

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Mirjana M. Perić

**KOMPARATIVNA ANALIZA KLINIČKOG I
MIKROBIOLOŠKOG NALAZA KOD
PACIJENATA SA PROTEZNIM
STOMATITISOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Mirjana M. Perić

**COMPARATIVE ANALYSIS OF CLINICAL AND
MICROBIOLOGICAL FINDING IN PATIENTS
WITH DENTURE STOMATITIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

PODACI O MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTOR:

Doktor stomatoloških nauka, docent, *Rade Živković*,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet.

ČLANOVI KOMISIJE:

Doktor stomatoloških nauka, redovni profesor, *Željko Martinović*,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet;

Doktor stomatoloških nauka, redovni profesor, *Ljiljana Tihaček-Šojić*,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet;

Doktor stomatoloških nauka, redovni profesor, *Dušan Pavlica*,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet;

Doktor stomatoloških nauka, docent, *Ana Pucar*,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet;

Doktor medicinskih nauka, redovni profesor, *Valentina Arsić-Arsenijević*,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet;

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je realizovana na Klinici za stomatološku protetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu, kao i na Institutu za mikrobiologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu i u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za uzročnike mikoza (NRLUM) Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Ovom prilikom bi se zahvalila:

- mom mentoru doc. dr Radetu Živkoviću, na ukazanom poverenju, strpljenju i velikoj pomoći tokom mog rada;*
- prof. dr Željku Martinoviću, dragom učitelju, na pomoći oko osmišljavanja teme istraživanja kao i nesebičnoj podršci u svim fazama izrade ove doktorske disertacije;*
- prof. dr Ljiljani Tihaček-Šojić na vremenu i trudu u toku izrade ove doktorske disertacije, kao i na podršci i poverenju koje mi je ukazala tokom svih proteklih godina saradnje;*
- prof.dr Dušanu Pavlici i Doc. dr Ani Pucar na zalaganju i neprocenjivoj pomoći tokom izrade ove teze;*
- prof. dr Valentini Arsić-Arsenijević, koja me je uvela u područje mikrobioloških istraživanja i koja me je upoznala sa načinom razmišljanja i planiranja eksperimenata, na sugestijama tokom pisanja teze koje su mi bile dragocene;*
- prof.dr Ivici Stančiću na razumevanju i korisnim savetima koji su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije;*
- dr Mileni Jovanović i Marini Pekmezović na ličnom angažovanju, na savetima i drugarskoj podršci u toku eksperimentalnog rada;*
- prof. dr Jeleni Marinković i doc. dr Biljani Miličić na pomoći vezanoj za statističku analizu;*
- celokupnom kolektivu Klinike za stomatološku protetiku, za svu pruženu pomoć;*
- na kraju, svojoj porodici, za ljubav, podršku i razumevanje.*

KOMPARATIVNA ANALIZA KLINIČKOG I MIKROBIOLOŠKOG NALAZA KOD PACIJENATA SA PROTEZNIM STOMATITISOM

APSTRAKT

Protezni stomatitis je često oboljenje kod pacijenata koji koriste totalne zubne proteze. Uglavnom protezni stomatitis nije praćen simptomima i pacijenti nisu svesni prisutnog oboljenja. Etiologija proteznog stomatitisa je multifaktorijalna. Kao dominantan faktor ističe se infekcija gljivama roda *Candida*. Totalne zubne proteze podležu kolonizaciji i formiranju biofilma *Candida* spp. Protezni plak (biofilm) je sličan dentalnom plaku i služi kao rezervoar potencijalno infektivnih mikroorganizama. Mikroorganizmi iz proteznog plaka, (najviše *Candida* spp.) su odgovorni za nastanak proteznog stomatitisa. Kontinuirano gutanje mikroorganizama iz proteznog plaka izlaže pacijente riziku od neočekivane infekcije. Najčešća izolovana vrsta gljive na protezama je *C. albicans*. Prisutni su opšti i lokalni kontributivni faktori. Lokalni faktori su: lezije oralne sluzokože uzrokovane neadekvatnim protezama, neprekidno nošenje zubne proteze, smanjen protok pljuvačke, loša higijena zubne proteze, vrsta materijala od koga je izrađena proteza, starost proteze, slaba retencija proteze, neizbalansirana okluzija. Opšti faktori su: *diabetes mellitus*, pušenje, dugotrajna primena antibiotika i kortikosteroida, radio i hemoterapija, faktori ishrane – nedostatak vitamina B12, folata i gvožđa, psihotropni lekovi, hiposalivatori. Cilj ovog istraživanja je bio da se pouzdano dijagnostikuje i odredi učestalost proteznog stomatitisa gljivične etiologije i ispita antifungalna aktivnost etarskih ulja. Za potrebe ovog istraživanja dizajniran je poseban upitnik, koji sadrži generalije, medicinsku i stomatološku istoriju i podatke dobijene kliničkim pregledom. Klinički pregled se sastojao od inspekcije usne duplje, na osnovu koga se dijagnostikovala inflamacija mekih tkiva, kao i stepen i lokacija inflamacije. Analizom postojećeg stanja totalne zubne proteze u ustima pacijenta utvrđivan je stepen retencije zubne proteze, očuvanost vertikalne dimenzije okluzije i okluzalni odnosi sa antagonistima. Deo istraživanja je sproveden u laboratoriji. Najpre su

sprovedena mikrobiološka ispitivanja uzetih uzoraka, a zatim su izolovani sojevi *Candida* izlagani dejstvu etarskih ulja pomoću mikrodilucione metode. Uzorak je bio prikupljen po istoj proceduri kod svakog ispitanika, na sledeće načine: brisom sluzokože nepca (onih delova gde je kliničkim pregledom utvrđeno prisustvo inflamacije); brisom gingivalne površine proteze; ispiranjem usta; izlaganjem zubne proteze ultrazvuku. Nakon uzimanja mikrobiološkog materijala, uzorci su bili transportovani u mikrobiološku laboratoriju, najkasnije pola sata od trenutka uzorkovanja. Prvo se radila kvantitativna i kvalitativna analiza prisustva gljiva roda *Candida* u ispitivanom materijalu, a zatim se dobijeni materijal dalje obrađivao standardnim bakteriološkim metodama, radi utvrđivanja prisustva patogenih oralnih bakterija. Ispitivanje antimikrobnog dejstva etarskih ulja (cimet, limun, grejpfrut, čajno drvo, timijan) na izolovane sojeve gljiva roda *Candida* se radilo mikrodilucionom metodom, po protokolu EUCAST Definitive Document Edef 7.2 Revision.

Od ukupno 250 pacijenata koji su pregledani, u studiju je ušlo 97 pacijenata kod kojih je dijagnostikovano protezni stomatitis, što predstavlja učestalost proteznog stomatitisa od 38.8%. Prosečna starost pacijenata sa proteznim stomatitisom je bila 70.5 ± 10.68 godina. Protezni stomatitis se više javlja kod žena u odnosu na muškarce. Od kliničkih formi proteznog stomatitisa najučestaliji je II stepen zapaljenja, a najmanje je zastupljen III stepen. Infekcija je dominantan etiološki faktor u nastanku proteznog stomatitisa. Kod 82 pacijenta (84.5%) dijagnostikovano je protezni stomatitis gljivične etiologije, a kod 15 pacijenata (15.5%) mehaničke etiologije.

Na osnovu dobijenih rezultata može se utvrditi značajan uticaj stanja okluzije i očuvanosti vertikalne dimenzije okluzije na etiologiju proteznog stomatitisa. Suvoća usta je dominantan simptom kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije. Kod većine pacijenata sa proteznim stomatitisom nisu prisutne patogene vrste oralnih bakterija (najviše je zastupljena *E. coli*). Najuspešnija metoda uzorkovanja mikrobiološkog materijala je ultrazvuk proteze pa bris proteze, ispirak i na kraju bris sluzokože nepca. Postoji visoko statistički značajna razlika između ispitivanih grupa po broju kolonija *Candida* kada se uzorkovanje mikrobiološkog materijala vrši ultrazvukom proteze, sa

povećanjem stepena zapaljenja povećava se i broj izolovanih kolonija *Candida*. To se ne može reći za slučaj uzorkovanja ispirkom, jer ne postoji statistički značajna razlika. *C. albicans* je najčešće izolovana vrsta *Candida* spp. Statističkom analizom dobija se značajnost u prisustvu mešovite infekcije u grupama sa višim stepenom zapaljenja. Najosetljiviji sojevi u ovom istraživanju su: *C. glabrata* pa *C. krusei*, *C. albicans*, a najotporniji su sojevi *C. tropicalis*. Najmanje vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije za 40 sojeva ima limun, pa cimet, timijan, grejp i na kraju čajno drvo. Najmanju vrednost minimalne fungicidne koncentracije imaju sojevi *C. glabrata* pa *C. albicans*, *C. krusei*, i na kraju *C. tropicalis*. Najmanje minimalne fungicidne koncentracije ima etarsko ulje limuna, pa timijana, cimeta, grejpa i na kraju čajnog drveta.

Istraživanje je pokazalo da je protezni stomatitis gljivične etiologije čest kod pacijenata koji koriste totalne zubne proteze, da je *C. albicans* najčešća izolovana vrsta *Candida*. Preporučeni način uzorkovanja mikrobiološkog materijala je ultrazvuk proteze i bris proteze, koji omogućava brzu dijagnostiku proteznog stomatitisa. Etarska ulja (cimet, limun, grejpfrut, čajno drvo, timijan) su pokazala fungistatički i fungicidni efekat na izolovane sojeve *Candida*.

Ključne reči: protezni stomatitis, *Candida*, etarska ulja

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Protetika

UDK broj 615.282.84:616.314-77(043.3)

COMPARATIVE ANALYSIS OF CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL FINDING IN PATIENTS WITH DENTURE STOMATITIS

ABSTRACT

Denture stomatitis is a common disease in patients with dentures. Generally, denture stomatitis is not followed by any symptoms and patients are usually not aware of the disease. Etiology of denture stomatitis is multifactorial. As a dominant factor is the fungal infection by *Candida* spp. Complete dentures are susceptible to colonization and biofilm formation of *Candida* spp. Denture plaque (biofilm) is similar to a dental plaque and it is a reservoir of potential infective microorganisms. Microorganisms in denture plaque, (mostly *Candida* spp.) are responsible for the emergence of denture stomatitis. A continual swallowing of microorganism from denture plaque exposes patients to a risk of unexpected infection. The most common isolated species of fungus on dentures is *C. albicans*. There are some general and local contributory factors. The local factors are: trauma of oral mucosa caused by inadequate dentures, continuous dentures wearing, reduced saliva flow, bad dentures hygiene, type of the material dentures are made of, dentures' age, poor dentures retention, unbalanced occlusion. The general factors are: *diabetes mellitus*, smoking, long antibiotics and corticosteroids application and radio or chemotherapy, diet factors, - lack of vitamin B12, foliates and iron, psychotropic medications and hyposalivators. The aim of this research has been to diagnose and designate a frequency of denture stomatitis of fungal etiology and examine antifungal activities of essential oils. For the needs of this research there has been designed a special questionnaire which contains .personal data, medical and stomatological history and data obtained by clinical examination. Clinical examination consisted of inspection of oral cavity on the basis of which a soft tissue inflammation has been diagnosed as well as a degree and location of the inflammation. Analysing the present state of complete dentures in patients' mouth there has been established a degree of denture retention, preservation of

vertical dimension of occlusion and occlusal relations with antagonists. A part of the research has been carried out in a laboratory. Firstly it has been done a microbiological research of the samples and then isolated species of *Candida* were exposed to the effect of essential oils using microdilution method. The sample has been collected using the same procedure in every examinee to the following ways: swabbing of the palatal mucosa (those parts which by clinical examination have proved the existence of inflammation) swabbing of gingival surface of dentures, rinsing the mouth; denture sonication. After taking microbiological material, the samples have been transported to the microbiological laboratory 30 minutes after the sampling. Quantity and quality microbiological assessments of fungal presence of *Candida* spp. have been made in the material that has been tested and then, the obtained material has been processed by standard biological methods in order to identify presence of pathogenic oral bacteria. The research of antimicrobial action of essential oils (cinnamon, lemon, grapefruit, tea tree, thyme) to isolated species of fungus from *Candida* species has been done by microdilution method according to EUCAST Definitive Document Edef 7.2 Revision protocol.

97 out of 250 patients who have been examined with denture stomatitis were included in the study, and show the frequency of denture stomatitis of 38.8%. The average age of patients with denture stomatitis is 70.5 ± 10.68 , and it is more frequent in women by comparison to men. In regards to the clinical forms of denture stomatitis the second degree of inflammation is the most frequent and the least is the third degree of inflammation. The infection is a dominant etiological factor for the emergence of denture stomatitis. Denture stomatitis of fungal etiology has been diagnosed in 82 patients (84.5%) and mechanical etiology in 15 patients (15.5%).

According to the obtained results there has been a significant influence of the occlusion and vertical dimension of occlusion to etiology of denture stomatitis. Dry mouth is a dominant symptom in patients with denture stomatitis of fungal etiology. In most patients with denture stomatitis the pathogenic species of oral bacteria are not present (mostly present *E. coli*) the most successful sampling technique of microbiological material is the dentures sonication then dentures swabbing and at the end palatal mucosa swabbing. There is a highly statistically prominent difference among the examined groups in terms of

numbers of colonies of *Candida* when the sampling is done by denture sonication. Along with the increase of inflammation the number of isolated colonies of *Candida* increases as well. In case of rinsing this cannot be stated since there is not a statistically significant difference. *C. albicans* is the most common isolated species of *Candida*. By statistical analysis the presence of mixed infections is more significant in groups with higher inflammation level. The most sensitive species in this research are: *C. glabrata*, then *C. krusei*, *C. albicans*, and the most resistant are species of *C. tropicalis*. The least values of minimum inhibit concentration for 40 species can be found in lemon, then cinnamon, thyme, grapefruit and at the end in tea tree. The least value of minimum fungicidal concentration are in species *C. glabrata*, then in *C. albicans*, *C. krusei* and finally in *C. tropicalis*. The least minimum fungicidal concentration is in essential oil of lemon then cinnamon, thyme, grapefruit and tea tree at the end. The research has shown that the dentures stomatitis of fungal etiology is common in patients who use complete dentures. *C. albicans* is most common isolated species of *Candida*. The recommended sampling technique of microbiological material is denture sonication as well as dentures swabbing, which provides a quick diagnosis of denture stomatitis. Essential oils (cinnamon, lemon, grapefruit, tea tree and thyme) have shown fungustatical and fungicidal effect to isolated species of *Candida*.

