitivanih skupina rezultati ovog istraživanja upućuju da konzumacija cigareta i THS-a imaju utjecaja na kliničke karakteristike koje predstavljaju protektivne i rizične čimbenike u procesu nastanka karijesa (stupanj nakupljanja biofilma i snižene vrijednosti pH sline). Konzumacija cigareta povezana je s povećanom salivarnom razinom bakterije *S. mutans*, dok je konzumacija THS-a povezana sa smanjenom količinom izlučene sline i reduciranim brojem *Lactobacillus spp.*. Inicijalna hipoteza može se djelomično potvrditi, budući da su dvije skupine pušača pokazale sličnosti u kliničkim karakteristikama, a značajno su se razlikovale od skupine nepušača (klinički parametri koji se tiču sline).

5.3 Klinički parametri koji opisuju iskustvo karijesom i karijesnu aktivnost povezani su sastavom bakterijskog mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma

Korelacije kliničkih parametara koje opisuju stanja prisutnosti karijesa (KEP indeks, KEP indeks po plohi zuba, broj aktivnih karijesnih lezija i broj aktivnih karijesnih lezija po plohi zuba) i zastupljenosti bakterijskih vrsta ukazale su povezanost nekolicine bakterijskih vrsta (*Leptotrichia wadei*, *Prevotella salivae*, *Capnocytophaga granulosa*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Atopobium rimae*, *Prevotella salivae*, *Streptococcus mutans*, *Prevotella denticola*,

Megasphaera micronuciformis, *Scardovia wiggisiae*, *Selenomonas sputigena* i *Prevotella histicola* s karijesom. Mali stupanj Spearmanove korelacije ($\rho < 0.4$) koji je pronađen za spomenute vrste potvrđuje prirodu karijesa kao multifaktorijalne bolesti i činjenicu da ne postoji jedan uzročnik bolesti.

5.4 Preporuke za buduća istraživanja

U budućnosti potrebno je provoditi studije koje će dodatno pružiti uvid u raznolikost i bogatstvo mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma i istražiti povezanost kliničkih parametara s njegovim sastavom.

6. LITERATURA

- [1] Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD. Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J*. 2021 Dec;231(12):749-753.
- [2] Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, i sur. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 May 25;3:17030.
- [3] Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian J Pediatr*. 2018 Mar;85(3):202-206.
- [4] O. Fejerskov, B. Nyvad, E. Kidd, Y. Blackwell. *Dental Caries The Disease and Its Clinical Management Third Edition*. Oxford. Willey Blackwell.2015.
- [5] Meyer-Lueckel H, Paris S, Ekstrand KR. *Caries Management Scienceand Clinical Practice*. Stuttgart-New York. Thieme. 2013.
- [6] Šutalo J i sur. *Patologija I terapija tvrdih zubnih tkiva*. Zagreb. Naklada Zadro.1994.
- [7] Dayo AF, Wolff MS, Syed AZ, Mupparapu M. Radiology of Dental Caries. *Dent Clin North Am*. 2021 Jul;65(3):427-445.
- [8] Pitts NB, Ekstrand KR; ICDAS Foundation. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013 Feb;41(1):e41-52.
- [9] Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci*. 2018;27:1-10.
- [10] Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008;42(6):409-18.
- [11] Martignon S, Roncalli AG, Alvarez E, Aránguiz V, Feldens CA, Buzalaf MAR. Risk factors for dental caries in Latin American and Caribbean countries. *Braz Oral Res*. 2021 May 28;35(suppl 01):e053.

- [12] Opal S, Garg S, Jain J, Walia I. Genetic factors affecting dental caries risk. *Aust Dent J*. 2015 Mar;60(1):2-11.
- [13] Watt RG, Sheiham A. Integrating the common risk factor approach into a social determinants framework. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2012 Aug;40(4):289-96.
- [14] Schwendicke F, Dörfer CE, Schlattmann P, Foster Page L, Thomson WM, Paris S. Socioeconomic inequality and caries: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2015 Jan;94(1):10-8.
- [15] Mamai-Homata E, Koletsi-Kounari H, Margaritis V. Gender differences in oral health status and behavior of Greek dental students: A meta-analysis of 1981, 2000, and 2010 data. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016 Jan-Feb;6(1):60-8.
- [16] Onyejaka NK, Folayan MO, Folaranmi N. Barriers and facilitators of dental service utilization by children aged 8 to 11 years in Enugu State, Nigeria. *BMC Health Serv Res*. 2016 Mar 15;16:93.
- [17] Corrêa-Faria P, Paixão-Gonçalves S, Paiva SM, Pordeus IA. Incidence of dental caries in primary dentition and risk factors: a longitudinal study. *Braz Oral Res*. 2016 May 20;30(1):S1806-83242016000100254.
- [18] Usuga-Vacca M, Marin-Zuluaga DJ, Castellanos JE, Martignon S. Association between root/coronal caries and individual factors in institutionalised elderly using ICDAS severity and activity. *BMC Oral Health*. 2021 Mar 23;21(1):146.
- [19] Ribeiro AA, Azcarate-Peril MA, Cadenas MB, Butz N, Paster BJ, Chen T, Bair E, Arnold RR. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. *PLoS One*. 2017 Jul 5;12(7):e0180621.
- [20] Aboubakr RM, Alkhadragy DM, Okda MMES, Rady HWM, Elnagar RM. Predictors of Caries Risk among Egyptian Children Attending Pediatric Dental Clinics at a University Hospital. *Saudi J Med Med Sci*. 2023 Jul-Sep;11(3):219-228.
- [21] Pyati SA, Naveen Kumar R, Kumar V, Praveen Kumar NH, Parveen Reddy KM. Salivary Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Total Protein, Oxidative Stress and Antioxidant

- Capacity in Children with and without Dental Caries. *J Clin Pediatr Dent.* 2018;42(6):445-449.
- [22] Berman N, Vivino F, Baker J, Dunham J, Pinto A. Risk factors for caries development in primary Sjogren syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2019 Aug;128(2):117-122.
- [23] Diéguez-Pérez M, de Nova-García MJ, Mourelle-Martínez MR, Bartolomé-Villar B. Oral health in children with physical (Cerebral Palsy) and intellectual (Down Syndrome) disabilities: Systematic review I. *J Clin Exp Dent.* 2016 Jul 1;8(3):e337-43.
- [24] Bjarnsholt T, Buhlin K, Dufrêne YF i sur. Gomelsky M, Moroni A, Ramstedt M, Rumbaugh KP, Schulte T, Sun L, Åkerlund B, Römmling U. Biofilm formation - what we can learn from recent developments. *J Intern Med.* 2018 Oct;284(4):332-345.
- [25] Schüller IM, Haberstroh S, Dawczynski K, Lehmann T, Heinrich-Weltzien R. Dental Caries and Developmental Defects of Enamel in the Primary Dentition of Preterm Infants: Case-Control Observational Study. *Caries Res.* 2018;52(1-2):22-31.
- [26] Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007 Jan 6;369(9555):51-9.
- [27] Santacroce L, Passarelli PC, Azzolino D, Bottalico L, Charitos IA, Cazzolla AP, Colella M, Topi S, Godoy FG, D'Addona A. Oral microbiota in human health and disease: A perspective. *Exp Biol Med (Maywood).* 2023 Aug;248(15):1288-1301.
- [28] Baker JL, Mark Welch JL, Kauffman KM, McLean JS, He X. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. *Nat Rev Microbiol.* 2024 Feb;22(2):89-104
- [29] Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010 Jul;54(3):441-54.
- [30] Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018 Mar;26(3):229-242.
- [31] Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011 Sep-Oct;2(5):435-44.