Key words: denture stomatitis, *Candida*, essential oils

Scientific field: Stomatology

Narrower scientific field: Prosthetics

UDC: 615.282.84:616.314-77(043.3)

SADRŽAJ:

1.	U V O D.....	1
1.1	Protezni stomatitis	2
1.2	Etiologija proteznog stomatitisa	4
1.3	Uloga gljiva roda <i>Candida</i> u nastanku proteznog stomatitisa.....	6
1.4	Adhezija i kolonizacija zubnih proteza gljivama roda <i>Candida</i>	7
1.5	Formiranje biofilma mikroorganizama u usnoj duplji	9
1.6	Patogeneza proteznog stomatitisa udružena sa pojavom gljiva roda <i>Candida</i>	11
1.7	Dijagnoza proteznog stomatitisa	12
1.8	Terapija proteznog stomatitisa izazvanog gljivama roda <i>Candida</i>	13
1.8.1	Terapija antimikoticima	13
1.9	Antimikotično dejstvo etarskih ulja i njihova moguća primena u terapiji proteznog stomatitisa.....	17
1.10	<i>In vitro</i> evaluacija antimikotične aktivnosti etarskih ulja.....	18
1.10.1	Agar difuzioni test	18
1.10.2	Agar dilucioni test.....	19
1.10.3	Dilucioni metod.....	19
1.10.4	Test aktivnosti gasovite faze etarskih ulja	20
1.11	Antimikotično dejstvo etarskih ulja na gljive roda <i>Candida</i>	21
1.12	Mehanizam delovanja etarskih ulja i njihovih komponenti.....	22
1.13	<i>In vivo</i> studije, toksikološki rezultati i farmaceutska formulacija	24
1.14	Etarska ulja kao alternativa ili terapijska dopuna klasičnim antifungalnim agensima- novi terapijski pristup infekcijama izazvanim <i>Candida</i> spp.....	27
1.15	Naučna osnova problema.....	28
2.	C I L J I S T R A Ž I V A N J A	30
3.	MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA.....	32
3.1	Klinička procedura.....	33
3.2	Laboratorijska istraživanja	34

3.2.1	Uzorkovanje	34
3.2.2	Mikrobiološka obrada uzoraka i identifikacija gljiva i bakterija.....	37
3.2.3	Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja cimeta, limuna, grejpfruta, čajnog drveta i timijana na izolovane sojeve roda <i>Candida</i> u <i>in vitro</i> uslovima.....	38
3.3	Statistička obrada podataka.....	44
4.	R E Z U L T A T I.....	45
4.1	Kliničko-epidemiološki deo	46
4.1.1	Učestalost proteznog stomatitisa i kliničke forme proteznog stomatitisa kod pacijenata koji nose totalne zubne proteze	46
4.1.2	Učestalost proteznog stomatitisa, izazvanog gljivama roda <i>Candida</i> kod pacijenata koji nose totalne zubne proteze, u odnosu na učestalost proteznog stomatitisa izazvanog mehaničkim faktorima.....	47
4.2	Mikrobiološki deo.....	58
4.2.1	Analiza metoda za uzorkovanje mikrobiološkog materijala	58
4.2.2	Kvantitativna i kvalitativna analiza mikrobiološkog nalaza kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije	66
4.3	Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja na izolovane sojeve gljiva roda <i>Candida</i> u <i>in vitro</i> uslovima	73
4.3.1	Određivanje vrednosti MIK za etarska ulja limuna, grejpfruta, čajnog drveta, cimeta, timijana.....	73
4.3.2	Određivanje vrednosti MFK za etarska ulja limuna, grejpfruta, čajnog drveta, cimeta, timijana.....	78
5.	D I S K U S I J A	88
6.	Z A K L J U Č C I.....	102
7.	L I T E R A T U R A	105
8.	P R I L O Z I.....	123
9.	B I O G R A F I J A	129

SPISAK SKRAĆENICA

spp. – *species*, vrste

CFU - *colony forming units*, broj kolonija

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Evropski komitet za ispitivanje osetljivosti na antimikrobna sredstva

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Institut za kliničke i laboratorijske standarde

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MFK – minimalna fungicidna koncentracija

PCR - *polymerase chain reaction*, reakcija lančane polimeraze

RFLP - *restriction fragment length polymorphism*, polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata

NRLUM – *Nacionalna referentna laboratorija za uzročnike mikoza*, Medicinski fakultet, Beograd

1. U V O D

1.1 Protezni stomatitis

Protezni stomatitis predstavlja hronični inflamatorni proces koji zahvata palatinalnu sluzokožu nepca, koja je pokrivena totalnom ili parcijalnom zubnom protezom. Karakteriše se zapaljenjem i pojavom eritema onih delova oralne sluzokože koji su pokriveni bazom proteze (Arendorf i Walker, 1987; Wilson, 1988; Reichart, 2000). U većini slučajeva protezni stomatitis nije praćen simptomima i pacijenti nisu svesni prisutnog oboljenja. To je razlog zbog koga se protezni stomatitis, u većini slučajeva, otkriva tek tokom stomatološkog pregleda (Budtz-Jorgensen, 1974; Wilson, 1998). Pacijenti sa proteznim stomatitisom se retko žale na peckanje, nelagodnost i poremećaj ukusa.

Prema Njutnovoj klasifikaciji iz 1962. godine, koja je revidirana od strane Budtz-Jorgensona i Bertrama 1970. godine, tri tipa proteznog stomatitisa su opisana na osnovu svojih kliničkih karakteristika:

Tip 1. Petehije raspoređene po bilo kom delu ili celoj palatinalnoj sluzokoži koja je u kontaktu sa protezom (lokalizovano zapaljenje) (Slika 1)

Tip 2. Makularni eritem bez hiperplazija (generalizovano zapaljenje) (Slika 2)

Tip 3. Difuzni ili generalizovani eritem sa papilarnom hiperplazijom (Slika 3)



Slika 1. Protezni stomatitis tip I



Slika 2. Protezni stomatitis tip II



Slika 3. Protezni stomatitis tip III

Epidemiološke studije pokazuju da je prevalenca proteznog stomatitisa kod pacijenata koji nose zubne proteze u rasponu od 15% pa do preko 75% (Budtz-Jorgensen, 1981; Web i sar., 1998; Ramage i sar., 2004; Gendreau i Loewy, 2011). Učestalost proteznog stomatitisa je veća u starijih osoba i među ženama (Shulman i sar., 2005; Zissis i sar., 2006; Figueiral i sar., 2007).

Protezni stomatitis je u posledica hronične infekcije i/ili mehaničke povrede. Gljive roda *Candida* su najčešći uzročnici ovog oboljenja.

1.2 Etiologija proteznog stomatitisa

Etiopatogeneza proteznog stomatitisa je multifaktorijalna. Faktori povezani sa razvojem proteznog stomatitisa su: lokalni i opšti (Wilson, 1998; Figueiral i sar., 2007).

Lokalni faktori su: lezije oralne sluzokože uzrokovane neadekvatnim protezama, neprekidno nošenje zubne proteze, smanjeno lučenje pljuvačke, loša higijena zubne proteze, vrsta materijala od koga je izrađena proteza, starost proteze, slaba retencija proteze, neizbalansirana okluzija (Oksala, 1990).

Starost proteze je bitan etiološki faktor proteznog stomatitisa, jer kod dugo nošenih proteza teže se održava higijena i prisutna je tendencija ka poroznosti baze proteze, što favorizuje nastanak infekcije (Butz- Jorgenson, 1981).

Infekcija gljivama roda *Candida* se češće javlja kod žena, što se objašnjava hormonskim faktorima i deficitom gvožđa (Figueiral i sar., 2007).

Opšti faktori su: *diabetes mellitus*, pušenje, dugotrajna primena antibiotika i kortikosteroida, radio- i hemoterapija, faktori ishrane (nedostatak vitamina B12, folata i gvožđa), psihotropni lekovi, hiposalivatori (Soysa i sar., 2004; Soysa i Ellepola, 2005; Soysa i sar., 2006). *Diabetes mellitus* se smatra jednim od predisponirajućih faktora za nastanak oralne kandidoze. Kod insulin zavisnih dijabetičara nošenje zubne proteze i loša higijena proteze su povezani sa kolonizacijom gljivama roda *Candida*. Čelije oralne sluzokože u dijabetičara pokazale su povećanu adheziju za *C. albicans* (Darwazeh i sar., 1990; Dorocka-Bobkowska i sar., 1996), što je utvrđeno na histološkom nivou degradacijom proteina, koja predisponira nastanak infekcije. Još jedan faktor može da favorizuje infekciju kod dijabetičara, a to je poremećena funkcija neutrofilnih granulocita, posebno u prisustvu glukoze. Redukovan protok pljuvačke, takođe, može igrati ulogu u kolonizaciji gljivama roda *Candida* (Soysa, 2006).

Prisustvo zubne proteze u usnoj duplji, zajedno sa lokalnim promenama oralne sluzokože nastalim kao posledica mehaničke iritacije i sistemskim komplikacijama, može

doprineti pojavi infekcije gljivama roda *Candida*. Prisustvo zubne proteze može smanjiti pH pljuvačke, protok pljuvačke i ometati mehaničko čišćenje mekih tkiva (de Andrade, 2012). Pored toga, protezom izazvana trauma smanjuje otpornost tkiva na infekciju zbog povećane propustljivosti epitela za solubilne antigene i enzime gljiva roda *Candida* (Figueiral i sar., 2007). Takođe, akrilatna površina zubne proteze služi kao rezervoar mikroorganizama (Lockhart i sar., 1999; Sumi i sar., 2002). U prostoru između gingivalne površine baze gornje totalne zubne proteze i sluzokože nepca, kada je prisutna dobra retencija, smanjuje se protok pljuvačke i dinamika promene pH pljuvačke, što dovodi do stvaranja kisele sredine, povoljne za nastanak gljivične infekcije. U donjoj vilici retencija zubne proteze je slabija, tako da se menja i pH i protok pljuvačke, zbog čega je u donjoj vilici ređa pojava proteznog stomatitisa.

Pušenje je važan faktor u nastanku oralne kandidoze (Soysa i Ellepola, 2005). Nikotin menja površinu oralne sluzokože i na taj način smanjuje otpornost sluzokože na infekciju.

Neuhranjenost je česta kod starih osoba, pa je loš oralni status povezan sa neuhranjenošću (Sheiham, 2001). Veza između oralne kandidoze i nutritivnih nedostataka je dokazana. Visoka prevalenca neuhranjenosti (nizak nivo hranljivih proteina) je zabeležena u populaciji sa infekcijom *Candida* spp., u odnosu na kontrolnu grupu bez infekcije (Paillaud, 2004).

Jasna uzročno-posledična veza između navedenih faktora i proteznog stomatitisa još nije utvrđena. Najviše dokaza ukazuje da se oboljenje javlja kao odgovor na infekciju uzrokovanu gljivama roda *Candida* (Budtz- Jorgenson, 1981; Webb i sar., 1998; Ramage i sar., 2004).

Mikroorganizmi koji žive u usnoj duplji čine oralni mikrobiom. Oralni mikrobiom utiče na nastanak i tok oralnih oboljenja. Do sada su uglavnom bile opisane bakterijske vrste mikrobioma. Ghannoum i sar. (2010) su prvi identifikovali „bazalni mikrobiom“ zdravih osoba dajući sastav gljiva. Zahvaljujući tome dali su osnovu za dalju analizu oralnog mikrobioma, posebno za razlikovanje mikrobioma kod zdravih i bolesnih osoba.

1.3 Uloga gljiva roda *Candida* u nastanku proteznog stomatitisa

Gljive roda *Candida* su sastavni deo fiziološke flore sluzokože usne duplje, respiratornog, digestivnog trakta, vulvovaginalne regije i površine kože. Gljive roda *Candida* nisu primarni već oportunistički patogeni, često veoma uporni i rezistentni na terapiju. To su jednoćelijske gljive - kvasnice, koje su nepokretne; predstavljaju aerobe, razmnožavaju se nepolno - pupljenjem. Gljive roda *Candida* najčešći su uzročnici oportunističkih infekcija i utiču na morbiditet imunodeficientnih bolesnika (Kremery i sar., 1999). Takođe su najčešći uzročnici gljivičnih oboljenja kod HIV pozitivnih bolesnika (Perezous i sar., 2005). Rod *Candida* broji oko 200 vrsta, ali samo desetak vrsta ovog roda su uzročnici gljivičnih infekcija kod čoveka. To je prvenstveno *C. albicans*, zatim *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*.

C. albicans je najčešće izolovana gljiva u usnoj duplji (oko 80%), zbog svoje sposobnosti da se adherira i kolonizuje oralnu sluzokožu i površinu zubne proteze i sposobnosti da gradi agregate sa oralnim bakterijama (Ramage i Lopez-Ribot, 2005; Ribeiro i sar., 2012). *C. albicans* je izolovana iz sluzokože nepca (89%) i/ili gornje proteze (78,5%) kod bolesnika obolelih od proteznog stomatitisa (Gasparoto i sar., 2009). Pored *C. albicans* izolovane su i druge vrste roda *Candida*, koje učestvuju u nastanku oboljenja: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefir*, *C. dubliniensis* (Coco i sar., 2008).

Zbog faktora, kao što su adhezija na epitelne ćelije sluzokože, dimorfizam (sposobnost za konvertovanje iz jednoćelijske forme u filamentoznu formu), lučenje enzima (sekretorne aspartil proteinaze i fosfolipaze) i formiranje biofilma, *C. albicans* ispoljava patogenost širokog spektra i izaziva infekcije u različitim sistemima domaćina (Soll, 2003).

Poslednjih godina u nekoliko studija otkriven je visok procenat non-*albicans* vrsta roda *Candida* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. dubliniensis*) u odnosu na *C. albicans*, kao uzročnika infekcija oralne sluzokože (Samaranayake i sar., 1994; 2001). *C. glabrata* se javlja kao druga najčešća vrsta roda *Candida* (Coco i sar.,

2008). Sistemske infekcije u imunosupresivnih pacijenata su uglavnom uzrokovane sa vrstom *C. glabrata* i uzrok su visoke stope smrtnosti (Kremery Jr i sar., 1999). Bagg i sar. (2003) su ukazali da je *C. glabrata* uzročnik kandidoze kod 72% pacijenta obolelih od karcinoma. *C. glabrata* je otporna na flukonazol i itrakonazol (Thomson i sar., 2010).

Povećana upotreba antimikotičnih lekova u lečenju kandidoze je doprinela da non-*albicans* vrste roda *Candida* budu sve češće uzročnici kandidoze (Martinez i sar., 2002). *C. albicans* je osetljiva na flukonazol, pa su zato non-*albicans* vrste počele da dominiraju kao uzročnici infekcija (non-*albicans* vrste roda *Candida* su rezistentne na flukonazol).

1.4 Adhezija i kolonizacija zubnih proteza gljivama roda *Candida*

Candida, kao i druge gljive, ima sposobnost da se adherira i raste na sintetičkim materijalima, na sličan način kao što to radi na oralnim tkivima i formira biofilm (Blankenship, 2006). Mobilne zubne proteze su napravljene uglavnom od polidimetilmetakrilata. Ponekad su proteze podložene mekim akrilatima, tkivnim kondicionerima ili proteznim lepkovima. Ovi materijali su propustljivi i/ili neravni, što omogućava laku retenciju gljiva i formiranje biofilma (Allison i Douglas, 1973).

Nekoliko publikacija Sumi i sar. (2002) je ukazalo da respiratorni patogeni pre kolonizuju zubnu protezu nego meka tkiva kao što je nepce.

Razmnožavanje bakterija je povezano sa razmnožavanjem *Candida* spp. u biofilmu (Hsu, 1990). Jedna *in vitro* studija ukazuje da se adhezija *C. albicans* na akrilatnu površinu proteze vrši u prisustvu streptokoka (*S. sanguis* i *S. salivarius*). Druga *in vitro* studija je pokazala da je kolonizacija akrilata *C. albicans* poboljšana, ako se dešava istovremeno u prisustvu *S. mutans* (Branting, 1989). Ovo može biti u vezi sa „quorum sensing“ molekulama, preko kojih komuniciraju ćelije bakterija i gljiva. „Quorum sensing“ male

molekule javljaju se u zajednicama pojedinačnih vrsta bakterija i u složenim bakterijsko-gljivičnim zajednicama (Pereira-Cenci i sar., 2008).

Na količinu gljivične adhezije utiču: različite karakteristike slobodne površinske energije biomaterijala, površinska hrapavost, hidrofobnost materijala (Klotz, 1985; Ramage, 2006). Površinska hrapavost je u pozitivnoj korelaciji sa stopom gljivične kolonizacije biomaterijala, tako da neravna površina može da bude faktor rizika za adheziju mikroorganizama i formiranje biofilma (Pereira-Cenci, 2008). Adhezija *C. albicans* na topopolimerizujući polidimetilmetakrilat je upoređena sa dva meka akrilata sa različitim stepenom površinske hrapavosti. Ova studija je demonstrirala da od 3 testirana različita materijala, adhezija *Candida* je manja na glatkoj nego na hrapavoj površini. Takođe, u ovoj studiji je bila manja adhezija *C. albicans* na topopolimerizujućem tvrdom akrilatu nego na mekim akrilatima. Dodatno, adhezija *Candida* je smanjena prisustvom salivarne pelikule (Radford, 1998).

Uloga pljuvačke u procesima adhezije je kontroverzna. Pljuvačka pokazuje efekat čišćenja, smanjuje hrapavost akrilata (Radford i sar., 1998) i površinsku slobodnu energiju akrilata (Sipahi i sar., 2001). Molekule koje produkuje imuni sistem: lizozim, histamin, laktoferin, calprotectin i IgA interaguju sa vrstama *Candida* čime se smanjuje adhezija i kolonizacija oralnih površina (Dodds i sar., 2005). Ostale komponente pljuvačke: mucin (Dodds i sar., 2005), statherin i prolin - jedinjenja bogata proteinima (Tanida i sar., 2001) olakšavaju adheziju *Candida* na akrilat. Veliki broj studija je urađen o uticaju pljuvačke na adheziju *Candida*. Većina tih studija su kontradiktorne. Došlo se do zaključka da pljuvačka ima dinamički efekat u zavisnosti od morfološke faze *C. albicans*, gde se adhezija povećava u prisustvu pljuvačke, a zatim smanjuje nakon 24h, ako je došlo do transformacije gljivične ćelije u filamentoznu formu (Ramage i sar., 2004; Pereira- Cenci i sar., 2008).

Candida ima sposobnost da se razvija na oralnim implantima koji se koriste kao podrška proteze. *C. albicans* adherira i raste na različitim površinama, kao što su implantati titanijuma, staklo titanijuma, cirkoniji (Hamburgeri, 2010).

Većina pacijenata, koji imaju hroničnu parodontopatiju, nose parcijalne ili totalne zubne proteze. Adhezija *C. albicans* na epitelne ćelije (uzorci prikupljeni iz parodontalnih džepova) znatno je veća u grupi ispitanika sa parodontopatijom u odnosu na kontrolnu grupu. Uloga *C. albicans* u parodontopatiji se još uvek ispituje. Dokazano je da parodontalni džep može poslužiti kao rezervoar *Candida* kod krezubih pacijenata, koji nose parcijalnu zubnu protezu (Machado, 2011).

1.5 Formiranje biofilma mikroorganizama u usnoj duplji

U usnoj duplji većina mikroorganizma koji kolonizuju ili izazivaju infekcije ne nalaze se kao pojedinačne ćelije, već kao složene zajednice mikroorganizama, zatvorene unutar ekstracelularnog matriksa na biotičkim i abiotičkim površinama (Ramage i sar., 2004). Takav biofilm se formira i na zubnoj protezi.

U usnoj duplji svaka površina, bila ona prirodna ili veštačka, biva prekrivena za trideset minuta slojem pljuvačnih glikoproteina i imunoglobulina, debljine 0.5-1.5 μm koji formira stečenu peliklu. Bakterije i gljive konvertuju materije, poput saharoze, u protezni plak. Proces je izraženiji u slučaju smanjenog protoka pljuvačke (Strajnić i sar., 2011).

Površina zubnih nadoknada najpre se kolonizuje mikroorganizmima, a zatim se formira biofilm. Stvaranje biofilma *C. albicans* odvija se u tri faze. Prva, rana faza traje oko 11 časova i sastoji se od adhezije i agregacije gljiva, čime se formiraju mikrokolonije. Druga faza je prelazna, traje 12-30 časova, karakteriše je kontinuiran rast gljiva, stvaranje ekstracelularnog polisaharidnog matriksa i početak diferencijacije gljivičnih ćelija u hife i pseudohife. Biofilm sazreva u trećoj fazi, koja traje do 72 časa, a završava se potpunim prekrivanjem zubne nadoknade ekstracelularnim matriksom i gljivičnim ćelijama. Ova komponenta matriksa sadrži ćelije domaćina i bakterije/gljive.

Biofilm na površini proteze formira depozite plaka koji za sluzokožu predstavlja izvor kontinuiranog izlaganja sluzokože mikroorganizmima. Filamentozne forme gljiva

dublje prodiru u porozan protetski materijal, što bi mogao i biti razlog njihovoj većoj rezistenciji na antimikrobnu terapiju (Gendreau i Loewy, 2011). Nađeno je da je *C. albicans* nastanjena na hrapavijoj površini otpornija na terapiju, a pošto su gljivične ćelije značajno veće od bakterijskih ćelija, gljivičnim ćelijama dimenzionalno više odgovaraju neravnine hrapave protezne površine.

Mehaničko i hemijsko uklanjanje biofilma gljiva predstavlja klinički problem (Čandra, 2005), jer su gljive snažno vezane za gradivni materijal baze proteze, što je verovatno rezultat mikroporoznosti površine proteze (Nalbant, 2008).

Pored toga što nastanjuju površinu baze proteze, gljive roda *Candida* u još većoj meri nastanjuju i lajnere-materijale za podlaganje proteza. Zbog toga je lajnere potrebno koristiti sa velikim oprezom, pogotovu kod pacijenata koji su imali protezni stomatitis, udružen sa pojavom gljiva roda *Candida* (Valentini i sar., 2013).

Većina istraživanja vezanih za biofilm odvija se na poznatim *in vitro* i *in vivo* modelima (Tournu i Van Dijck, 2012) i obuhvata različite aspekte razvoja biofilma kao što su favorizujući faktori za formiranje biofilma, mehanizam sazrevanja biofilma, sastav biofilma, interakcije između različitih mikroorganizama u biofilmu i sl. Nađeno je da biofilm na zubnim protezama, urađenim od polidimetilmetakrilata, u svom sastavu sadrže više gljiva roda *Candida* nego biofilm na drugim restaurativnim i protetskim materijalima, koji se koriste u stomatologiji (Busscher i sar., 2010).

Smatra se da bakterijska adhezija podstiče adheziju *Candida*, što je i očekivano, s obzirom da se bakterije na površini polidimetilmetakrilata mogu izolovati već za par sati, a gljive nakon nekoliko dana (Avon i sar., 2007). Većina oralnih streptokoka poseduje antigen I/II, receptor ćelijskog zida, preko koga se vrši vezivanje sa mikroorganizmima, među kojima je i *C. albicans*, što je istraživače navelo da zaključe da bi smanjenje bakterija moglo da smanji i broj gljiva u biofilmu (Bamford i sar., 2009).

Različiti bakterijski rodovi su identifikovani u proteznom biofilmu kao što su: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacilus*, *Prevotella*, *Actinomyces* (Koopmans, 1988).

S obzirom da je adhezija gljiva neophodan korak za formiranje biofilma, smatra se da uklanjanje streptokoknog biofilma može da spreči formiranje više patogenog biofilma gljiva. Prelazak sa jednobakterijskog na više patogeni biofilm koji uključuje gljive, više je pod uticajem zapaljenja sluzokože i opšteg stanja zdravlja pacijenta nego vrste i površinskih karakteristika proteznog materijala (Avon i sar., 2007).

1.6 Patogeneza proteznog stomatitisa udružena sa pojavom gljiva roda *Candida*

Patogeneza proteznog stomatitisa, udružena sa pojavom gljiva roda *Candida* dosta je proučavana i smatra se multifaktorijalnom. Uključuje lokalne i opšte faktore koji se odnose na domaćina, kao i na sposobnost gljiva da adheriraju za epitel i prodiru kroz epitelna tkiva domaćina (Bilhan i sar., 2009). Protezni stomatitis se pojavljuje kada mikro uslovi u usnoj duplji postanu pogodni za rast gljiva ili kad opšti (sistemski) faktori domaćina dovedu do opadanja sposobnosti imunskog sistema.

Teoretski, patogenesa proteznog stomatitisa udružena sa infekcijom gljivama roda *Candida*, bila bi sledeća:

1) Prisustvo bakterija rodova *Streptococcus* i *Actinomyces* indukuje organizam da produkuje proteaze (IgA1) i enzime (amini-peptidaze, hijaluronidazu, hondroitinazu i neuraminidazu) koji su sposobni da degradiraju oralni epitel. 2) Ovi agresivni enzimi, u bliskom kontaktu sa mukozom, indukuju zapaljenski odgovor sluzokože, koji olakšava penetraciju gljiva roda *Candida* u spoljašnje slojeve epitela. 3) Imunski sistem dodatno reaguje i zapaljenski proces se pojačava.

Eksperimentalni podaci pokazuju da odloženi odgovor na penetraciju *C. albicans* značajno doprinosi zapaljenskom procesu i da je eksfolijacija epitelних ćelija, koja vodi u atrofiju epitela, tipična pojava kod ovog tipa proteznog stomatitisa (Salerno i sar., 2011).

1.7 Dijagnoza proteznog stomatitisa

Dijagnoza proteznog stomatitisa se postavlja kliničkim pregledom sluzokože nepca i mikrobiološkom analizom.

A) Klinička dijagnoza proteznog stomatitisa

Klinička prezentacija oralne kandidoze kreće bez simptoma (za većinu slučajeva). Nekada se može javiti peckanje ili neprijatan slan ili gorak ukus. Najlakše je prepoznati klinički uzorak akutne pseudomembranozne kandidoze („drozd“) koji se karakteriše belim naslagama, koje se mogu ukloniti. Drugi klinički oblik kandidoze je angularni hejlitis, koji je manifestacija infekcije gljivama, ali i infekcije bakterijama rodova *Staphylococcus* (*S. aureus*) i *Streptococcus* (*S. pyogenes*) (Gonsalves, 2008).

Kod pacijenata koji nose zubne proteze, oralna kandidoza može biti u obliku tri tipa proteznog stomatitisa (Coco, 2008).

B) Mikrobiološka dijagnoza proteznog stomatitisa

Mikrobiološka dijagnostika koristi različite uzorke i tehnike uzimanja uzoraka koje uključuju: uzimanje ispirka usta, bris pojedinih oralnih tkiva (npr. nepca) ili bris same zubne proteze (Bagg i sar., 2003). Zasejavanjem uzoraka na hranjive diferencijalne podloge dokazuje se prisustvo gljiva. Porastom kolonija gljiva na diferencijalnim hranjivim podlogama (CHROMagar) mogu se razlikovati vrste u okviru roda *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*). Pored toga test germinacione diferencijacije (ima važnu ulogu u vezi invazivnosti, adhezije i virulentnosti) mikroskopiranjem je „zlatni“ standard za dijagnostiku proteznog stomatitisa izazvanog gljivama roda *Candida* (Webb i sar., 1998).

Osnovna mikroskopska morfološka karakteristika je da su sve gljive gram pozitivne. Oblici blastospora mogu da variraju od jedne ovalne, izdužene ili sferne forme. Veličina *C. albicans* varira između $3-7 \times 3-14 \mu\text{m}$ (Odds, 1988). Pošto vrsta *C. glabrata* ne može da formira pseudohife, ova funkcija je jedna od glavnih identifikacionih razlika sa

drugim *Candida* spp. Prisustvo germinativnih tuba i hlamidiospora su od pomoći u identifikaciji *C. albicans* (Varren, 1991). Razvijeno je nekoliko fenotipskih i molekularnih pristupa za brzu i tačnu identifikaciju *C. glabrata*, uključujući primenu metoda kao što su: reakcija lančane polimeraze (polymerase chain reaction, PCR), polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (restriction fragment length polymorphism, RFLP) ili nasumično umnožena polimorfna DNK (Random Amplified Polymorphic DNA, RADP) (Valerio, 2006; Li i sar., 2007).

C) Histološki nalaz proteznog stomatitisa

Kod proteznog stomatitisa postoji histološki dokaz o proliferativnim i degenerativnim promenama sa smanjenom keratinizacijom i atrofijom epitela (Scully i Crispian, 2008).

1.8 Terapija proteznog stomatitisa izazvanog gljivama roda *Candida*

Biofilm gljiva na oralnoj sluzokoži, zubima i zubnim nadoknadama, uzrok je ili kontributivni faktor oboljenjima tvrdih i mekih tkiva usne duplje. Pošto govorimo o stanju oralne sluzokože, koja je prirodna sredina mnogim mikroorganizmima, primena antibiotika je svedena na strogo indikovana stanja. U terapiji proteznog stomatitisa se mogu koristiti sistemski i lokalni antimikotici.

1.8.1 Terapija antimikoticima

Antimikotici su velika grupa antimikrobnih lekova koji se koriste u terapiji gljivičnih oboljenja. Najčešće korišćeni antimikotici u stomatologiji su iz grupe poliena (nistatin i amfotericin B) i iz grupe azola (mikonazol, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol).

- Nistatin (iz grupe makrolidnih poliena). Nistatin se vezuje za ergosterol prisutan u ćelijskoj membrani gljivične ćelije i prekida osmotsku funkciju ćelijske membrane,

što dovodi do smrti ćelije. Nistatin ima uzak spektar delovanja, ali dobro deluje na gljive roda *Candida*. Pri lokalnoj ili per os primeni, gotovo se i ne resorbuje. Neželjeni efekti izuzetno su retki, alergijske reakcije nisu zapažene, lek ima izrazit neprijatan gorak ukus. Koristi se u obliku pastila i suspenzije.

- Amfotericin B se češće koristi u lečenju sistemskih gljivičnih infekcija, jer se može primenjivati intravenski. Neželjeni efekti se javljaju u vidu mučnine, povraćanja i groznice.
- Azoli predstavljaju veliku grupu antimikotika, podeljenu na: imidazole, (u koje spadaju mikonazol, ketokonazol i klotrimazol), i triazole (flukonazol i itraconazol). Azolni preparati inhibiraju put biosinteze ergosterola, ugrožavaju fluidnost, asimetriju i integritet gljivične ćelijske membrane, što dovodi do fungistatičkog efekta (Carrillo-Munoz i sar., 2006). Mikonazol se može koristiti lokalno i sistemski, mada sistemska primena nosi sa sobom niz neželjenih efekata kao što su anafilaktičke reakcije, halucinacije, poremećaj vida, hematološke poremećaje, anemija, svrab i osip po koži, tahikardije, reverzibilno toksično dejstvo na jetru. Mikonazol se koristi u obliku pastila ili češće u obliku oralnog gela (Seymour i sar., 1999).

Dva najčešće korišćena antimikotika u stomatološkoj praksi su nistatin i mikonazol. Britanska nacionalna studija je utvrdila da je nistatin vodeći antimikotik u lečenju oralne kandidoze, a mikonazol drugi (Oliver i sar., 2004). U Španiji je mikonazol lek izbora; smatra se da je veća učestalost korišćenja mikonazol gela uzrokovana prijatnijim ukusom u odnosu na preparate nistatina (Beneyto - Martinez i sar., 2010). Rezistencija na poliene je retka. Vrste roda *Candida* (*C. glabrata* i *C. krusei*) su prirodno manje osetljive na azolne antimikotike, na koje vrsta *C. albicans* može razviti rezistenciju (Niimi i sar., 2010). Međutim, ovi lekovi ne mogu da prodru u sam matriks biofilma, te dobro zaštićene gljive u ekstracelularnom matriksu mogu preživeti (Uzunović-Kamberović, 2009). Pri lokalnoj oralnoj antifungalnoj terapiji mora se voditi računa i o specifičnostima sredine u kojoj lek deluje. Dejstvo oralne muskulature i neprestan protok pljuvačke pokazuju tendenciju

razređivanja lokalno primenjenih koncentracija lekova. Ovo dovodi do pada efektivnih terapijskih koncentracija nistatina i mikonazola (Samaranayake i MacFarlane, 1989; MacFarlane i Samaranayake, 1990). Posledica toga je izlaganje gljiva suboptimalnim dozama antimikotika, kao i variranje koncentracije leka u različitim delovima usne duplje.

Pored antimikotika, u lečenju proteznog stomatitisa koriste se i antiseptici. Takva sredstva na gljive deluju hemijski i ukoliko se govori o uništavanju gljivičnih ćelija na veštačkim površinama (kakve su zubne proteze) deluju kao dezinficijensi, a ukoliko se govori o sprečavanju rasta i razvoja na koži i sluzokožama, deluju kao antiseptici. Grupe antiseptika koje se koriste u stomatologiji su: alkoholi, aldehidi, bis-biguanidi (ovoj grupi pripada najpoznatiji antiseptik korišćen u praksi – hlorheksidin), jodofori (povidon-jod), oksidirajući agensi (hidrogen-peroksid, natrijum perborat), fenoli, krezoli i njihovi derivati, boje (gencijana-violet) i dezinficijensi koji deluju na viruse hepatitisa i HIV-a (natrijum-hipohlorit) (Brown i sar., 1999).

Natrijum-hipohlorit se tradicionalno koristi za dezinfekciju proteza zbog svoje efikasnosti za ubijanje širokog spektra mikroorganizama, uključujući i gljive roda *Candida*. Osim toga, direktno deluje na organski matriks proteznog plaka, što dovodi do raspada strukture polimera, verovatno zbog oksidacije proteina (Nikawa i sar., 1999). Natrijum-hipohlorit (1% i 2%) uklanja preko 90% biofilma. Koristeći skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM) dokazano je da natrijum-hipohlorit uklanja biofilm sa akrilatnih površina. Međutim, upotreba natrijum-hipohlorita ima ograničenja, zbog svog korozivnog efekta na metal.