- [32] Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res.* 2011;14(2):87-94.
- [33] Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011 Sep-Oct;2(5):435-44.
- [34] Fischer NG, Aparicio C. The salivary pellicle on dental biomaterials. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021 Apr;200:111570.
- [35] Luo J, Wang Y, Wang K, Jiang W, Li X, Zhang L. Comparative proteomic analysis on acquired enamel pellicle at two time points in caries-susceptible and caries-free subjects. *J Dent.* 2020 Mar;94:103301.
- [36] Bennick A. The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein C, and comparison with calcium binding to protein A, a related salivary phosphoprotein. *Biochem J.* 1977 May 1;163(2):241-5.
- [37] Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Adv Colloid Interface Sci.* 2018 Nov;261:1-14.
- [38] Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1311-8.
- [39] Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 2019 Jan;7(1):10.1128.
- [40] Jakubovics NS, Goodman SD, Mashburn-Warren L, Stafford GP, Cieplik F. The dental plaque biofilm matrix. *Periodontol 2000.* 2021 Jun;86(1):32-56.
- [41] Periasamy S, Kolenbrander PE. Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol.* 2010 Jun;192(12):2965-72.
- [42] He Z, Huang Z, Zhou W, Tang Z, Ma R, Liang J. Anti-biofilm Activities from Resveratrol against *Fusobacterium nucleatum*. *Front Microbiol.* 2016 Jul 5;7:1065.

- [43] Zijnge V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. PLoS One. 2010 Feb 24;5(2):e9321.
- [44] Buzza KM, Pluen A, Doherty C, Cheesapcharoen T, Singh G, Ledder RG, Sreenivasan PK, McBain AJ. Modulation of Biofilm Formation and Permeability *in* Streptococcus mutans during Exposure To Zinc Acetate. Microbiol Spectr. 2023 Feb 21;11(2):e0252722.
- [45] Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. Nat Rev Microbiol. 2020 Oct;18(10):571-586.
- [46] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA. Bacterial biofilm and associated infections. J Chin Med Assoc. 2018 Jan;81(1):7-11.
- [47] Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern? Front Microbiol. 2019 Mar 22;10:587.
- [48] Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2017 May 1;41(3):276-301.
- [49] Diaz PI, Valm AM. Microbial Interactions in Oral Communities Mediate Emergent Biofilm Properties. J Dent Res. 2020 Jan;99(1):18-25.
- [50] Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. J Clin Periodontol. 2017 Mar;44 Suppl 18:S12-S22.
- [51] Fine DH, Schreiner H. Oral microbial interactions from an ecological perspective: a narrative review. Front Oral Health. 2023 Sep 13;4:1229118.
- [52] Zhou P, Manoil D, Belibasakis GN, Kotsakis GA. Veillonellae: Beyond Bridging Species in Oral Biofilm Ecology. Front Oral Health. 2021 Oct 29;2:774115.
- [53] Zeng X, Zou Y, Zheng J, Qiu S, Liu L, Wei C. Quorum sensing-mediated microbial interactions: Mechanisms, applications, challenges and perspectives. Microbiol Res. 2023 Aug;273:127414.

- [54] Valm AM. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *J Mol Biol.* 2019 Jul 26;431(16):2957-2969.
- [55] Jiang S, Gao X, Jin L, Lo EC. Salivary Microbiome Diversity in Caries-Free and Caries-Affected Children. *Int J Mol Sci.* 2016 Nov 25;17(12):1978.
- [56] Fakhruddin KS, Ngo HC, Samaranayake LP. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. *Oral Dis.* 2019 May;25(4):982-995.
- [57] Kado I, Hisatsune J, Tsuruda K, Tanimoto K, Sugai M. The impact of fixed orthodontic appliances on oral microbiome dynamics in Japanese patients. *Sci Rep.* 2020 Dec 15;10(1):21989.
- [58] Chen X, Daliri EB, Tyagi A, Oh DH. Cariogenic Biofilm: Pathology-Related Phenotypes and Targeted Therapy. *Microorganisms.* 2021 Jun 16;9(6):1311.
- [59] Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Dec;16(12):745-759.
- [60] Spatafora G, Li Y, He X, Cowan A, Tanner ACR. The Evolving Microbiome of Dental Caries. *Microorganisms.* 2024 Jan 7;12(1):121.
- [61] Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol.* 1998 Apr;25(4):297-305.
- [62] Aguilar-Zinser V, Irigoyen ME, Rivera G, Maupomé G, Sánchez-Pérez L, Velázquez C. Cigarette smoking and dental caries among professional truck drivers in Mexico. *Caries Res.* 2008;42(4):255-62.
- [63] Petersson GH, Twetman S. Tobacco use and caries increment in young adults: a prospective observational study. *BMC Res Notes.* 2019 Apr 11;12(1):218.
- [64] Jiang X, Jiang X, Wang Y, Huang R. Correlation between tobacco smoking and dental caries: A systematic review and meta-analysis. *Tob Induc Dis.* 2019 Apr 19;17:34.
- [65] Huang R, Li M, Gregory RL. Effect of nicotine on growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. *Eur J Oral Sci.* 2012 Aug;120(4):319-25.

- [66] Huang R, Li M, Gregory RL. Nicotine promotes *Streptococcus mutans* extracellular polysaccharide synthesis, cell aggregation and overall lactate dehydrogenase activity. *Arch Oral Biol.* 2015 Aug;60(8):1083-90.
- [67] Rouabhia M, Semlali A. Electronic cigarette vapor increases *Streptococcus mutans* growth, adhesion, biofilm formation, and expression of the biofilm-associated genes. *Oral Dis.* 2021 Apr;27(3):639-647.
- [68] El-Ezmerli NF, Gregory RL. Effect of nicotine on biofilm formation of *Streptococcus mutans* isolates from smoking and non-smoking subjects. *J Oral Microbiol.* 2019 Sep 13;11(1):1662275.
- [69] Al Kawas S, Al-Marzooq F, Rahman B, Shearston JA, Saad H, Benzina D, Weitzman M. The impact of smoking different tobacco types on the subgingival microbiome and periodontal health: a pilot study. *Sci Rep.* 2021 Jan 13;11(1):1113
- [70] Al-Marzooq F, Al Kawas S, Rahman B, Shearston JA, Saad H, Benzina D, Weitzman M. Supragingival microbiome alternations as a consequence of smoking different tobacco types and its relation to dental caries. *Sci Rep.* 2022 Feb 21;12(1):2861.
- [71] Schaller JP, Keller D, Poget L, I sur. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016 Nov 30;81 Suppl 2:S27-S47.
- [72] Başaran R, Güven NM, Eke BC. An Overview of iQOS[®] as a New Heat-Not-Burn Tobacco Product and Its Potential Effects on Human Health and the Environment. *Turk J Pharm Sci.* 2019 Sep;16(3):371-374.
- [73] Kumar PS, Clark P, Brinkman MC, Saxena D. Novel Nicotine Delivery Systems. *Adv Dent Res.* 2019 Oct;30(1):11-15.
- [74] Amarasinghe SL, Su S, Dong X, Zappia L, Ritchie ME, Gouil Q. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biol.* 2020 Feb 7;21(1):30.
- [75] Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015 Oct;13(5):278-89.