Hlorheksidin se intenzivno koristi u stomatologiji kao preventivno sredstvo, koje deluje na širok spektar gram „+“ i gram „-“ bakterija, gljiva, fakultativno anaerobnih i aerobnih mikroorganizama. Hlorheksidin se u niskim koncentracijama akumulira na površini ćelije bakterija i gljiva, indukuje dezorganizaciju ćelijske membrane i curenje komponenti citoplazme; veće koncentracije izazivaju koagulaciju citoplazme i ne menjaju morfologiju ćelija. Hlorheksidin od 0,2% suzbija adheziju *C. albicans* na ćelije sluzokože usne duplje, a od 2% suzbija i formiranje biofilma na akrilatnoj površini proteza (Ellepoda i

Samaranayake, 2000). U sastavu tečnosti za ispiranje usta u koncentracijama je od 0,2% i 0,12%.

Neke antimikrobne supstance pored ubijanja mikroorganizama u biofilmu, uklanjaju i biofilm, što je važno, jer bi „mrtav“ biofilm mogao biti i dalje aktivan kao izvor endotoksina, i mogao bi poslužiti kao podloga na kojoj bi se izvršila brza kolonizacija mikroorganizama. Zato se smatra da je natrijum-hipohlorit pravi izbor za čišćenje proteza, jer natrijum-hipohlorit uklanja i biofilm (da Silva i sar., 2011).

Uobičajena terapijska procedura u lečenju proteznog stomatitisa (Janković i sar., 2007) sastoji se od tri faze:

1. Primena lokalnih antimikotika, najčešće Daktanol oralni gel 2% koji se četiri puta dnevno nanosi na obolelu sluzokožu (ili se može naneti na površinu proteze).
2. Poboljšanje higijene usne duplje i proteze. Natrijum-hipohlorit za toaletu akrilatnih proteza (1 kafena kašičica na 100 ml vode; protezu treba držati potopljenu 15 minuta, a potom isprati pod mlazom vode 2 minuta).
3. Podlaganje postojećih ili izrada novih zubnih proteza.

Rezistencija mikroorganizama na antimikrobne lekove predstavlja sve veći problem u savremenoj medicini. S obzirom da su gljivične infekcije često rekurentne, ponovljeno izlaganje antimikoticima može dovesti do razvoja rezistencije. To posebno treba imati na umu kod gljivičnih infekcija usne duplje u kojima se, zbog pljuvačke i dejstva mišića, teško može postići optimalna koncentracija leka, a još teže ravnomerno rasporediti lek. Upotreba antimikotika nosi sa sobom i neke rizike, koji se ispoljavaju u vidu raznih neželjenih dejstava, preosetljivosti i interakcija sa drugim lekovima, koje pacijent koristi. Takođe, postoje medicinski ozbiljnija stanja koja se mogu razviti u organizmu i kod kojih je primena ovakvih lekova od veće važnosti u odnosu na protezni stomatitis. Antimikotici u takvim slučajevima nemaju dejstva ni na formirani biofilm, koji obezbeđuje gljivama mnogo sigurnije okruženje za opstanak u nepovoljnim uslovima. Stoga je opravdano pokušati terapiju proteznog stomatitisa sredstvima koja istovremeno deluju i na biofilm i na

mikroorganizme, a da pri tome nema pojave rezistencije, neželjenih efekata, ni ograničenja u primeni.

1.9 Antimikotično dejstvo etarskih ulja i njihova moguća primena u terapiji proteznog stomatitisa

Lekovita svojstva biljaka su poznata od davnina; poslednjih godina je povećano njihovo korišćenje, pogotovo u razvijenim zemljama (Pauli, 2006).

Etarska ulja su prirodni kompleksi, nestabilne mešavine jedinjenja terpenskog i neterpenskog porekla. Antimikotično dejstvo etarskih ulja na *Candida* vrste je bila predmet mnogih istraživanja, koja su potvrdila antimikotično dejstvo etarskih ulja i opisala način njihovog delovanja. Napredak metoda za izolovanje i hemijsku karakterizaciju etarskih ulja je doprineo razvoju istraživanja koja pokušavaju da dovedu u vezu hemijsku strukturu etarskih ulja sa intenzitetom antimikotične aktivnosti (Palmeira de Oliveira i sar., 2009).

Etarska ulja su složene mešavine isparljivih jedinjenja, koja nastaju sekundarnim metabolizmom biljaka. Etarska ulja se mogu ekstrahovati iz različitih delova biljaka (cvet, list, seme, plod). Skoro sva isparljiva ulja su složene hemijske smeše. Nije neuobičajeno za ulja da sadrže više od 200 komponenti i, često, sastojci koji se nalaze u tragovima su važni za ukupno dejstvo ulja. Etarska ulja pokazuju zajednička fizička svojstva: tečna su, nestabilna, bistra, rastvorljiva u organskim rastvaračima i u vodi. Imaju karakterističan miris, visok indeks refrakcije, optički su aktivna (što se koristi za njihovu identifikaciju) (Bakkali i sar., 2008).

Postoji nekoliko metoda za dobijanje etarskih ulja i drugih ekstrakata iz biljaka. Međunarodni standard Organization on Essential Oils (International Organization for Standardisation) propisuje da se etarska ulja dobijaju dejstvom vode, vodene pare ili suvom destilacijom iz biljnog materijala. Isparljiva jedinjenja terpenoidnog i neterpenoidnog porekla se mogu često naći u sastavu etarskih ulja. To su ugljovodonici i njihovi derivati sa kiseonikom. Neki mogu sadržati azot, i jedinjenja sumpora. Glavni sastojci mnogih etarskih

ulja su monoterpeni, sekviterpeni i diterpeni. Pored toga, fenilpropanoli, masne kiseline i njihovi estri su isparljive komponente ulja (Baser i Demitri, 2007).

Sastav aromatičnih biljaka i njihovih etarskih ulja može varirati u zavisnosti od klimatskih uslova, kvaliteta zemljišta i ostalih eksternih faktora, kao i genetskih faktora. Biljke iz istog taksona, ali sa specifičnim genetskim osobinama, mogu proizvesti hemijski različita etarska ulja, tzv. hemotipove. Zbog toga, pored vrste biljke, mora da bude opisan subspecies vrste i hemijski sastav ulja.

Postoji nekoliko tehnika i kriterijuma za procenu kvaliteta etarskih ulja, kao što su: senzorne, fizičke procene, hemijska ispitivanja i instrumentalne tehnike.

Fizičko-hemijski testovi su objavljeni u monografijama etarskih ulja koji odgovaraju standardima farmakopeje. Hromatografske tehnike su savremene metode koje se koriste za procenu kvaliteta etarskih ulja, najvažnija je gasna hromatografija. Nekoliko detektora može da se koristi u kombinaciji sa gasnom hromatografijom. Detektor jonizacije je neophodan za kvantitativnu analizu komponenti ulja. Pomoću spektrometra moguće je identifikovati komponente etarskih ulja (Baser i Demitri, 2007).

1.10 *In vitro* evaluacija antimikotične aktivnosti etarskih ulja

Da bi se utvrdila antimikrobna aktivnost etarskih ulja mogu se primeniti standardizovane metode: CLSI - Institut za kliničke i laboratorijske standarde (2008) i EUCAST- Evropski komitet za ispitivanje osetljivosti na antimikrobna sredstva (2012).

1.10.1 Agar difuzioni test

Difuzioni metod se koristi da se ispita uticaj različitih etarskih ulja na jedan mikroorganizam. Agar difuzioni test je metoda koja zavisi od koeficijenta difuzije i predložena je za proučavanje polarnih jedinjenja malih i srednjih molekula (Rios i sar., 1988).

Kod agar difuzionog testa se disk papir ili bunarčići natapaju ili pune odgovarajućim etarskim uljem. Potom se hranjiva podloga (agar) gusto zaseje ispitivanim sojem mikroorganizama. Nakon određenog vremena (18-20 h inkubacije u termostatu na temperaturi od 37°C), meri se prečnik eventualno formirane zone inhibicije oko diskova filter papira ili bunara. Veći broj faktora može uticati na rezultate ove metode: veličina diska, količina jedinjenja u disku, adsorpcija diska, tip agara i sastav agara. Često razlike u svojstvima difuzije lipofilne komponente etarskog ulja dovodi do nepravilnog oreola inhibicije i predstavlja teškoću za evaluaciju aktivnosti ulja (Inouyes i sar., 2001; Pauli, 2006). Rezultati zavise i od koeficijenta difuzije molekula, pa tako jedinjenja sa niskom antimikrobnom aktivnošću i visokim koeficijentom difuzije, mogu brže da prodiru u podlogu i daju velike zone inhibicije, u odnosu na aktivnost jedinjenja sa manjom difuzijom (Skorzoni i sar., 2007). Zbog izvesnih nedostataka metode, predloženo je da se agar difuzioni test koristi kao „skrining“ test za proveru antimikrobne aktivnosti etarskih ulja, da bi se izabrala najaktivnija ulja (Carson i Riley T, 1995; Burt, 2004).

1.10.2 Agar dilucioni test

Agar dilucioni test omogućava određivanje antimikrobne aktivnosti jednog uzorka etarskog ulja na nekoliko mikroorganizama. Metoda je preporučena za proučavanje složenih ekstrakata polarnih i nepolarnih jedinjenja (Rios i sar., 1988). Agar dilucioni test omogućava utvrđivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Kao nedostaci ove metode navode se: upotreba velike količine ispitivanog jedinjenja i dodavanje rastvarača ili deterdženata u agar za homogenizaciju. Može doći i do isparavanja test materijala, što utiče na dobijene rezultate (Pauli, 2006).

1.10.3 Dilucioni metod

Dilucioni metod je najbolji je za određivanje dejstva ispitivanog jedinjenja (Skorzoni i sar., 2007). Neophodno je da je etarsko ulje solubilno. Često se koriste organski

rastvarači za dobijanje rastvora, ali je njihova efikasnost u stabilizaciji emulzija nejasna (Inouyes i sar., 2001; Pauli, 2006). Dilucioni test pruža veće mogućnosti i omogućava utvrđivanje MIK i minimalne fungicidne koncentracije (MFK) (Inouyes i sar., 2001; Pauli, 2006). Za očitavanje rasta koristi se: vizuelna procena rasta, merenje optičke gustine (zamućenost) i brojanje kolonija (colony forming units/ CFU).

1.10.4 Test aktivnosti gasovite faze etarskih ulja

Pomoću testa aktivnosti gasovite faze etarskih ulja može se sagledati biološka aktivnost isparljivih jedinjenja etarskih ulja. Efekat isparljivih jedinjenja se analizira na osnovu inhibicije rasta gljiva na agaru. Postoje istraživanja koja su dokazala aktivnost gasovite faze ulja (Inouyes i sar., 2001; Lopez P, 2007). U ovoj metodi je važno napraviti razliku između direktnih i indirektnih efekata. Npr. zna se da je eugenol, kao sastavni deo ulja cimeta, aktivan u direktnom kontaktu, dok su pare ovog ulja pokazale dejstvo samo na *C. albicans* (Lopez, 2007). Nasuprot tome, ulje limunove trave ima veću antifungalnu aktivnost, nego eugenol u direktnom kontaktu (Suhr i Nielsen, 2003).

Nedostatak standardizacije metoda za ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja otežava poređenje rezultata. Za analizu rezultata su značajni sledeći faktori: metod i biljni materijal koji se koristi za dobijanje etarskih ulja, veličina inokuluma, faza rasta mikroorganizma koji se testira, medijum za kultivisanje i njegova pH vrednost, vreme i temperatura inkubacije (Mann i Markham, 1998; Inouyes i sar., 2001; Pauli, 2006). Biološka aktivnost biljnog proizvoda odnosi se na njegov sastav i može biti različita za različite tipove ekstrakata. Zbog toga, tačna priroda biljnih ekstrakata, koji se koriste u istraživanju, mora biti poznata (Mann i Markham, 1998; Duarte, 2005; Pauli, 2006).

Različiti izolati iste vrste mikroorganizama, i sojevi ATCC i klinički sojevi moraju biti testirani, da bi se uočile razlike u ponašanju (Mann i Markham, 1998; Pauli, 2006). Opisan je uticaj medijuma na aktivnost etarskih ulja. Vrednosti MIK se razlikuju pri dejstvu na isti mikroorganizam u dva različita medijuma; vrednost MIK je veća u agar medijumu od vrednosti dobijenih u bujon medijumu (Hammer, 1999).

1.11 Antimikotično dejstvo etarskih ulja na gljive roda *Candida*

U *in vitro* i *in vivo* studijama potvrđeno je dejstvo etarskih ulja i njihovih glavnih komponenti na *Candida* spp. (Carson i Riley, 1995; Hammer i sar., 2003; Giordani i sar., 2004; Tampieri i sar., 2005; Duarte, 2005; Pauli, 2006; Pinto i sar., 2006; Bozin i sar., 2007). Obično se, već na osnovu sastava etarskog ulja, može pretpostaviti aktivnost ulja. Ulja, koja se smatraju da imaju potencijalno antimikotično dejstvo, imaju veliki sadržaj fenola. Ulja *Origanum* spp. i *Thymus* spp. su bogata fenolom, i njihova aktivnost je uglavnom opisana (Monohar, 2001; Salgueiro, 2003; Pina –Vaz C i sar., 2004; Pinto i sar., 2006).

Thymus spp. ima antimikotično dejstvo na *Candida* spp. Hemotipovi, sa većim sadržajem fenola, nemaju veću antimikotičnu aktivnost (Consentino i sar., 1999; Giordani i sar., 2004). Uzorci drugačijih speciesa i iz hemotipova koji su bogati karvakrolom i timolom, (*T. pulegioides*, *T. vulgaris*, *T. Zigis*) imaju snažno dejstvo na rod *Candida* i klasifikovani su kao fungicidi. S druge strane, ulja bez fenola, bogata 1,8- cineol-om, poput *T. mastichina* i *T. capitellatus*, imaju slabije fungistatsko dejstvo (Pina –Vaz i sar., 2004; Pinto i sar., 2006; Salgueiro, 2006).

Etarsko ulje čajnog drveta (*Melaleuca alternifolia*) smatra se relevantnim antimikotičnim agensom (Carson i Riley, 1995; Hammer i sar., 1998; Oliva, 2003; Hammer i sar., 2004). *Melaleuca* spp. je široko dostupan u Australiji. Zbog svog značaja, sastav etarskog ulja čajnog drveta je regulisan međunarodnim standardom (International Organization for Standardisation). Međutim, kako species *Melaleuca*, iz koje se ulje dobija, nije propisan, većina objavljenih podataka se odnosi na *M. alternifolia* species. U ulju se nalazi supstanca terpinen-4-ol, za koju je dokazano da ima jače dejstvo od amfotericina B i od 5-fluorocitozina (Hammer i sar., 1998; Oliva i sar., 2003; Farag i sar., 2004). Neki rezultati ukazuju da linalol i α -terpineol, takođe, doprinose opštoj aktivnosti ovog ulja (Carson i Riley, 1995).

Etarsko ulje cimeta (*Cinnamomum cassia*) karakteriše prisustvo aromatičnih jedinjenja (phenylpropana) koja imaju dejstvo na gljive. Dva ulja cimeta su analizirana: *Cinnamomum camphorarich* sa linalolom i *Cinnamomum verum*, koji je bogat eugenolom.

Utvrđena je veća aktivnost *C. verum*, verovatno zbog prisustva eugenola (Tampieri i sar., 2005). Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim sa etarskim uljem *Syzygium aromaticum*, koje takođe, sadrži značajne količine eugenola i klasifikovano je kao dobar antifungalni agens. Smatra se da njegova aktivnost direktno zavisi od koncentracije eugenola (Tavares, 2003; Giordani i sar., 2004; Ahmad i sar., 2005).

1.12 Mehanizam delovanja etarskih ulja i njihovih komponenti

Zbog izuzetno složenog sastava antimikrobna aktivnost etarskih ulja nije povezana sa jednim mehanizmom delovanja, već je njihova aktivnost pod uticajem različitih jedinjenja. Slični efekti nastaju pri dejstvu etarskih ulja na gljive i bakterije, pa se smatra da mehanizmi nisu selektivni (Cox i sar., 2001). Vrednosti MIK i MFK su, obično, ekvivalentne i ukazuju da su etarska ulja uglavnom fungicidna (Carson i Riley, 1995; Consentino i sar., 1999).

Aktivnost etarskih ulja direktno zavisi od karakteristika njihovih komponenti. Komponente etarskih ulja su u stanju da prođu kroz ćelijski zid između lanaca masnih kiselina lipidne barijere, menjajući propustljivost ćelijske membrane, izazivajući degradaciju ćelijskog zida, poremećaj membrane i oštećenje membranskih proteina. Posledice promene strukture i funkcije membrane su curenje ćelijskog sadržaja, koagulacija citoplazme, gubitak protona i liza ćelije. Terpenska jedinjenja bogata kiseonikom, kao što su timol i karvakrol smatraju se odgovornim za ovaj efekat, zbog svoje sposobnosti da menjaju propustljivost membrane hemijskom reakcijom sa amino grupama i hidroksilamino grupama membranskih proteina. Ostali oksidi monoterpeni (linalol, garaniol, citral i camfor) su takođe važni, ali manje aktivni (Cox i sar., 2000; Lambert i sar., 2001; Pauli, 2006; Bakkali i sar., 2008).

Za neka ulja je ispitivan uticaj ulja na integritet ćelije gljive pomoću fluorescentnog markera-propidium jodida i merenjem protoka citometrijom. *Thymus* spp, *Origanum virens*, *Syzygium aromaticum* i njihove glavne komponente (karvakrol, timol, eugenol) su indukovali primarne lezije citoplazmatske membrane (Salgueiro i sar., 2003; Tavares i sar.,

2003; Pina – Vaz i sar., 2004). Analiza hemijske strukture timola, snažnog antigljivičnog jedinjenja, ukazuje na njegovo hidrofobno ponašanje. Ova karakteristika omogućuje da timol ima sposobnost da migrira iz vodene faze u membranu, utiče na integritet membrane i menja površinsku naelektrisanost membrane. Propustljivost membrane i aktivnost njenih proteina može biti modifikovana (Tavares i sar., 2003; Sachez i sar., 2004). Timol utiče na formiranje i održivost hifa *Candida* spp., zbog svoje sposobnosti da utiče na sintezu enzima ćelijskog zida gljiva (Braga i sar., 2007). Primećeno je da faza rasta gljiva zavisi od morfoloških oštećenja membrane izazvane timolom i eugenolom (Bennis i sar., 2004). Timol je pokazao jači efekat od eugenola.

Promena propustljivosti ćelijske membrane gljiva nastaju primenom etarskog ulja *M. alternifolia* ili komponenti (terpinen-4-ol, 1.8-cineol, α -terpineol, γ -terpinen i α -terpinen). Ovi efekti su, verovatno, u vezi sa različitim pozicioniranjem terpenskih jedinjenja u lipidnoj dvoslojnoj membrani, i smatra se da zavise od njihove hidrofobnosti. Aktivnost ovog ulja je posredovana inhibicijom ATP-aze plazma membrane (Cox i sar., 2000; Hammer i sar., 2004). Formiranje germinativnih tuba (promene u morfologiji koje su važne za patogenost gljiva), ovaj proces značajno inhibira ulje timijana (*Thymus*), čajnog drвета, timol i eugenol. Zanimljivo je da *T. mastichina* i 1.8-cineol, koji su pokazali da imaju nižu fungicidnu aktivnost, imaju veću moć inhibicije formiranja germinativnih tuba i promene morfologije ćelija gljiva od drugih ulja *Thymus* spp. i njihovih fenolnih komponenti (Hammer i sar., 2000; Tavares i sar., 2003; Pina-Vaz i sar., 2004).

Antimikotična aktivnost lekova na gljive može biti ograničena njihovim prodorom u biofilm i hemijskom reakcijom sa matriksom biofilma. Nedavne studije su pokazale antifungalni uticaj etarskih ulja na formiranje biofilma *Candida* spp. (Braga i sar., 2008; Agarwa i sar., 2008). Ovi podaci potvrđuju da timol može da inhibira inicijalno formiranje i stabilnost zrelog biofilma. Struktura zrelog biofilma, koja je posmatrana fluorescentnom mikroskopijom, pokazuje gubitak 3D morfologije, i ostatke nekoliko filamentoznih formi. Dokazano je fungicidno dejstvo timola. Timol, pored sposobnosti da smanji količinu metabolički aktivnih gljiva, smanjuje i mehanizam dimorfizma (pretvaranje od forme kvasnica u filamentozne forme).

Slično timolu, eugenol je pokazao aktivnost protiv unapred formiranog *C. albicans* biofilma, tako što je uticao na adheziju ćelija i naknadno formiranje biofilma, već u koncentracijama kao što su MIK. Takođe je pokazano da ćelije gljiva, koje su tretirane eugenolom, imaju manju sposobnost da formiraju pseudohife (He i sar., 2007).

Dokazano je da mnogi isparljivi sastojci ulja ometaju ćelijsko disanje i transport elektrona u različitim bakterijama (Evans, 2002). Ulje *M. alternifolia* ima isti efekat na ćelije gljiva u MIK (Cox i sar., 2000).

Zbog toga što etarska ulja nemaju specifične ciljne ćelije na koje deluju, do sada nije opisana rezistencija mikroorganizama (Bakkali i sar., 2008).

1.13 In vivo studije, toksikološki rezultati i farmaceutska formulacija

Uprkos tradicionalnim načinima korišćenja etarskih ulja inhalacijom, oralno, ili topikalno (lokalno) neophodno je sprovesti kontrolisana klinička ispitivanja, jer podaci koji podržavaju *in vivo* bezbednu primenu etarskih ulja su nedovoljni. Iako su etarska ulja aktivni sastojci u mnogim aktuelnim formulacijama sa lekovitim i profilaktičkim dejstvom za oralnu higijenu (etarska ulja i njihove komponente su u sastavu pasta za zube, tečnosti za ispiranje usta, antimikrobnih gelova). Prethodno opisane *in vitro* studije sa etarskim uljima i komponentama etarskih ulja mogu da objasne njihovu tradicionalnu primenu. *In vivo* eksperimenti su od suštinske važnosti da bi se etarska ulja koristili u terapijske svrhe. Podaci iz studija na animalnim modelima i mala klinička ispitivanja su podrška efikasnosti specifičnog etarskog ulja i supstanci koje ulaze u sastav etarskog ulja, na *Candida* spp, naglašavajući u budućnosti terapijski pristup na infekcije izazvane *Candida* spp.

Životinjski modeli su korišćeni za proučavanje *in vivo* efekata etarskih ulja kod topikalne ili sistemske kandidoze.

Kod modela sistemske kandidoze, stopa preživljavanja je 80 % posle primene jedne oralne doze dnevno ulja origana (*Origanum oil*) ili karvakrola za 30 dana. Mala dnevna oralna doza je utvrđena u toksikološkim studijama i etarsko ulje je korišćeno sa maslinovim uljem što se dobro podnosi bez kliničkih abnormalnosti. Miševi koji su tretirani uljem

origana pokazali su bolje kliničke rezultate što ukazuje na značaj ostalih komponenti ulja na ukupnu efikasnost ulja (Manohar i sar., 2001).

Dalja istraživanja farmakološkog delovanja etarskog ulja origana i drugih etarskih ulja sa sličnim dejstvom može doprineti novim mogućnostima u profilaksi i lečenju sistemske kandidoze, posebno kod imunokompromitovanih pacijenata.

Mukokutane kandidoze su ispitivane korišćenjem animalnih oralnih modela. Dejstvo karvakrola i eugenola je ocenjeno kod imunosuprimiranih pacova. Jedinjenja su suspendovana u rastvoru viskoznog agara u cilju potsticanja dobre adhezije na oralna tkiva nakon topikalne (lokalne) aplikacije. Dobijeno je značajno smanjenje broja kolonija. Akutna toksičnost nije primećena zbog male doze karvakrola i eugenola koji su korišćene u ovim studijama (Chami i sar., 2004).

Slučajevi oralne kandidoze, rezistentni na konvencionalnu terapiju kod imunokompromitovanih pacijenata (naročito AIDS pacijenata) lečeni su sa uljem čajnog drveta, koje sadrže tečnosti za ispiranje usta. Da bi se smanjila lokalna reakcija i nelagodnost korišćena je formulacija na bazi vode, a ne alkohola. Ovaj alternativni pristup je dao dobre rezultate u pogledu efikasnosti, ali su potrebna dodatna klinička ispitivanja sa većim brojem učesnika i drugim grupama pacijenata (Jandourek i sar., 1998; Vazquez i sar., 2002).

Upotreba ulja čajnog drveta je predložena kao potencijalna preventiva ili terapijska strategija kod pacijenata sa oralnom kandidozom koji su oboleli od raka. Ova indikacija je zasnovana na dobroj *in vitro* osetljivosti izolovanih gljiva na ulje čajnog drveta u poređenju sa konvencionalnom terapijom (Bagg i sar., 2006).

Etarsko ulje čajnog drveta se istražuje za lečenje proteznog stomatitisa. Ulje čajnog drveta (1 ml) pomešano sa 4 ml tkivnog kondicionera (Coe-comfort, GC America Inc. Alsip, IL) aplikovano je na bazu gornje proteze tri puta tokom 12 dana. Klinička remisija je brža sa čajno drvo-tkivni kondicioner smešom nego sa Nistatin-kondicioner smešom, koja je korišćena kao kontola. Ulje čajnog drveta sa tkivnim kondicionerima u smeši bi se moglo koristiti kao alternativna terapija za protezni stomatitis, koji je rezistentan na uobičajenu terapiju (Catalan i sar., 2008).

U većini studija gde je analizirana aktivnost etarskih ulja na *Candida* spp. postoji nedostatak informacija o formulaciji, farmakokinetici i uticaju sredine (tkiva) na efikasnost leka. Ovo su glavna pitanja koja se tiču terapijske primene etarskih ulja. Potreban je razvoj sistema lake primene, koji bi bio biokompatibilan i koji bi omogućavao održavanje antifungalnih svojstava sve vreme dejstva bez toksičnosti. Fizičko – hemijske karakteristike etarskih ulja predstavljaju određene poteškoće za formulaciju i pakovanje. Lipofilnost etarskih ulja postaje problem kada je potrebna rastvorljivost u vodi, dok nestabilnost etarskih ulja zahteva tehnološke resurse da bi se osigurala stabilnost i bioraspoloživost.

Rezultati dobijeni u studiji koja poredi aktivnost etarskog ulja *Thymus vulgaris* pre i posle formiranja polikarbofil-baze gela, ukazuju da etarsko ulje *Thymus vulgaris* zadržava aktivnost posle formiranja gela (das Neves i sar., 2009). Od *in vivo* studija i kliničkih ispitivanja se zahteva da potvrde dobijene rezultate i da se utvrdi stvarna korisnost etarskog ulja *Thymus vulgaris*.

Upotreba tehnike oblaganja ulja može da pomogne u prevazilaženju neželjenih reakcija, izbegavajući direktan kontakt etarskog ulja sa kožom ili mukozom. Etarsko ulje, ako se koriste lokalno, može nekada izazvati neželjenu reakciju, u vidu iritacije ili kontaktne alergije. Ove reakcije mnogo zavise od sastava etarskog ulja, njegove stabilnosti, doze i koncentracije. Izuzetno visoke doze lokalno primenjenog etarskog ulja mogu biti povezane sa sistemskom toksičnošću kod životinja i ljudi, zbog transdermalne apsorpcije ulja (Jandourek i sar., 1998; Vazquez i sar., 2002; Ahmad i sar., 2005; Hammer i sar., 2006).

Postoje podaci koji ukazuju da je reakcija kože posledica oksidacije, koja je nastala kao posledica izlaganja etarskog ulja svetlu/ili vazduhu. Faktori formulacije proizvoda mogu biti od presudnog značaja za prevazilaženje toksičnosti (Hammer i sar., 2006). S druge strane, moguće je obezbediti kontinuirano oslobađanje aktivne supstance, formulisanjem adekvatnog preparata za primenu (Lai i sar., 2007). Međutim, pomoćne materije mogu imati i suprotan efekat, kao što je smanjenje antimikrobne aktivnosti ulja čajnog drveta u prisustvu nekih surfaktanata i organskih supstanci (Manou i sar., 1998; Hammer i sar., 1999). Osobine baze u koju se ugrađuje ulje snažno utiču na aktivnost etarskog ulja. Hidrofilne baze su efikasnije od lipofilnih baza, zbog većeg afiniteta

komponenti etarskog ulja za lipofilnu bazu, što usporava otpuštanje u medijum (Orafidiya i sar., 2001).

1.14 Etarska ulja kao alternativa ili terapijska dopuna klasičnim antifungalnim agensima- novi terapijski pristup infekcijama izazvanim *Candida* spp.

Danas se javljaju nove ideje u pronalaženju antimikotičnih lekova. Problemi sa niskom selektivnošću klasičnih antimikotičnih molekula na definisane ciljne strukture gljiva, toksičnost i fungistatičko umesto fungicidno delovanje su nedostaci koji moraju da se prevaziđu. Iako postoji potreba za novim antimikoticima, rezultati istraživanja su još uvek nedovoljni. Prirodna jedinjenja, posebno etarska ulja, uglavnom, tokom poslednje decenije, smatraju se mogućom alternativom ili terapijskom dopunom klasičnim antifungalnim lekovima.

Postoje izveštaji o tome da su etarska ulja aktivnija od klasičnih antifungalnih lekova (Oliva i sar., 2003; da Silva i sar., 2008). Međutim, ti rezultati nisu usaglašeni (Ahmad i sar., 2005; Nzeako i Bushra, 2008).

Prepoznajući značaj etarskih ulja kao antifungalnih agenasa, kombinacija tih jedinjenja sa klasičnim antimikoticima je ocenjena kao poželjna terapija rezistentnih sojeva *Candida* spp. Takav je slučaj kombinacije etarskih ulja *Thymus vulgaris* i *Cinnamomum cassia* sa amfotericinom B, što dovodi do značajnog smanjenja vrednosti MIK amfotericina B. Drugi sinergijski efekat je primećen sa kombinacijom estragola i ketokonazola, što daje jasnu fungicidnu aktivnost, za razliku od fungistatičkog efekta samog ketokonazola. Zanimljiva je kombinacija eugenola sa amfotericinom B, koja je pokazala antagonizam ili nikakav efekat (Giordani i sar., 2004; Shin i Pyun, 2004; Giordani i sar., 2006; Hemaiswarya i sar., 2008).

Na isti način, kombinacija flukonazola sa jedinjenjima fenolne prirode (koja su siromašna ergosterolom) pojačava inhibitorni efekat biosinteze ergosterola (Sun i sar., 2005). Rezultati dobijeni u *in vitro* istraživanjima obećavaju razvoj manje toksične i efikasnije terapije u lečenju gljivičnih infekcija.

Kada se analizira način delovanja etarskih ulja, malo je verovatno da bi se mogla pojaviti rezistentnost na etarska ulja. To bi zahtevalo više simultanih mutacija i ciljne ćelije bi morale da se prilagode da prevaziđu sve različite antifungalne reakcije svakog etarskog ulja i svih njegovih komponenti.

U stvari, kombinacija etarskih ulja sa klasičnim antimikotičnim lekovima za infekcije izazvane *Candida* spp. može u budućnosti dati moćan antimikotik. Dejstvo bi se zasnivalo na većoj fiksaciji unutar ćelija gljiva antifungalnih klasičnih agenasa, uključujući formiranje transmembranskih pora uz curenje intracelularnih komponenti, što dovodi do smrti ćelije. Sprovedene studije, koje se zalažu za ovu kombinaciju brane je argumentima da se na ovaj način smanjuje koncentracija antibiotika koji se koristi i smanjuju se sekundarni (neželjeni) efekti antibiotika, dolazi do fungicidnog dejstva (u odnosu na fungistatički efekat koji izazivaju farmakološki preparati) (Giordani i sar., 2004; Shin i Pyun, 2004; Giordani i sar., 2006; Rosato i sar., 2008).