- [76] Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, Thakare RP, Banday S, Mishra AK, Das G, Malonia SK. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel)*. 2023 Jul 13;12(7):997.
- [77] Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016 Jan;107(1):1-8.
- [78] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- [79] Hilt EE, Ferrieri P. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. *Genes (Basel)*. 2022 Aug 31;13(9):1566.
- [80] Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet*. 2010 Oct 15;19(R2):R227-40.
- [81] Regueira-Iglesias A, Balsa-Castro C, Blanco-Pintos T, Tomás I. Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis. *Mol Oral Microbiol*. 2023 Oct;38(5):347-399.
- [82] Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Feb;74(2):560-4.
- [83] Ansorge W, Sproat BS, Stegemann J, Schwager C. A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *J Biochem Biophys Methods*. 1986 Dec;13(6):315-23.
- [84] Luckey JA, Drossman H, Kostichka AJ, Mead DA, D'Cunha J, Norris TB, Smith LM. High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1990 Aug 11;18(15):4417-21.
- [85] Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*. 1987 Oct 16;238(4825):336-41.
- [86] Swerdlow H, Gesteland R. Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 1990 Mar 25;18(6):1415-9.

- [87] Hunkapiller T, Kaiser RJ, Koop BF, Hood L. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science*. 1991 Oct 4;254(5028):59-67.
- [88] Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May 25;94(3):441-8.
- [89] Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998 Jul 17;281(5375):363, 365.
- [90] Hyman ED. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem*. 1988 Nov 1;174(2):423-36.
- [91] Margulies M, Egholm M, Altman WE I sur. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):376-80.
- [92] Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1996 Nov 1;242(1):84-9.
- [93] Nyrén P, Pettersson B, Uhlén M. Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal Biochem*. 1993 Jan;208(1):171-5.
- [94] Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD, Church GM. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*. 2005 Sep 9;309(5741):1728-32.
- [95] McKernan KJ, Peckham HE, Costa GL I sur. Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Res*. 2009 Sep;19(9):1527-41.
- [96] Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM i sur. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 20;475(7356):348-52.
- [97] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP i sur. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):53-9.
- [98] Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):641-58.

- [99] Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res.* 2006 Feb 9;34(3):e22.
- [100] Levene MJ, Korlach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science.* 2003 Jan 31;299(5607):682-6.
- [101] Branton D, Deamer DW, Marziali A i sur. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008 Oct;26(10):1146-53.
- [102] Haque F, Li J, Wu HC, Liang XJ, Guo P. Solid-State and Biological Nanopore for Real-Time Sensing of Single Chemical and Sequencing of DNA. *Nano Today.* 2013 Feb;8(1):56-74.
- [103] Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol.* 2021 Nov;82(11):801-811.
- [104] Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, i sur. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002824.
- [105] Salipante SJ, Kawashima T, Rosenthal C i sur. Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Dec;80(24):7583-91.
- [106] Naccache SN, Federman S, Veeraraghavan N i sur. A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. *Genome Res.* 2014 Jul;24(7):1180-92.
- [107] Regueira-Iglesias A, Vázquez-González L, Balsa-Castro C i sur. Impact of 16S rRNA Gene Redundancy and Primer Pair Selection on the Quantification and Classification of Oral Microbiota in Next-Generation Sequencing. *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 13;11(2):e0439822.
- [108] Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY i sur. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun.* 2019 Nov 6;10(1):5029.

- [109] Martinez-Porchas M, Villalpando-Canchola E, Ortiz Suarez LE, Vargas-Albores F. How conserved are the conserved 16S-rRNA regions? *PeerJ*. 2017 Feb 28;5:e3036.
- [110] Kalayinia S, Goodarzynejad H, Maleki M, Mahdih N. Next generation sequencing applications for cardiovascular disease. *Ann Med*. 2018 Mar;50(2):91-109.
- [111] Kanagal-Shamanna R. Emulsion PCR: Techniques and Applications. *Methods Mol Biol*. 2016;1392:33-42.
- [112] Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4438-41.
- [113] Seow WK, Lam JH, Tsang AK, Holcombe T, Bird PS. Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent*. 2009 Nov;19(6):406-11.
- [114] Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Kawada M, Koga T. Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*. 2003 Feb;41(2):863-6.
- [115] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR i sur. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019 Aug;37(8):852-857.
- [116] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016 Jul;13(7):581-3.
- [117] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T i sur. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Dec;75(23):7537-41.
- [118] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010 Oct 1;26(19):2460-1.

- [119] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*. 2013 Oct;10(10):996-8.
- [120] Regueira-Iglesias A, Vázquez-González L, Balsa-Castro C, Blanco-Pintos T, Martín-Biedma B, Arce VM, Carreira MJ, Tomás I. *In-Silico* Detection of Oral Prokaryotic Species With Highly Similar 16S rRNA Sequence Segments Using Different Primer Pairs. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Feb 9;11:770668.
- [121] Nearing JT, Douglas GM, Comeau AM, Langille MGI. Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ*. 2018 Aug 8;6:e5364.
- [122] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41:D590-6.
- [123] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N i sur. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jul;72(7):5069-72.
- [124] Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37:D141-5.
- [125] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- [126] Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA i sur. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet*. 2011 Dec 16;13(1):47-58.
- [127] Zaura E. A Commentary on the Potential Use of Oral Microbiome in Prediction, Diagnosis or Prognostics of a Distant Pathology. *Dent J (Basel)*. 2022 Aug 24;10(9):156.
- [128] Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ. Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front Microbiol*. 2017 Nov 15;8:2224.