Etarska ulja pokazuju i komplementarnu (dopunsku) aktivnost, pored antimikrobne, što može doprineti kombinaciji etarskih ulja sa imunostimulatornim agensima, koja će podstaći razvoj profilaktičkog režima terapije.

Generalno, etarska ulja predstavljaju alternativni pristup za lečenje infekcija izazvanih *Candida* spp. Zato postoji potreba za odgovarajućim pretkliničkim i kliničkim istraživanjima koja će potvrditi efikasnost etarskih ulja u lečenju proteznog stomatitisa.

1.15 Naučna osnova problema

Na osnovu svega iznetog može se reći da veliki broj pacijenata, posebno starije dobi koristi totalne zubne proteze. Totalne proteze podležu kolonizaciji i formiranju biofilma *Candida* spp. Protezni plak (biofilm) služi kao rezervoar potencijalno infektivnih mikroorganizama. Mikroorganizmi iz proteznog plaka, (najviše *Candida* spp.) su odgovorni za nastanak proteznog stomatitisa.

Prisutan problem možemo rešiti pravovremenom dijagnozom i efikasnom terapijom proteznog stomatitisa.

Izbor načina uzimanja mikrobiološkog materijala bi doprineo efikasnosti postavljanja dijagnoze i razlikovanju kolonizacije od infekcije gljivama roda *Candida*.

Terapija je veliki problem, posebno kada je u pitanju protezni stomatitis, jer se u većini slučajeva protezni stomatitis javlja ponovo po prestanku terapije. Primena nesintetičkih sredstava, potpuno prirodnih, neinvazivnih supstanci, kao što su etarska ulja, mogla bi imati značaj u terapiji oralnih oboljenja gljivične etiologije. Zato je neophodno sprovesti dalja istraživanja u ciju dobijanja adekvatnog farmakološkog preparata na bazi etarskih ulja.

Na osnovu iznetog postavljena je radna hipoteza:

Moguće je standardizovati protokol za pouzdanu dijagnozu proteznog stomatitisa gljivične etiologije.

2.CILJ ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu naučnu osnovu problema i radnu hipotezu definisan je osnovni cilj istraživanja.

Osnovni cilj ovog istraživanja je bio da se pouzdano dijagnostikuje i odredi učestalost proteznog stomatitisa gljivične etiologije i ispita antifungalna aktivnost etarskih ulja.

Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi učestalost i kliničke forme proteznog stomatitisa kod pacijenata koji nose totalne zubne proteze.
2. Utvrditi učestalost proteznog stomatitisa izazvanog gljivama roda *Candida* kod pacijenata koji nose totalne zubne proteze, u odnosu na učestalost proteznog stomatitisa izazvanog mehaničkim faktorima.
3. Utvrditi dominantne kontributivne faktore u nastanku proteznog stomatitisa mehaničke i gljivične etiologije.
4. Utvrditi postojanje patogenih vrsta oralnih bakterija kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije.
5. Izvršiti kvantitativnu i kvalitativnu analizu gljiva roda *Candida* kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije.
6. Ispitati efekte etarskih ulja na izolovane sojeve gljiva roda *Candida* u *in vitro* uslovima, određivanjem MIK i MFK u cilju procene mogućnosti njihove terapijske primene.
7. Predložiti protokol za pouzdanu dijagnozu proteznog stomatitisa gljivične etiologije.

3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Izbor pacijenata je obavljen na Klinici za stomatološku protetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu u periodu od juna 2012. godine do decembra 2013. godine.

Mikrobiološka dijagnostika je sprovedena na Institutu za mikrobiologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu i u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za uzročnike mikoza (NRLUM) Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod brojem 36/25.

Od ukupno 250 pacijenata koji su pregledani, u studiju je uključeno 97 pacijenata kod kojih je klinički dijagnostikovani protezni stomatitis. Selekcija pacijenata sa proteznim stomatitisom je vršena na osnovu inkluzionih kriterijuma: 1) pacijenti oba pola, koji su rehabilitovani totalnom zubnom protezom u gornjoj vilici, 2) zubna proteza je starija od godinu dana i nije korigovana u poslednjoj godini korišćenja, 3) pacijenti nisu sprovodili mere oralne higijene usta i zubne proteze najmanje 3h pre pregleda i uzimanja uzoraka.

Pacijenti koji imaju sledeće ekskluzivne kriterijume nisu bili uključeni u studiju: 1) terapija lokalnim i opštim kortikosteroidima poslednja 3 meseca, 2) terapija antibioticima poslednja 3 meseca, 3) terapija imunosupresivnim lekovima poslednja 3 meseca, 4) pacijenti koji su HIV/AIDS pozitivni, 5) pacijenti koji imaju *diabetes melitus* tip I (insulin zavisni).

Svi pacijenti su popunjavali „informisani pristanak“ za ulazak u studiju (prilog 1).

3.1 Klinička procedura

Za potrebe ovog istraživanja dizajniran je poseban upitnik, koji sadrži generalije, medicinsku i stomatološku istoriju i podatke dobijene kliničkim pregledom (prilog 2).

Klinički pregled se sastojao od inspekcije usne duplje, na osnovu koga se dijagnostikovala inflamacija mekih tkiva, kao i stepen i lokacija inflamacije. Analizom

postojećeg stanja totalne zubne proteze u ustima pacijenta utvrdio se stepen retencije zubne proteze, očuvanost vertikalne dimenzije okluzije i okluzalni odnosi sa antagonistima.

Na osnovu prisutne inflamacije sluzokože pacijenti su grupisani u 3 grupe:

grupa I - pacijenti sa prvim stepenom inflamacije (petehije raspoređene po bilo kom delu ili celoj palatinalnoj sluzokoži koja je u kontaktu sa protezom - lokalizovano zapaljenje),

grupa II - pacijenti sa drugim stepenom inflamacije (makularni eritem bez hiperplazija - generalizovano zapaljenje),

grupa III - pacijenti sa trećim stepenom inflamacije (difuzni ili generalizovani eritem sa papilarnom hiperplazijom).

Higijena zubne proteze se utvrđivala na osnovu Budtz-Jorgenson indeksa (Budz-Jorgensen i Bertram, 1970) identifikacijom proteznog plaka pomoću Plaque search rastvora (Curaprox, Swiss).

3.2 Laboratorijska istraživanja

Deo istraživanja je sproveden u mikrobiološkoj laboratoriji.

3.2.1 Uzorkovanje

Uzorak je bio prikupljen po istoj proceduri kod svakog pacijenta, na sledeće načine:

1 - brisom sluzokože nepca, onih delova gde je kliničkim pregledom utvrđeno prisustvo inflamacije (Slika 4),

2 - brisom gingivalne površine proteze (Slika 5),

3 - ispiranjem usta (pacijent mućka u ustima 9ml fiziološkog rastvora u trajanju od 1 minuta i potom rastvor vraća u sterilnu bočicu) – ispirak (Slika 6),

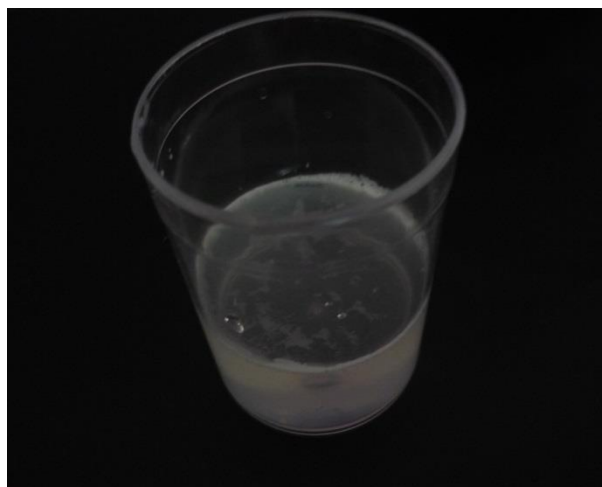
4 - izlaganjem proteze ultrazvuku (proteza se stavi u sterilnu kesu sa 50 ml sterilnog fiziološkog rastvora i potom izlaže blagom ultrazvuku od 35 kHz u ultrazvučnoj kadici u trajanju od 5 minuta) (Slika 7).



Slika 4. Bris sluzokože nepca



Slika 5. Bris zubne proteze



Slika 6. Ispirak



Slika 7. Izlaganje zubne proteze ultrazvuku

Nakon uzimanja mikrobiološkog materijala, uzorci su bili transportovani pod aseptičnim uslovima u mikrobiološku laboratoriju, najkasnije pola sata od trenutka uzorkovanja.

3.2.2 Mikrobiološka obrada uzoraka i identifikacija gljiva i bakterija

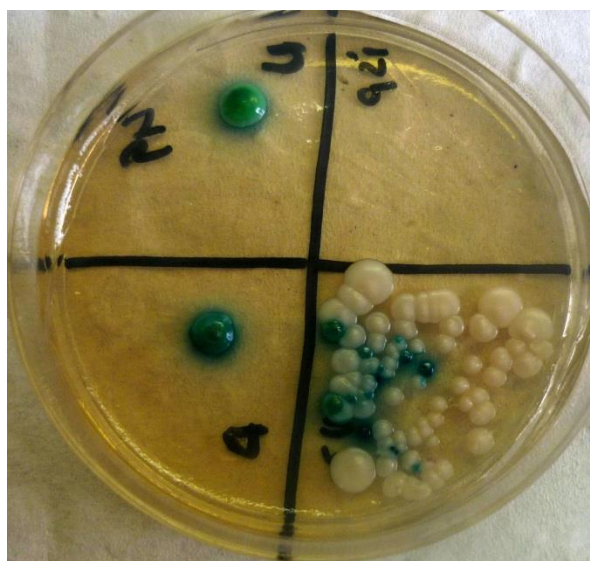
Uzorci ispirka usta i rastvora posle ultrazvučnog izlaganja proteze prvo su vorteksovani da bi se izvršila njihova homogenizacija. Zasejavalo se po 100 µl rastvora oba uzorka. Takođe, pravila se serija desetostrukih razblaženja ovih uzoraka (10^0 do 10^{-2}) i ista zapremina (100 µl) se zasejavala u cilju utvrđivanja CFU gljiva. Na taj način je izvršena kvantifikacija gljiva roda *Candida* u rastvoru (određivanje broja kolonija u zapremini rastvora).

Brisevi nepca, brisevi proteze i sva razblaženja ispirka usta i rastvora dobijenog izlaganjem proteze ultrazvuku zasejavani su na podlogama za izolaciju gljiva (Sabouraud dekstrozni agar, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), i inkubirani 48 h na 37 °C (Slika 8).

Identifikacija vrsta roda *Candida* nađenih u uzorku je vršena na osnovu izgleda i boje izraslih kolonija, tako što su svi uzorci zasejavani na CROMagar *Candida* podlozi (CHROMagar, Paris, France) i inkubirani 48 h na 37 °C (Slika 9). Dijagnoza je potvrđivana posmatranjem mikroskopskih preparata kolonija gljiva roda *Candida*.



Slika 8. Kolonije gljiva *Candida* na Sabouroud dekstrozni agar podlozi



Slika 9. Kolonije gljiva *Candida* na podlozi CROMagar Candida podlozi

Bakteriološka analiza je vršena zasejavanjem brisa nepca, brisa proteze, ispirka usta i rastvora posle izlaganja proteze ultrazvuku na Krvnom agaru i inkubacije 24 h na 37⁰ C, da bi se identifikovale patogene vrste bakterija u usnoj duplji. Ovako dobijen materijal se dalje obrađivao standardnim bakteriološkim metodama.

3.2.3 Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja cimeta, limuna, grejpfruta, čajnog drveta i timijana na izolovane sojeve roda *Candida* u *in vitro* uslovima

Ispitivanje antimikrobnog dejstva etarskih ulja na izolovane sojeve gljiva roda *Candida* se radilo mikrodilucionom metodom po protokolu EUCAST Definitive Document Edef 7.2 Revision (2012).

Sojevi

Od 82 pacijenta kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis gljivične etiologije izolovano je 113 sojeva roda *Candida*. U laboratorijsko ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja uključeno je 40 kliničkih izolata *Candida* spp. u okviru četiri vrste (n=10 *C. albicans*, n=10 *C. glabrata*, n=10 *C. krusei* i n=10 *C. tropicalis*).

Etarska ulja

Testirala se osetljivost izolovanih sojeva gljiva roda *Candida* na sledeća etarska ulja:

- cimet – *Cinnammon cassia*
- limun - *Citrus limon*
- grejpfrut - *Citrus paradisi*
- čajno drvo - *Melaleuca alternifolia*
- timijan - *Thymus vulgaris* (Citychem, Beograd, Srbija).

Procentualna zastupljenost pojedinih komponenti etarskog ulja cimeta (*Cinnamomum cassia*) je prikazana u tabeli 1.

Tabela 1. Komponente ulja cimeta.

KOMPONENTE	%
Cinnamaldehyde	73.6
Coumarin	2
Cinnamyl acetate	10

Etarsko ulje limuna (Lemon oil) je dobijeno hladnim ceđenjem ploda *Citrus limon*. Procentualna zastupljenost pojedinih komponenti ulja je prikazana u tabeli 2.

Tabela 2. Komponente ulja limuna.

KOMPONENTE	%
beta - Pinene	7.0 – 14.0
gamma-Terpinene	6.0 – 12.0
Sabinene	1.0- 3.0
Limonene	56.0 – 78.5
Neral	0.5 – 1.5
Nerylacetate	0.2– 0.9
Geranial	1.0 – 2.3

Etarsko ulje grejpfruta (Grapefruit oil) je dobijeno hladnim ceđenjem ploda *Citrus paradisi*. Procentualna zastupljenost pojedinih komponenti ulja je prikazana u tabeli 3.

Tabela 3. Komponente ulja grejpfruta.

KOMPONENTE	%
Limonene	90.0 – 97
Myrocene	1 – 3

Etarsko ulje čajnog drveta (Tea tree oil) je dobijeno destilacijom pod dejstvom vodene pare listova *Melaleuca alternifolia*. Procentualna zastupljenost pojedinih komponenti ulja je prikazana u tabeli 4.

Tabela 4. Komponente ulja Čajnog drveta.

KOMPONENTE	%
alpha - Pinene	1.0 – 10.0
alpha-Terpinene	5.0 – 13.0
Sabinene	max. 3.5
Limonene	0.5 – 4.0
Terpinene-4-ol	36.0– 44.0
Terpinolene	1.5-5.0
gamma-Terpinene	1.5 – 8.0

Etarsko ulje timijana je dobijeno destilacijom pod dejstvom vodene pare cveta *Thymus vulgaris*. Procentualna zastupljenost pojedinih komponenti ulja je prikazana u tabeli 5.

Tabela 5. Komponente ulja timijana.

KOMPONENTE	%
beta - myrcene	1.0 – 3.0
gamma-Terpinene	5.0 – 10.0
para- Cymene	15.0- 28.0
Linalool	4.0 – 6.5
Terpinen-4-ol	0.2 – 2.5
Thymol	36.0 – 55.0
Carvarcrol	1.0 – 4.0

Reagensi i podloge

Dvostruka razblaženja ulja pripremljena su u tečnoj podlozi RPMI 1640 sa 2% glukoze, u opsegu koncentracija 0.01-1.6%.

RPMI-1640 je razvijena od strane Moore i saradnika u Roswell Park Memorial Institute (otuda skraćenica RPMI). RPMI-1640 podloga se koristi za kulturu humanih leukocita, ali sa odgovarajućim suplementima, može se koristiti za kultivaciju širokog spektra ćelija. Ova podloga, suplementovana sa glukozom, preporučeni je medijum za mikrodilucionu metodu ispitivanja antifungalnih supstanci na kvasnice (EUCAST). Komponente RPMI-1640 sa 2% glukoze prikazane su u tabeli 6.

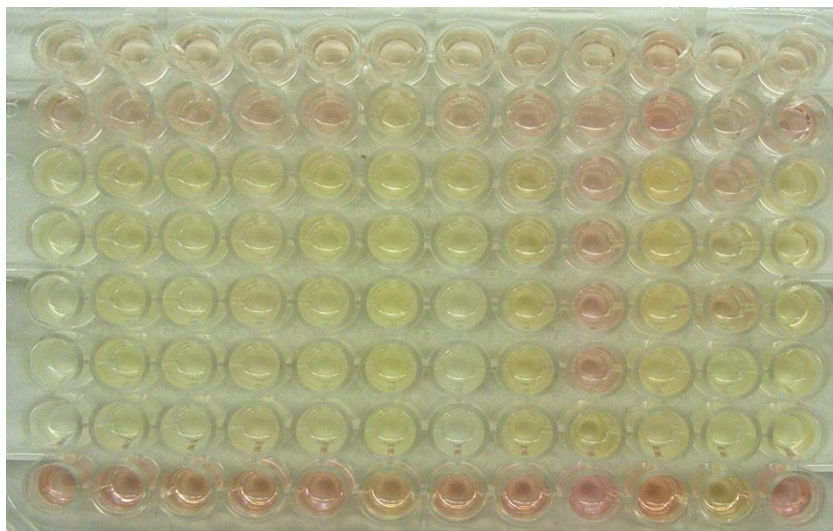
Tabela 6. Komponente RPMI-1640 2% glukoza.

KOMPONENTE	2% koncentracija
Destilovana voda	900 ml
RPMI-1640	20.8 g
Propan sulfatna kiselina	69.06 g
Glukoza	36 g

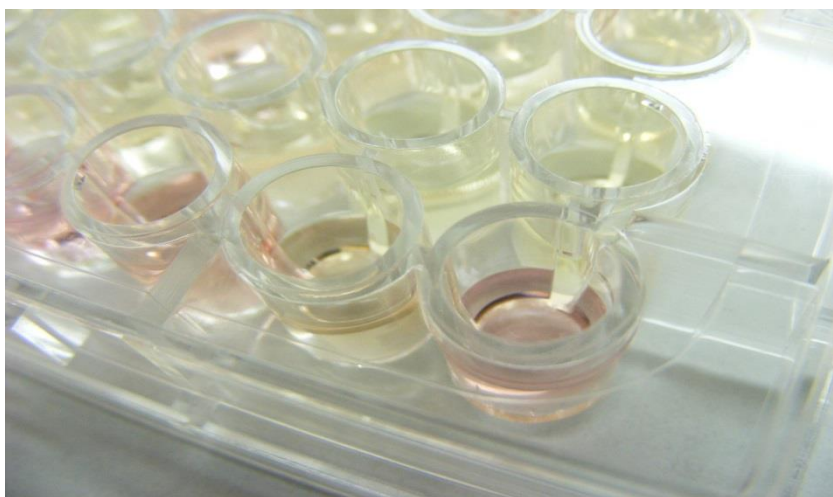
Pre testiranja, *Candida* izolati su kultivisani na Sabouraud dextrose agar pločama (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) na 37 °C tokom 24 h. Suspenzija gljiva pripremljena je u sterilnom 0.9% NaCl i podešena na 0.5 *McFarland* standard turbiditeta (što odgovara gustini $1-5 \times 10^6$ CFU/ml, propisano od strane CLSI, 2009). Finalni inokulum je dobijen razblaženjem 1:10 u RPMI 1640 sa 2% glukoze. U cilju kontrole kvaliteta, procedura je obuhvatila i testiranje sojeva *Candida albicans* ATCC 24433 i *C. krusei* ATCC 6258.

Procedura

U svaku komoricu mikrotitracione ploče je uneto 100 µl suspenzije gljiva i 100 µl odgovarajuće koncentracije datog etarskog ulja (Slike 10 i 11). Test je obuhvatio i tri kontrole: pozitivnu kontrolu/kontrolu rasta (inokulum u RPMI bez aktivne supstance), negativnu kontrolu (inokulum u rastvoru 2 µg/ml amfotericina B) i kontrolu sterilnosti podloge (samo RPMI bez suspenzije gljiva).



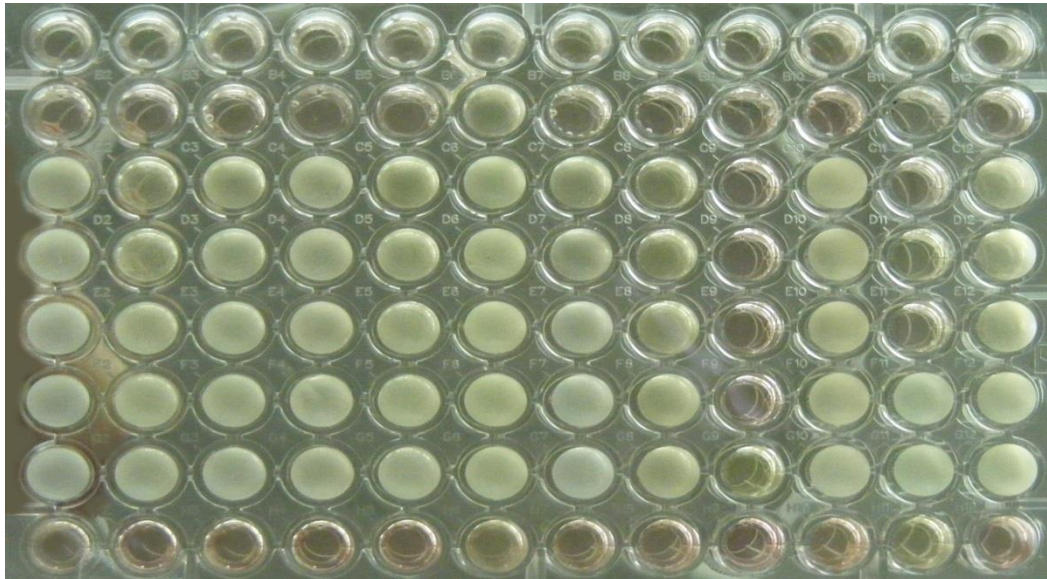
Slika 10. Mikrotitraciona ploča sa etarskim uljima



Slika 11. Komorice mikrotitracione ploče sa etarskim uljima

Mikrotitracione ploče su inkubirane na 37°C. Rezultati su očitavani nakon 24 h i 48 h, vizuelno na osnovu zamućenosti sadržaja komorice (Slika 12). MIK je definisan kao najmanja koncentracija rastvora koja uzrokuje značajno smanjenje zamućenosti u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Određivanje MFK vršeno je zasejavanjem 20 µl iz

svakog bunarčića bistrog sadržaja na SDA - Sabouraud dextrose agar pločama (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom).



Slika 12. Mikrotitracione ploče nakon inkubacije. Izgled zamućenosti komorica

3.3 Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka obrađena je uz pomoć statističkog paketa SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0). Za statističku obradu dobijenih podataka korišćene su metode deskriptivne statistike: mere centralne tendencije – aritmetička sredina i medijana, mere varijabiliteta – standardna devijacija, minimum i maksimum, interval poverenja, kao i grafičko i tabelarno prikazivanje rezultata. Atributivna obeležja posmatranja prikazana su apsolutnim i relativnim brojevima (%).

Od metoda interferencijalne statistike primenjeni su:

- Hi kvadrat-test i McNemar-test za analizu učestalosti pojedinih ocena posmatranih parametara između grupa;
- t-test za nezavisne uzorke kod numeričkih obeležja posmatranja sa normalnom raspodelom, za poređenje vrednosti između analiziranih grupa; ANOVA test za poređenje (analizu) razlika između tri ili više grupa;
- logističkom regresionom analizom izdvojeni su prediktori razlike u nastanku proteznog stomatitisa gljivične i mehaničke etiologije;
- za upoređivanje dijagnostičkih metoda uzorkovanja mikrobiološkog materijala korišćena je ROC kriva. U ROC krivi je prava pozitivna stopa (senzitivnost) prikazana u funkciji lažno pozitivnih nalaza (100-specifičnost). Svaka tačka na ROC krivi je predstavljena odnosom senzitivnost/specifičnost. Površina ispod ROC krive (AUC) je mera koliko dobro parametar može razlikovati dve dijagnostičke grupe (oboleli/normalni). Senzitivnost je verovatnoća da će rezultat testa da bude pozitivan kada je bolest prisutna, a specifičnost je verovatnoća da će rezultat biti negativan kada bolest nije prisutna.

Sve vrednosti $p < 0,05$ uzete su kao statistički značajne.

4. R E Z U L T A T I

4.1 Kliničko-epidemiološki deo

4.1.1 Učestalost proteznog stomatitisa i kliničke forme proteznog stomatitisa kod pacijenata koji nose totalne zubne proteze

Od ukupno 250 pacijenata koji su pregledani na Klinici za stomatološku protetiku u studiju je ušlo 97 pacijenata kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis, što predstavlja učestalost proteznog stomatitisa od 38.8%.

Prosečna starost pacijanata sa proteznim stomatitisom je 70.5 ± 10.68 godina, pri čemu je najmlađi imao 37, a najstariji 89 godina. Više se javlja kod žena 68% (66) u odnosu na muškarce 32 % (31). Takođe, veći broj pacijenata čine penzioneri 84.5% (82), u odnosu na zaposlene 15.5% (15).

Od kliničkih formi proteznog stomatitisa najučestaliji je II stepen zapaljenja sa 59.8%, a najmanje je zastupljen III stepen sa 14.4%. Eritematozna zona je najčešće locirana na nepcu i rezidualnom alveolarnom grebanu (47.4%), što je prikazano u tabeli 7.

Tabela 7. Učestalost kliničkih formi proteznog stomatitisa i lokacija eritematozne zone.

		Broj (n)	%
Klasifikacija proteznog stomatitisa	lokalna hiperemija (I)	25	25.8
	difuzni eritem (II)	58	59.8
	papilarna hiperplazija (III)	14	14.4
Lokacija eritematozne zone	tvrdi nepce	30	30.9
	tvrdi i meki nepce	11	11.3
	tvrdi nepce i alveolarni greben	46	47.4
	tvrdi i meki nepce i alveolarni greben	9	9.3
	protezni stomatitis i angularni hejlitis	1	1.0

4.1.2 Učestalost proteznog stomatitisa, izazvanog gljivama roda *Candida* kod pacijenata koji nose totalne zubne proteze, u odnosu na učestalost proteznog stomatitisa izazvanog mehaničkim faktorima

Protezni stomatitis gljivične etiologije je dijagnostikovao kod 82 (84.54%) pacijenta, a protezni stomatitis mehaničke etiologije kod 15 (15.46%) pacijenata. Osnovni kriterijum za razlikovanje proteznog stomatitisa mehaničke etiologije od proteznog stomatitisa gljivične etiologije je izolovanje gljiva roda *Candida* kada je uzorkovanje mikrobiološkog materijala vršeno izlaganjem zubne proteze ultrazvuku.

Na osnovu mikrobiološke analize uzoraka, od 97 pacijenata kod kojih je kliničkim pregledom dijagnostikovao protezni stomatitis, kod 23 pacijenta su izolovane patogene oralne bakterije zajedno sa gljivama roda *Candida*. 59 pacijenata nema patogene oralne bakterije, a ima gljive roda *Candida*, dok 4 pacijenta ima patogene oralne bakterije a nema gljive roda *Candida*. I na kraju, 11 pacijenata nema patogene oralne bakterije, ni gljive roda *Candida*. Podaci su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Prisustvo patogenih oralnih bakterija i gljiva roda *Candida* kod pacijenata sa proteznim stomatitisom.

		Gljive roda <i>Candida</i>		ukupno
		negativan nalaz	pozitivan nalaz	
patogene oralne bakterije	negativan nalaz	11 (11%)	59 (61%)	70 (72%)
	pozitivan nalaz	4 (4%)	23 (24%)	27 (38%)
	ukupno	15 (15%)	82 (85%)	97 (100%)

Od patogenih oralnih bakterija kod pacijenata sa proteznim stomatitisom najviše je prisutna *E. coli* u 15 uzoraka, *Pneumococcus* u 1 uzorku, *Citrobacter* u 1 uzorku, *Enterobacter* u 1 uzorku, *Klebsiela* u 3 uzorka, *Staphylococcus aureus* u 4 uzorka, *Pseudomonas aeruginosa* u 1 i *Proteus mirabilis* u 1 uzorku.

Analizom učestalosti pojave proteznog stomatitisa gljivične i mehaničke etiologije kod ispitanika različitog pola uočena je statistički značajna razlika, i to tako da se protezni stomatitis mehaničke etiologije statistički značajno javljao kod ispitanika muškog pola, a protezni stomatitis gljivične etiologije kod ispitanika ženskog pola (tabela 9). Ne uočava se statistički značajna razlika između dve grupe pacijenata po pitanju starosti, obrazovanja i zanimanja (tabela 9).

Tabela 9. Demografske karakteristike pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mekaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Pol	muški	22 (27%)	9 (60%)	^a p=0.011*
	ženski	60 (73%)	6 (40%)	
Starost (godine)		70.59±11.185	69.87±7.567	^b p=0.812
Obrazovanje	osnovno	12 (15%)	2 (13%)	^a p=0.659
	srednje	44 (57%)	8 (53%)	
	više	13 (15%)	1 (7%)	
	visoko	13 (15%)	4 (27%)	
Zanimanje	zaposlen	14 (17%)	1 (7%)	^a p=0.305
	penzioner	68 (83%)	14 (93%)	

*statistički značajno, ^aHi kvadrat- test, ^bt- test

Svim pacijentima sa proteznim stomatitisom je uzeta detaljna anamneza o prisustvu oboljenja i uzimanju lekova, distribucija pacijenata u odnosu na navedene parametre prikazana je u tabelama 10 i 11.

Tabela 10. Distribucija pacijenata prema pozitivnoj anamnezi o prisustvu opštih oboljenjima.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
<i>Diabetes mellitus</i>	ne	64 (78%)	14 (93%)	^a p=0.17
	da	18 (22%)	1 (7%)	
Hipertenzija	ne	35 (43%)	5 (33%)	^a p=0.49
	da	47 (57%)	10 (67%)	
Karcinom	ne	81 (99%)	15 (100%)	^a p=0.67
	da	1(1%)	0 (0%)	

^a Hi kvadrat-test

Tabela 11. Distribucija pacijenata prema lekovima koje koriste.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Anksiolitici	ne	79 (96%)	15 (100%)	^a p=0.45
	da	3(4%)	0 (0%)	
Antidepresivi	ne	57 (70%)	10 (67%)	^a p=0.83
	da	25 (30%)	5 (33%)	
Kortikosteroidi	ne	79 (96%)	14 (93%)	^a p=0.59
	da	3 (4%)	1(7%)	
Antihipertenzivi	ne	35 (43%)	5 (33%)	^a p=0.49
	da	47 (57%)	10 (67%)	
Diuretici	ne	73 (89%)	15(100%)	^a p=0.18
	da	9 (11%)	0 (0%)	

^a Hi kvadrat-test

Iz tabela 10 i 11 se vidi da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji pacijenata po grupama u odnosu na opšta oboljenja koja imaju i koje lekove koriste. Takođe, ne postoji statistička značajnost u odnosu na konzumiranje cigareta i slatkiša (tabela 12). Ako analiziramo prosečan broj cigareta potrošenih u toku dana kod bivših i sadašnjih pušača, pacijenti kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis gljivične etiologije u proseku koriste značajno manji broj cigareta (15/dan) u odnosu na pacijente kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis mehaničke etiologije (24/dan). Po godinama pušačkog staža ove dve grupe pacijenata se ne razlikuju.

Iz tabele 12 se vidi da znatno manje pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije konzumira alkohol u odnosu na pacijente sa mehaničkom etiologijom proteznog stomatitisa, što daje statističku značajnost od $p=0.037$.

Tabela 12. Navike pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Pušenje	nepušači	31(38%)	5(33%)	^a $p=0.082$
	bivši pušači	26(32%)	6(40%)	
	sadašnji pušači	25(30%)	4(27%)	
Prosečan broj cigareta na dan		15.65±8.216	23.5±9.144	^b $p=0.830$
Godine pušačkog staža		27.04±15.798	25.65±13.332	^b $p=0.512$
Alkohol	ne	78(95%)	12(80%)	^a $p=0.037^*$
	da	4(5%)	3(20%)	
Slatkiši	ne	45(55%)	7(47%)	^a $p=0.558$
	da	37(45%)	8(53%)	

*statistički značajno, ^aHi kvadrat-test, ^bt-test

Protezni stomatitis može biti praćen simptomima kao što su suvoća usta, žarenje i pečenje. Statističkom analizom parametara iz tabele 13 se vidi da ne postoji značajna razlika u distribuciji po grupama u odnosu na simptome proteznog stomatitisa. Takođe, iz tabele 14 se vidi da stepen zapaljenja nije specifičan za jednu etiologiju proteznog stomatitisa, kao i da lokacija eritematozne zone nije povezana sa vrstom proteznog stomatitisa (tabela 15).