- [129] Ashton JJ, Beattie RM, Ennis S, Cleary DW. Analysis and Interpretation of the Human Microbiome. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Jul;22(7):1713-22.
- [130] Mori AS, Isbell F, Seidl R. β -Diversity, Community Assembly, and Ecosystem Functioning. *Trends Ecol Evol*. 2018 Jul;33(7):549-564.
- [131] Rechmann P, Chaffee BW, Rechmann BMT, Featherstone JDB. Changes in Caries Risk in a Practice-Based Randomized Controlled Trial. *Adv Dent Res*. 2018 Feb;29(1):15-23.
- [132] Porumb Chifor I, Leucuta DC, Nigoghossian M i sur. Caries Lesion Assessment Using 3D Virtual Models by Examiners with Different Degrees of Clinical Experience. *Medicina (Kaunas)*. 2023 Dec 13;59(12):2157.
- [133] Petersen, Poul Erik, Baez, Ramon J & World Health Organization. (2013). Oral health surveys: basic methods, 5th ed. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/97035>
- [134] Ng TC, Luo BW, Lam WY, Baysan A, Chu CH, Yu OY. Updates on Caries Risk Assessment-A Literature Review. *Dent J (Basel)*. 2024 Sep 29;12(10):312.
- [135] Romandini P, Marruganti C, Romandini WG, Sanz M, Grandini S, Romandini M. Are periodontitis and dental caries associated? A systematic review with meta-analyses. *J Clin Periodontol*. 2024 Feb;51(2):145-157.
- [136] Devraj IM, Shankaraguru GM, Jairam LS, Dhull KS, Bhojraj N. Comparison of two different caries risk assessment tools for infants and toddlers - A cross-sectional study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2024 Jan 1;42(1):9-14.
- [137] Jurasic MM, Gibson G, Orner MB, Wehler CJ, Jones JA. Validation of a Subjective Caries Risk Assessment Tool. *J Dent*. 2021 Oct;113:103748.
- [138] Featherstone JDB, Chaffee BW. The Evidence for Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA®). *Adv Dent Res*. 2018 Feb;29(1):9-14.
- [139] Martignon S, Pitts NB, Goffin G, Mazevet M, Douglas GVA, Newton JT, Twetman S, Deery C, Doméjean S, Jablonski-Momeni A, Banerjee A, Kolker J, Ricketts D, Santamaria RM.

- CariesCare practice guide: consensus on evidence into practice. *Br Dent J*. 2019 Sep;227(5):353-362.
- [140] Dias KR, Andrade CB, Wait TTA, Chamon RC, Dos Santos KRN, Soviero VM, Maia LC, Fonseca-Gonçalves A. Influence of the microbiological component of Cariogram® for evaluating the risk of caries in children. *Acta Odontol Scand*. 2017 Aug;75(6):446-452.
- [141] Sen N, Bathija P, Chakravarty T, Das D, Baghel NS, Khan TA. Caries risk assessment using Cariogram model among smokeless tobacco users in India. *Med Pharm Rep*. 2019 Apr;92(2):165-171.
- [142] Petersson GH. Assessing caries risk--using the Cariogram model. *Swed Dent J Suppl*. 2003;(158):1-65.
- [143] Lumsden CL, Edelstein BL, Basch CE, Wolf RL, Koch PA, McKeague I, Leu CS, Andrews H. Protocol for a family-centered behavioral intervention to reduce early childhood caries: the MySmileBuddy program efficacy trial. *BMC Oral Health*. 2021 May 7;21(1):246.
- [144] Patel JS, Patel K, Vo H i sur. Enhancing an AI-Empowered Periodontal CDSS and Comparing with Traditional Perio-risk Assessment Tools. *AMIA Annu Symp Proc*. 2023 Apr 29;2022:846-855.
- [145] Christian B, Armstrong R, Calache H, Carpenter L, Gibbs L, Gussy M. A systematic review to assess the methodological quality of studies on measurement properties for caries risk assessment tools for young children. *Int J Paediatr Dent*. 2018 Nov 9.
- [146] Featherstone JDB, Crystal YO, Alston P i sur. A Comparison of Four Caries Risk Assessment Methods. *Front Oral Health*. 2021 Apr 28;2:656558.
- [147] Feng X, Qian Z, Zhang B i sur. Number of Cigarettes Smoked Per Day, Smoking Index, and Intracranial Aneurysm Rupture: A Case-Control Study. *Front Neurol*. 2018 May 31;9:380.
- [148] Lazarevic V, Manzano S, Gaia N i sur. Effects of amoxicillin treatment on the salivary microbiota in children with acute otitis media. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Aug;19(8):E335-42.

- [149] Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J Dent Res*. 2019 Feb;98(2):148-156.
- [150] Maki KA, Wolff B, Varuzza L, Green SJ, Barb JJ. Multi-amplicon microbiome data analysis pipelines for mixed orientation sequences using QIIME2: Assessing reference database, variable region and pre-processing bias in classification of mock bacterial community samples. *PLoS One*. 2023 Jan 13;18(1):e0280293.
- [151] Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016 Oct 18;4:e2584.
- [152] Lu Y, Zhou G, Ewald J, Pang Z, Shiri T, Xia J. MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jul 5;51(W1):W310-W318.
- [153] Foster ZS, Sharpton TJ, Grünwald NJ. Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS Comput Biol*. 2017 Feb 21;13(2):e1005404.
- [154] Xiong K, Zhu H, Li Y i sur. The Arginine Biosynthesis Pathway of *Candida albicans* Regulates Its Cross-Kingdom Interaction with *Actinomyces viscosus* to Promote Root Caries. *Microbiol Spectr*. 2022 Aug 31;10(4):e0078222.
- [155] Thimmegowda U, Belagatta V, Chikkanarasaiah N, Bilichodmath S. Identification and Correlation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in Caries-active and Caries-free Children: A PCR Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2023 Jan-Feb;16(1):9-15.
- [156] Chen L, Qin B, Du M i sur. Extensive description and comparison of human supra-gingival microbiome in root caries and health. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2):e0117064.
- [157] Wang Y, Wang S, Wu C, i sur. Oral Microbiome Alterations Associated with Early Childhood Caries Highlight the Importance of Carbohydrate Metabolic Activities. *mSystems*. 2019 Nov 5;4(6):e00450-19.
- [158] Tian J, Zhao B, Wang J i sur. The short-term impact of comprehensive caries treatment on the supragingival microbiome of severe early childhood caries. *Int J Paediatr Dent*. 2024 Sep;34(5):505-515.

- [159] Kim YJ, Lee SH. Inhibitory Effect of *Lactococcus lactis* HY 449 on Cariogenic Biofilm. J Microbiol Biotechnol. 2016 Nov 28;26(11):1829-1835.
- [160] Liu M, Shi Y, Wu K i sur. From Mouth to Brain: Distinct Supragingival Plaque Microbiota Composition in Cerebral Palsy Children With Caries. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Apr 11;12:814473.
- [161] Dinis M, Agnello M, Cen L i sur. Oral Microbiome: *Streptococcus mutans*/Caries Concordant-Discordant Children. Front Microbiol. 2022 Feb 17;13:782825.
- [162] Manome A, Abiko Y, Kawashima J, Washio J, Fukumoto S, Takahashi N. Acidogenic Potential of Oral *Bifidobacterium* and Its High Fluoride Tolerance. Front Microbiol. 2019 May 16;10:1099.
- [163] Abram AM, Szewczyk MM, Park SG i sur. A Co-Association of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula/dispar* in Root Caries Patients and *In Vitro* Biofilms. Infect Immun. 2022 Oct 20;90(10):e0035522.
- [164] Wu TT, Xiao J, Manning S, Saraithong P i sur. Multimodal Data Integration Reveals Mode of Delivery and Snack Consumption Outrank Salivary Microbiome in Association With Caries Outcome in Thai Children. Front Cell Infect Microbiol. 2022 May 23;12:881899.
- [165] Lee E, Park S, Um S i sur. Microbiome of Saliva and Plaque in Children According to Age and Dental Caries Experience. Diagnostics (Basel). 2021 Jul 23;11(8):1324.
- [166] Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, Huse SM, Montijn RC, Keijser BJ. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. BMC Med Genomics. 2011 Mar 4;4:22.
- [167] Kau S, Mansfeld MD, Šoba A, Zwick T, Staszyk C. The facultative human oral pathogen *Prevotella histicola* in equine cheek tooth apical/ periapical infection: a case report. BMC Vet Res. 2021 Oct 30;17(1):343.
- [168] Raksakmanut R, Thanyasrisung P, Sritangsirikul S, Kitsahawong K, Seminario AL, Pitiphat W, Matangkasombut O. Prediction of Future Caries in 1-Year-Old Children via the Salivary Microbiome. J Dent Res. 2023 Jun;102(6):626-635.

- [169] Qudeimat MA, Alyahya A, Karched M, Behbehani J, Salako NO. Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition. J Dent. 2021 Jan;104:103539.
- [170] Tanner AC, Sonis AL, Lif Holgerson P i sur. White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. J Dent Res. 2012 Sep;91(9):853-8.
- [171] AlEraky DM, Madi M, El Tantawi M i sur. Predominance of non-*Streptococcus mutans* bacteria in dental biofilm and its relation to caries progression. Saudi J Biol Sci. 2021 Dec;28(12):7390-7395.
- [172] Caneppele TMF, de Souza LG, Spinola MDS i sur. Bacterial levels and amount of endotoxins in carious dentin within reversible pulpitis scenarios. Clin Oral Investig. 2021 May;25(5):3033-3042.
- [173] Man SM. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011 Oct 25;8(12):669-85.
- [174] Khalaf ME, Karched M, Shawaf NA, Qudeimat MA. In vitro investigation of the impact of contemporary restorative materials on cariogenic bacteria counts and gene expression. J Dent. 2023 Jun;133:104486.
- [175] Catunda RQ, Altabtbaei K, Flores-Mir C, Febbraio M. Pre-treatment oral microbiome analysis and salivary Stephan curve kinetics in white spot lesion development in orthodontic patients wearing fixed appliances. A pilot study. BMC Oral Health. 2023 Apr 24;23(1):239.
- [176] Tanner AC, Kent RL Jr, Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, Kanasi E, Chalmers NI, Johansson I. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. J Dent Res. 2011 Nov;90(11):1298-305.
- [177] Thurnheer T, Belibasakis GN. *Streptococcus oralis* maintains homeostasis in oral biofilms by antagonizing the cariogenic pathogen *Streptococcus mutans*. Mol Oral Microbiol. 2018 Jun;33(3):234-239.
- [178] Brailsford SR, Tregaskis RB, Leftwich HS, Beighton D. The predominant *Actinomyces* spp. isolated from infected dentin of active root caries lesions. J Dent Res. 1999 Sep;78(9):1525-34.

- [179] Coykendall AL, Freedman ML. Colonization and cariogenicity of *Streptococcus ferus* in rats. *Infect Immun*. 1981 Apr;32(1):80-5.
- [180] Dame-Teixeira N, Parolo CC, Maltz M, Tugnait A, Devine D, Do T. *Actinomyces* spp. gene expression in root caries lesions. *J Oral Microbiol*. 2016 Sep 16;8:32383.
- [181] Bhardwaj RG, Khalaf ME, Karched M. Secretome analysis and virulence assessment in *Abiotrophia defectiva*. *J Oral Microbiol*. 2024 Feb 12;16(1):2307067.
- [182] Kressirer CA, Chen T, Lake Harriman K, Frias-Lopez J, Dewhirst FE, Tavares MA, Tanner AC. Functional profiles of coronal and dentin caries in children. *J Oral Microbiol*. 2018 Jul 16;10(1):1495976.
- [183] Liu S, Chen M, Wang Y, Zhou X, Peng X, Ren B, Li M, Cheng L. Effect of *Veillonella parvula* on the physiological activity of *Streptococcus* mutans. *Arch Oral Biol*. 2020 Jan;109:104578.
- [184] Wasfi R, Abd El-Rahman OA, Zafer MM, Ashour HM. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus* mutans. *J Cell Mol Med*. 2018 Mar;22(3):1972-1983.
- [185] Eribe ERK, Olsen I. *Leptotrichia* species in human infections II. *J Oral Microbiol*. 2017 Sep 15;9(1):1368848.
- [186] Al-Kebsi BLA, Kars G, Özer H, Güner ŞN. Unraveling the impact of primary immunodeficiency disorders on the microbiota of dental caries in children through 16S rRNA gene-based metagenomic analysis. *Turk J Med Sci*. 2023 Jul 23;53(5):1512-1522.
- [187] Fakhruddin KS, Samaranayake LP, Hamoudi RA, Ngo HC, Egusa H. Diversity of site-specific microbes of occlusal and proximal lesions in severe- early childhood caries (S-ECC). *J Oral Microbiol*. 2022 Feb 13;14(1):2037832.
- [188] Mato EG, Montaña-Barrientos BJ, Rivas-Mundiña B i sur. Anti-caries *Streptococcus* spp.: A potential preventive tool for special needs patients. *Spec Care Dentist*. 2024 May-Jun;44(3):813-822.

- [189] Toh H, Hayashi J, Oshima K i sur. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium dentium* Strain JCM 1195T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announc.* 2015 Apr 9;3(2):e00284-15.
- [190] Oshima K, Hayashi J, Toh H i sur. Complete Genome Sequence of *Parascardovia denticolens* JCM 12538T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announc.* 2015 May 14;3(3):e00485-15.
- [191] Salman HA, Senthilkumar R, Mahmood BS, Imran K. Detection and characterization of *Streptococcus downei*, a rare bacterial species of mutans streptococci from caries-active patients. *Indian J Dent Res.* 2019 Jul-Aug;30(4):579-582.
- [192] Steiner-Oliveira C, Longo PL, Aranha AC, Ramalho KM, Mayer MP, de Paula Eduardo C. Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin. *J Biomed Opt.* 2015 Oct;20(10):108003.
- [193] Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Malz M, Devine DA, Do T. Gene expression profile of *Scardovia* spp. in the metatranscriptome of root caries. *Braz Oral Res.* 2020 May 8;34:e042.
- [194] Belstrøm D, Fiehn NE, Nielsen CH i sur. Altered bacterial profiles in saliva from adults with caries lesions: a case-cohort study. *Caries Res.* 2014;48(5):368-75.
- [195] Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI i sur. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res.* 2010;44(5):485-97.
- [196] Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol.* 2004 Jul;42(7):3023-9.
- [197] Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol.* 2008 Jun;46(6):2015-21.
- [198] Byun R, Carlier JP, Jacques NA, Marchandin H, Hunter N. *Veillonella denticariosi* sp. nov., isolated from human carious dentine. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 Dec;57(Pt 12):2844-2848.
- [199] Kanasi E, Johansson I, Lu SC i sur. Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *J Dent Res.* 2010 Apr;89(4):378-83.

- [200] Obata J, Fujishima K, Nagata E, Oho T. Pathogenic mechanisms of cariogenic *Propionibacterium acidifaciens*. *Arch Oral Biol*. 2019 Sep;105:46-51.
- [201] Campus G, Cocco F, Ottolenghi L, Cagetti MG. Comparison of ICDAS, CAST, Nyvad's Criteria, and WHO-DMFT for Caries Detection in a Sample of Italian Schoolchildren. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Oct 25;16(21):4120.
- [202] Badel T, Savić Pavičin I, Bašić K, Kes VB. Socioeconomic influence of tobacco use and dental caries experience in different male croatian populations. *Acta Clin Croat*. 2018 Sep;57(3):510-517.
- [203] Abbate GM, Caria MP, Montanari P i sur. Periodontal health in teenagers treated with removable aligners and fixed orthodontic appliances. *J Orofac Orthop*. 2015 May;76(3):240-50.
- [204] Schwarz C, Balean O, Dumitrescu R i sur. Total Antioxidant Capacity of Saliva and Its Correlation with pH Levels among Dental Students under Different Stressful Conditions. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Dec 12;13(24):3648.
- [205] Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J*. 2008;2:38-48.
- [206] Peršić Bukmir R, Paljević E, Pezelj-Ribarić S, Brekalo Pršo I. Association of the self-reported socioeconomic and health status with untreated dental caries and the oral hygiene level in adult patients. *Dent Med Probl*. 2022 Oct-Dec;59(4):539-545.
- [207] Krmek SJ, Marić R, Ivanišević AM, Matijević J. The Oral Status of Adult Population in the Croatian Town of Knin: a Cross Sectional Study. *Acta Stomatol Croat*. 2015 Jun;49(2):92-103.
- [208] White MA, Peters EN, Toll BA. Effect of binge eating on treatment outcomes for smoking cessation. *Nicotine Tob Res*. 2010 Nov;12(11):1172-5.
- [209] Sinha R, Jastreboff AM. Stress as a common risk factor for obesity and addiction. *Biol Psychiatry*. 2013 May 1;73(9):827-35.

- [210] Chao AM, Wadden TA, Ashare RL, Loughhead J, Schmidt HD. Tobacco Smoking, Eating Behaviors, and Body Weight: A Review. *Curr Addict Rep*. 2019;6:191-199.
- [211] Sakki T, Knuuttila M. Controlled study of the association of smoking with lactobacilli, mutans streptococci and yeasts in saliva. *Eur J Oral Sci*. 1996 Oct-Dec;104(5-6):619-22.
- [212] Heintze U. Secretion rate, buffer effect and number of lactobacilli and Streptococcus mutans of whole saliva of cigarette smokers and nonsmokers. *Scand J Dent Res*. 1984 Aug;92(4):294-301.
- [213] Wu J, Li M, Huang R. The effect of smoking on caries-related microorganisms. *Tob Induc Dis*. 2019 Apr 18;17:32.
- [214] Petrušić N, Posavac M, Sabol I, Mravak-Stipetić M. The Effect of Tobacco Smoking on Salivation. *Acta Stomatol Croat*. 2015 Dec;49(4):309-15.
- [215] Voelker MA, Simmer-Beck M, Cole M, Keeven E, Tira D. Preliminary findings on the correlation of saliva pH, buffering capacity, flow, Consistency and Streptococcus mutans in relation to cigarette smoking. *J Dent Hyg*. 2013 Feb;87(1):30-7.
- [216] Nigar S, Hassan S, Maqsood A i sur. An assessment of unstimulated salivary flow rate, IgA and clinical oral dryness among active and passive smokers. *Int J Occup Med Environ Health*. 2022 Feb 15;35(1):39-51.
- [217] Meghani K, Sidam S, Pakhre A, Sampath A, Sahoo AK, Chavan AG. Comparative Evaluation of Hearing and Salivary Flow Rate in Smokers and Non-smokers: A Cross-Sectional Study. *Cureus*. 2024 Aug 26;16(8):e67794.
- [218] Ferdous T, Jiang L, Dinu I i sur The rise to power of the microbiome: power and sample size calculation for microbiome studies. *Mucosal Immunol*. 2022 Jun;15(6):1060-1070.
- [219] Qian XB, Chen T, Xu YP i sur. A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chin Med J (Engl)*. 2020 Aug 5;133(15):1844-1855.
- [220] Imam S, Noguera DR, Donohue TJ. Global insights into energetic and metabolic networks in Rhodobacter sphaeroides. *BMC Syst Biol*. 2013 Sep 13;7:89.

- [221] Wyss C, Choi BK, Schüpbach P, Moter A, Guggenheim B, Göbel UB. *Treponema lecithinolyticum* sp. nov., a small saccharolytic spirochaete with phospholipase A and C activities associated with periodontal diseases. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Oct;49 Pt 4:1329-39.
- [222] Obata J, Fujishima K, Nagata E, Oho T. Pathogenic mechanisms of cariogenic *Propionibacterium acidifaciens*. *Arch Oral Biol.* 2019 Sep;105:46-51.
- [223] Raksakmanut R, Thanyasrisung P, Sritangsirikul S, Kitsahawong K, Seminario AL, Pitiphat W, Matangkasombut O. Prediction of Future Caries in 1-Year-Old Children via the Salivary Microbiome. *J Dent Res.* 2023 Jun;102(6):626-635.
- [224] Kawaichi S, Ito N, Kamikawa R, Sugawara T, Yoshida T, Sako Y. *Ardenticatena maritima* gen. nov., sp. nov., a ferric iron- and nitrate-reducing bacterium of the phylum 'Chloroflexi' isolated from an iron-rich coastal hydrothermal field, and description of *Ardenticatena* classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Aug;63(Pt 8):2992-3002.
- [225] Wang Y, Casaburi G, Lin W, Li Y, Wang F, Pan Y. Genomic evidence of the illumination response mechanism and evolutionary history of magnetotactic bacteria within the Rhodospirillaceae family. *BMC Genomics.* 2019 May 22;20(1):407.
- [226] de Vries HJ, Beyer F, Jarzembowska M i sur. Isolation and characterization of *Sphingomonadaceae* from fouled membranes. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2019 Jan 25;5(1):6.
- [227] Yabe S, Sakai Y, Abe K, Yokota A. Diversity of Ktedonobacteria with Actinomycetes-Like Morphology in Terrestrial Environments. *Microbes Environ.* 2017 Mar 31;32(1):61-70.
- [228] Li H, Ramia NE, Borges F, Revol-Junelles AM, Vogensen FK, Leisner JJ. Identification of Potential Citrate Metabolism Pathways in *Carnobacterium maltaromaticum*. *Microorganisms.* 2021 Oct 18;9(10):2169.
- [229] Luley-Goedl C, Bruni M, Nidetzky B. Carrier-based immobilization of *Aerococcus viridans*-lactate oxidase. *J Biotechnol.* 2024 Feb 20;382:88-96.

- [230] Cogo K, Montan MF, Bergamaschi CC, D Andrade E, Rosalen PL, Groppo FC. In vitro evaluation of the effect of nicotine, cotinine, and caffeine on oral microorganisms. *Can J Microbiol*. 2008 Jun;54(6):501-8.
- [231] Roberts D, Cole P. Effect of tobacco and nicotine on growth of *Haemophilus influenzae* in vitro. *J Clin Pathol*. 1979 Jul;32(7):728-31.
- [232] Sharon I, Quijada NM, Pasolli E i sur. The Core Human Microbiome: Does It Exist and How Can We Find It? A Critical Review of the Concept. *Nutrients*. 2022 Jul 13;14(14):2872.
- [233] Esberg A, Johansson L, Johansson I, Dahlqvist SR. Oral Microbiota Identifies Patients in Early Onset Rheumatoid Arthritis. *Microorganisms*. 2021 Aug 3;9(8):1657.

7. ILUSTRACIJE

7.1 Popis slika

Slika 1.1a i 1.1b – Keyesov model nastanka zubnog karijesa

Slika 1.2 Čimbenici uključeni u nastanak karijesnih lezija

Slika 1.3 Zastupljenost bakterijskih rodova u oralnom mikrobiomu čovjeka

Slika 1.4 Stadiji formiranja dentalnog biofilma

Slika 1.5 Mogućnosti primjene i protokoli rada s tehnologijama sekvencioniranja

Slika 1.6 Struktura 16S rRNK gena

Slika 1.7 Emulzijski PCR i ISP kuglice

Slika 1.8 Ion Torrent chip i reakcije sekvencioniranja

Slika 1.9 Cariogram analiza karijes rizika

Slika 3.1 Snimak fragmentne analize pročišćenih PCR produkata nakon PCR amplifikacije

Slika 3.2 Postupak end-repaira te ligiranja adaptera i barkodova na dobivene amplikone

Slika 3.3 Snimka rezultata fragmentne analize amplificiranih knjižnica

Slike 3.4a i 3.4b Ion Torrent Ion Chef uređaj

Slika 3.5 Ion S5 Ion GeneStudio S5 System uređaj

Slika 4.1. Značajne razlike u kliničkim karakteristikama i Cariogram analizi među skupinama pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Slika 4.2 Broj očitanih ASV sekvenci u ispitivanim uzorcima

Slika 4.3 Usporedba alfa raznolikosti mikrobioma pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Slika 4.4a 2D prikaz Beta raznolikosti između ispitivanih skupina na taksonomskoj razini vrste

Slika 4.4b 3D prikaz Beta raznolikosti između ispitivanih skupina na taksonomskoj razini vrste

Slika 4.5 Detektirana bakterijska koljena u ispitivanim skupinama

Slika 4.6 Detektirani bakterijski razredi u ispitivanim skupinama

Slika 4.7 Detektirani bakterijski redovi u ispitivanim skupinama

Slika 4.8. Detektirane bakterijske obitelji u ispitivanim skupinama

Slika 4.9. Razlike u bakterijskoj zastupljenosti na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji između skupina pušača THS-a i nepušača

Slika 4.10. Razlike u bakterijskoj zastupljenosti na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji između skupina pušača THS-a i pušača cigareta

Slika 4.11. Razlike u bakterijskoj zastupljenosti na taksonomskim razinama koljena, razreda, reda i obitelji između skupina pušača cigareta i nepušača

Slika 4.12. Zastupljenost bakterijskih rodova u skupini pušača THS-a

Slika 4.13. Zastupljenost bakterijskih rodova u skupini pušača cigareta

Slika 4.14. Usporedba relativne zastupljenosti bakterijskih rodova u ispitivanim skupinama

7.2 Popis tablica

Tablica 1.1 Svojstva bakterijskih biofilmova

Tablica 1.2 Tehnologije sekvenciranja po generacijama

Tablica 1.3 Multifaktorijski alati za procjenu karijes rizika

Tablica 3.1 Vrijednosti aritmetičke sredine i standardne devijacije KEP indeksa u ispitivanim skupinama pilot studije

Tablica 3.2 Koncentracije izolirane DNK iz uzoraka supragingivnog dentalnog biofilma

Tablica 3.3 Volumeni reagensa korišteni u PCR reakciji amplifikacija hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena

Tablica 3.4 Program PCR reakcije amplifikacije hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena

Tablica 3.5 Koncentracije pročišćenih PCR produkata i izračun volumena razrjeđenja nakon PCR amplifikacije hipervarijabilnih regija 16S rRNK gena

Tablica 3.6 Komponente reakcije End-repair-a

Tablica 3.7 Komponente reakcija ligacije i nick repair-a

Tablica 3.8 Protokol termalnog cyclera za reakcije ligacije i nick repaira

Tablica 3.9 Komponente PCR reakcije amplifikacije pripremljenih knjižnica

Tablica 3.10 Protokol termalnog cyclera za PCR reakcije amplifikacije pripremljenih knjižnica

Tablica 3.11 Koncentracije amplificiranih knjižnica

Tablica 3.12 Čimbenici uključeni u procjenu karijes rizika Cariogram metodom

Tablica 4.1 Deskriptivna statistika kliničkih karakteristika prikupljenog uzorka

Tablica 4.2 Stupanj obrazovanja, programi fluoridacije, broj obroka u danu i sustavne bolesti pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Tablica 4.3 Navike pušenja pušača THS-a i pušača cigareta

Tablica 4.4 Kliničke karakteristike pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Tablica 4.5 Deskriptivna statistika šansi za izbjegavanje nastanka i nastanak novih karijesnih lezija prikupljenog uzorka

Tablica 4.6 Šanse za izbjegavanje i nastanak karijesnih lezija u pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Tablica 4.7 Broj ASV sekvenci u analiziranim uzorcima

Tablica 4.8. Rezultati PERMANOVA analize – Beta raznolikost u ispitivanim skupinama izražena kroz Bray-Curtis indeks

Tablica 4.9 Zastupljenost bakterijskih rodova u skupinama pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Tablica 4.10. Zastupljenost bakterijskih vrsta u skupinama pušača THS-a, pušača cigareta i nepušača

Tablica 4.11. Prisutnost bakterija unutar mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma koje se povezuju s prisutnosti karijesa

Tablica 4.12. Prisutnost bakterija unutar mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma koje se mogu povezati sa stanjima odsutnosti karijesa

Tablica 4.13. Prisutnost bakterija unutar mikrobioma supragingivnog dentalnog biofilma koje se mogu podjednako povezati s prisutnosti i odsutnosti karijesa

Tablica 4.14. Broj bakterijskih vrsta koje se povezuju s prisutnosti i odsutnosti karijesa u sastavu mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilmova ispitivanih skupina

Tablica 4.15. Udio detektiranih ASV sekvenci koje odgovaraju bakterijskim vrstama koje se povezuju s prisutnosti i odsutnosti karijesa u sastavu mikrobioma supragingivnih dentalnih biofilmova ispitivanih skupina

Tablica 4.16. Statistički značajne korelacije KEP indeksa s bakterijskim vrstama povezanim sa stanjima prisutnosti /odsutnosti karijesa

Tablica 4.17. Statistički značajne korelacije KEP indeksa po plohi zuba s bakterijskim vrstama povezanim sa stanjima prisutnost /odsutnosti karijesa

Tablica 4.18. Statistički značajne korelacije broja zuba s aktivnim karijesnim lezijama s bakterijskim vrstama povezanim sa stanjima prisutnosti /odsutnosti karijesa

Tablica 4.19. Statistički značajne korelacije broja zubnih ploha s aktivnim karijesnim lezijama s bakterijskim vrstama povezanim sa stanjima prisutnosti/odsutnosti karijesa

7.3 Popis shema

Shema 3.1. Postupak izrade knjižnica, pripreme templatea i sekvenciranja iduće generacije

8. POPIS POKRATA

KEP indeks – Karijes-Ekstrakcija-Plomba indeks

DMFT index – Decayed-Missing-Filled tooth index

DMFTs index - Decayed-Missing-Filled tooth surface index

EPS – ekstracelularne polimerne substance

DNK/DNA –Deoksiribonukleinska kiselina

THS – Tobacco heating system (sustav za zagrijavanje duhana)

NGS – Next generation sequencing (sekvenciranje iduće generacije)

WGS – Whole genome sequencing (sekvenciranje cijelog genoma)

RNK –ribonukleinska kiselina

PCR – polymerase chain reaction

ISP – Ion Sphere Particles

OTU – Operational taxonomic unit

ASV – Amplicon sequence variant

WHO –World Health Organisation (Svjetska zdravstvena organizacija)

ICDAS – International Caries Detection and Assessment System

EDTA – etilen-diamin-tetraoctena kiselina

FMPS indeks – Full mouth plaque score indeks

Spp. – species (vrste)

PCoA – Principal Coordinate Analysis

9. ŽIVOTOPIS

Elvis Božac

Datum rođenja: 30. srpnja 1994. (Pula, RH)

E-mail: elvis.bozac@uniri.hr; elvis.bozac@gmail.com

Radno iskustvo

- Studeni 2020. - Sveučilišni asistent; Katedra za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Fakultet dentalne medicine, Sveučilište u Rijeci, RH
- Travanj 2024. – Doktor dentalne medicine; Privatna stomatološka ordinacija dr. Mirta Kučan Moraal, Rijeka, Hrvatska

Obrazovanje

- 2021.- Doktorska škola iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, smjer Dentalna medicina, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, RH
- 2013. - 2019. – Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Dentalna medicina, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, RH
- 2009. – 2013. – Opća gimnazija, Gimnazija Pula, RH
- 2002. – 2009. – Osnovna škola, Osnovna škola Stoja, Pula, RH

Jezične vještine

- Materinji jezik: Hrvatski jezik
- Strani jezici: engleski jezik (C2), talijanski jezik (C2)

Projekti

- Okolišni čimbenici i mikrobiološke interakcije u strukturi dentalnog biofilma (2021.-2025.), voditelj: Prof.dr.sc. Stjepan Špalj, HRZZ-iP-2020-02-4027
- Povezanost apikalnog parodontitisa i sustavnih autoimunih bolesti – međuinstitucijsko istraživanje, voditeljica: Doc.dr.sc. Romana Peršić Bukmir, Institucijski project FDMRI

Članstva

- Hrvatska komora dentalne medicine
- Hrvatsko endodontsko društvo

Popis radova

1. Božac, Elvis; Paljević, Ema; Sever, Ella; Braut, Alen; Špalj, Stjepan; Peršić Bukmir, Romana. Clinical characteristics and caries risk assessment of tobacco heating systems smokers, cigarette smokers and non-smokers: a cross-sectional study // Clinical oral investigations, 28 (2024), 7; 382, 11. doi: 10.1007/s00784-024-05778-0
2. Sever, Ella; Božac, Elvis.; Saltović, Ema; Simonić-Kocijan, Sunčana.; Brumini, Martina.; Glažar, Irena. Impact of the Tobacco Heating System and Cigarette Smoking on the Oral Cavity: A Pilot Study // Dentistry journal, 11 (2023), 11; doi: <https://doi.org/10.3390/dj11110251>
3. Paljević, Ema; Brekalo Pršo, Ivana; Vidas Hršić, Jelena; Božac, Elvis; Pezelj-Ribarić, Sonja; Peršić Bukmir, Romana. Healing of apical periodontitis in type II diabetes mellitus patients: A prospective study // Oral diseases, (2023), doi: 10.1111/odi.14772
4. Tomljanović, Magda ; Božac, Elvis ; Paljević, Ema ; Vidas Hršić, Jelena ; Pezelj-Ribarić, Sonja ; Brekalo Pršo, Ivana ; Peršić Bukmir, Romana. Comparison of rotary and reciprocal endodontics in shaping of root canal system // Journal of Stomatology, 75 (2022), 3; 141-146. doi: 10.5114/jos.2022.119079

Prilog sa skupa

1. Božac, Elvis; Sever, Ella; Badnjević, Matea; Mohar Vitezić, Bojana; Špalj, Stjepan; Peršić Bukmir, Romana. Cariogenic microbiome of supragingival dental biofilm in cigarette smokers and non-smokers // *Acta stomatologica Croatica*, 58, 1, 2024. str. 97-97
2. Paljević, Ema; Šimunović, Luka; Brekalo Pršo, Ivana; Božac, Elvis; Vidović Zdrilić, Ivana; Peršić Bukmir, Romana; Vidas Hrštić, Jelena. Assessment of self-efficacy in endodontics between students affected and unaffected by the lockdown // *Acta stomatologica Croatica*, 57, 4, 2023, 12, 5
3. Božac, Elvis; Paljević, Ema; Vidas Hrštić, Jelena; Brekalo Pršo, Ivana; Peršić Bukmir, Romana. Association between apical periodontitis and thyroid disorders. A cross-sectional study // *Acta stomatologica Croatica*, 57, 4, 2023. str. 401-405
4. Pupovac, Aleksandar ; Mišković, Ivana ; Kuiš, Davor ; Sever, Ella ; Božac, Elvis ; Kunosić, Zvonimir ; Prpić, Jelena. Clinical characteristics of periodontal tissues in conventional and electronic cigarette smokers- preliminary results // Virtual World Congress of Dental Students online, 13.04.2023-14.04.2023
5. Pupovac, Aleksandar ; Mišković, Ivana ; Kuiš, Davor ; Sever, Ella ; Božac, Elvis ; Prpić, Jelena. Učinak klorheksidina na uspješnost inicijalne parodontne terapije // 8. hrvatski parodontološki dani Rovinj, Hrvatska, 01.01.2022-01.01.2022