Tabela13. Simptomi kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Suvoća usta	ne	37 (45%)	10 (67%)	^a p=0.163
	da	45 (55%)	5 (33%)	
Žarenje i pečenje	ne	71 (87%)	15 (100%)	^a p=0.132
	da	11 (13%)	0 (0%)	

^aHi kvadrat-test

Tabela 14. Distribucija kliničkih formi proteznog stomatitisa kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Klasifikacija proteznog stomatitisa	lokalna hiperemija	19 (23%)	6 (40%)	^a p=0.138
	difuzni eritem	49 (60%)	9 (60%)	
	papilarna hiperplazija	14 (17%)	0 (0%)	

^aHi kvadrat-test

Tabela 15. Lokacija eritematozne zone proteznog stomatitisa kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Lokacija eritematozne zone proteznog stomatitisa	tvrdi nepce	22 (27%)	8 (53%)	^a p=0.238
	tvrdi i meki nepce	9 (11%)	2 (14%)	
	tvrdi nepce i alveolarni greben	41 (50%)	5(33%)	
	tvrdi i meki nepce i alveolarni greben	9 (11%)	0 (0%)	
	protezni stomatitis i angularni heilitis	1 (1%)	0 (0%)	

^aHi kvadrat-test

Analizom dužine nošenja gornje i donje zubne proteze kod pacijenata sa proteznim stomatitisom uočava se da pacijenti kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis gljivične etiologije u proseku 5 godina nose duže donju protezu u odnosu na pacijente kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis mehaničke etiologije (tabela 16).

Pacijenti sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije u proseku 3 godine nose duže gornju zubnu protezu, takođe i 3 godine nose duže poslednju gornju protezu od pacijenata sa proteznim stomatitisom mehaničke etiologije (tabela 16).

Tabela 16. Dužina nošenja zubne proteze kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri	Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Koliko nosi gornju protezu (godine)	19.57±10.219	16.83±10.760	^b p=0.77
Koliko nosi donju protezu (godine)	18.15±8.923	13.04±7.297	^b p=0.677
Koliko nosi gornju poslednju protezu (godine)	12.91±9.643	9.23±9.586	^b p=0.646

^bt-test

Analizirajući podatke iz tabele 17, vidimo da pacijenti obe grupe imaju u većini slučajeva u donjoj vilici zubnu protezu (i to totalnu zubnu protezu). Ne postoji statistički značajna razlika među grupama u odnosu na dentalni status u donjoj vilici (p=0.108).

Tabela 17. Distribucija pacijenata u odnosu na dentalni status u donjoj vilici.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Dentalni status u donjoj vilici	bezubi alveolarni greben	8 (9%)	1 (7%)	^a p=0.108
	prirodni zubi	4 (5%)	0 (0%)	
	fiksne nadoknade	0 (0%)	0 (0%)	
	parcijalna proteza	26 (32%)	1 (7%)	
	totalna proteza	44 (54%)	13 (86%)	

^aHi kvadrat-test

Higijena zubne proteze je značajno bolja kod pacijenata sa proteznim stomatitisom mehaničke etiologije u odnosu na pacijente sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije (p=0.028), podaci su prikazani u tabeli 18. Pacijenti obe grupe za održavanje higijene

zubne proteze koriste četku i pastu, tako da ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na dati parametar (tabela 18).

Od ukupno 15 pacijenata kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis mehaničke etiologije, 9 pacijenata potapa svoju zubnu protezu u dezinfekcioni rastvor, a 6 pacijenata ne. Kod pacijenata kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis gljivične etiologije (82), 33 pacijenta potapa svoju zubnu protezu u dezinfekcioni rastvor, dok većina ne (49). Ne postoji statistički značajna razlika među pacijentima koji imaju različitu vrstu proteznog stomatitisa u odnosu na koji dezinfekcioni rastvor koriste u održavanju higijene zubne proteze (tabela 18). Takođe, ne postoji statistički značajna razlika po grupama u odnosu na učestalost higijene zubne proteze (tabela 18).

Tabela 18. Higijena zubne proteze kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Higijena zubne proteze	dobra	0 (0%)	0 (0%)	^a p=0.028*
	srednja	22 (27%)	9 (60%)	
	loša	60 (73%)	6 (40%)	
Učestalost higijene	< 1 dnevno	1 (1%)	0 (0%)	^a p=0.680
	1 dnevno	24 (29%)	3 (20%)	
	>1 dnevno	57 (70%)	12 (80%)	
Sredstva za čišćenje zubne proteze	voda	1 (1%)	0 (0%)	^a p=0.635
	voda, četka	12 (15%)	1 (7%)	
	voda, četka, pasta	69 (84%)	14 (93%)	
Potapa zubnu protezu u dezinfekcioni rastvor	ne	48 (59%)	6 (40%)	^a p=0.156
	da	34 (41%)	9 (60%)	
Rastvor za dezinfekciju zubne proteze	natrijum- hipohlorit	2 (6%)	0 (0%)	^a p=0.16
	hlorheksidin	1 (3%)	0 (0%)	
	tablete	14 (41%)	6 (67%)	
	soda bikarbona	15 (44%)	1 (11%)	
	sirće	2 (6%)	1 (11%)	
	tablete, soda bikarbona	0 (0%)	1 (11%)	

*statistički značajno, ^aHi kvadrat -test

Nošenje zubne proteze noću i korišćenje sredstava za lepljenje nisu statistički značajni parametri u etiologiji proteznog stomatitisa (tabela 19).

Tabela 19. Navike u korišćenju zubne proteze kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n= 15)	Vrednosti P
Nošenje zubne proteze preko noći	ne	25 (30%)	6 (40%)	^a p=0.468
	da	57 (70%)	9 (60%)	
Korišćenje sredstava za lepljenje proteze	ne	76 (93%)	14 (63%)	^a p=0.929
	da	6 (7%)	1(7%)	

^aHi kvadrat- test

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti značajan uticaj očuvanosti vertikalne dimenzije okluzije, stabilnosti okluzije i dobre retencije i stabilnosti zubne proteze na etiologiju proteznog stomatitisa, što je prikazano u tabeli 20.

Tabela 20. Funkcionalne karakteristike zubne proteze kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Vertikalna dimenzija okluzije	nije očuvana	78 (95%)	10 (67%)	^a p=0.00*
	očuvana	4 (5%)	5 (33%)	
Okluzija	nije stabilna	78 (95%)	11 (73%)	^a p=0.005*
	stabilna	4 (5%)	4 (27%)	
Retencija i stabilizacija	loša	69 (84%)	8 (53%)	^a p=0.07
	dobra	13 (16%)	7 (47%)	
Da li je proteza podlagana	ne	65 (79%)	9 (60%)	^a p=0.107
	da	17 (21%)	6 (40%)	

* statistički značajno, ^aHi kvadrat-test

Obe grupe pacijenata su zadovoljne svojim zubnim protezama (tabela 21).

Tabela 21. Subjektivna ocena kvaliteta zubne proteze pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije.

parametri		Protezni stomatitis gljivične etiologije (n=82)	Protezni stomatitis mehaničke etiologije (n=15)	P vrednost
Zadovoljan/a zubnom protezom	ne	21 (26%)	3 (20%)	^a p=0.643
	da	61 (74%)	12 (80%)	

^aHi kvadrat-test

Zbog malo različitih podataka vertikalna dimenzija okluzije i okluzija su isključeni iz dalje analize.

Pol i higijena zubne proteze su značajni prediktori tipa proteznog stomatitisa (tabela 22), i to:

- osobe ženskog pola za nastanak proteznog stomatitisa gljivične etiologije, a osobe muškog pola za nastanak proteznog stomatitisa mehaničke etiologije,
- što je lošija higijena zubne proteze veća je šansa za nastanak proteznog stomatitisa gljivične etiologije, što je bolja higijena zubne proteze veća je šansa za nastanak proteznog stomatitisa mehaničke etiologije.

Tabela 22. Nezavisni prediktori za etiologiju proteznog stomatitisa.

parametri	P vrednost	OR	95% IP za OR	
			gornji	donji
Pol	0.043*	4.830	1.053	22.160
Alkohol	0.100	0.139	0.013	1.457
Higijena proteze	0.045*	5.332	1.037	27.423
Retencija i stabilizacija	0.055	0.233	0.053	1.029
Kolilko nosi donju protezu	0.209	1.055	0.970	1.148
Konstanta	0.063	0.005		

* statistički značajno, IP-interval poverenja; OR- odds ratio/ unakrsni odnos šansi

Metod koji je primenjen za analizu svih prethodno izabranih varijabli je multivarijantna logistička regresija (tabela 22).

4.2 Mikrobiološki deo

4.2.1 Analiza metoda za uzorkovanje mikrobiološkog materijala

Za uzorkovanje mikrobiološkog materijala korišćene su četiri metode: bris nepca, bris proteze, ispirak i izlaganje zubne proteze blagom ultrazvuku. Ultrazvuk proteze je najviše dao pozitivnih nalaza zbog čega je ultrazvuk proteze uzet kao metoda sa kojom su poredene ostale.

Metodom ultrazvuk proteze gljive roda *Candida* su izolovane kod 82 pacijenta, a kod 15 pacijenata nisu, dok su metodom bris nepca gljive roda *Candida* izolovane kod 38 pacijenata, a kod 59 pacijenata nisu. Od 38 pacijenata kod kojih su brisom nepca izolovane

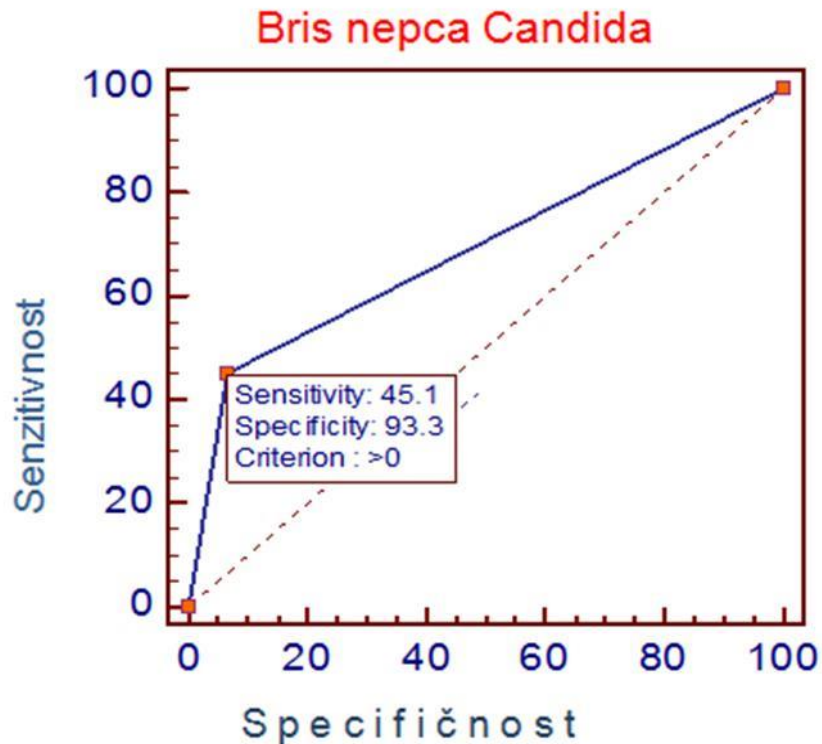
gljive roda *Candida*, 37 pacijenata je imalo izolovanu *Candida* i ultrazvučno, dok kod jednog pacijenta ultrazvučno *Candida* nije verifikovana. Od 59 pacijenata kod kojih je bris nepca bio negativan, ultrazvučno je 45 pacijenata imalo potvrđeno prisustvo gljiva roda *Candida*, a 14 pacijenata nije (tabela 23). Postoji statistički značajna razlika između rezultata ove dve metode uzorkovanja $p=0.00$.

Tabela 23. Poređenje metode ultrazvuk proteze sa metodom bris nepca.

		Ultrazvuk proteze		ukupno	P vrednost
Bris nepca		negativan nalaz	pozitivan nalaz		^c $p=0.00^*$
	negativan nalaz	14 (15%)	45 (46%)	59 (61%)	
	pozitivan nalaz	1 (1%)	37 (38%)	38 (39%)	
ukupno		15 (16%)	82 (84%)	97(100%)	

*statistički značajno, ^c McNemar test

Metoda bris nepca je pokazala senzitivnost od 45.1 i specifičnost od 93.3 (grafikon 1).



Grafikon 1. Senzitivnost i specifičnost za metodu bris nepca.

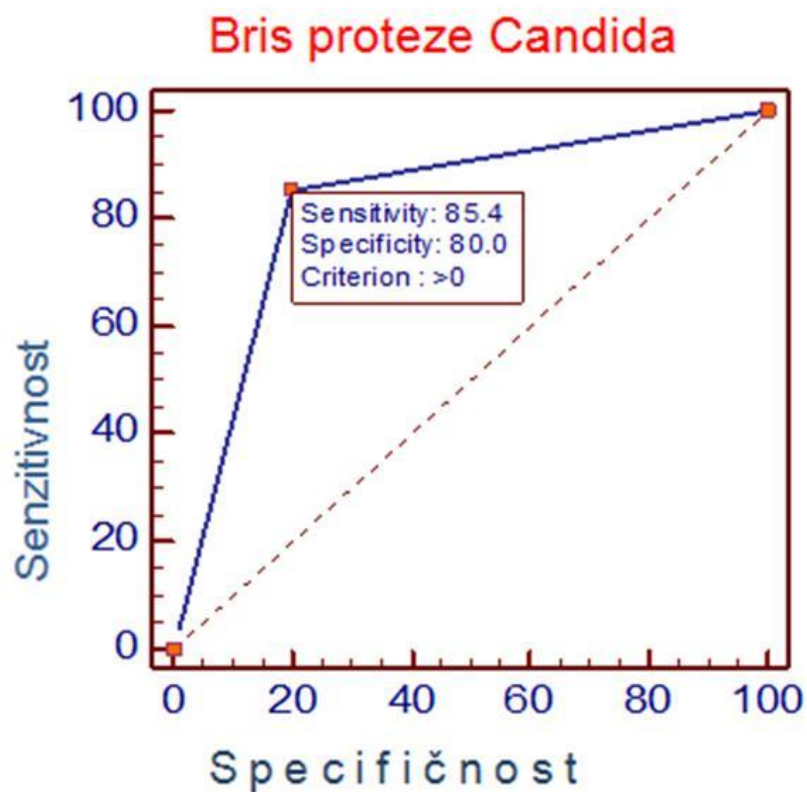
Metodom ultrazvuk proteze gljive roda *Candida* su izolovane kod 82 pacijenta, a kod 15 pacijenata nisu, dok su metodom bris proteze gljive roda *Candida* izolovane kod 73 pacijenta, a kod 24 pacijenta nisu. Od 73 pacijenta kod kojih su brisom proteze izolovane gljive roda *Candida*, 70 pacijenata je imalo izolovanu *Candida* i ultrazvučno, dok kod 3 pacijenta ultrazvučno *Candida* nije verifikovana. Od 24 pacijenta kod kojih je bris proteze bio negativan, ultrazvučno je 12 pacijenata imalo potvrđeno prisustvo gljiva roda *Candida*, a 12 pacijenata nije (tabela 24). Postoji statistički značajna razlika između rezultata ove dve metode uzorkovanja $p=0.035$.

Tabela 24. Poređenje metode ultrazvuk proteze sa metodom bris proteze.

		Ultrazvuk proteze		ukupno	P vrednost
		negativan nalaz	pozitivan nalaz		
Bris proteze	negativan nalaz	12 (12%)	12 (12%)	24 (24%)	^c p=0.035*
	pozitivan nalaz	3 (3%)	70 (73%)	73 (76%)	
ukupno		15 (15%)	82 (85%)	97 (100%)	

* statistički značajno, ^c McNemar test

Metoda bris proteze je pokazala senzitivnost od 85.4 i specifičnost od 80.0 (grafikon 2).



Grafikon 2. Senzitivnost i specifičnost za metodu bris proteze.

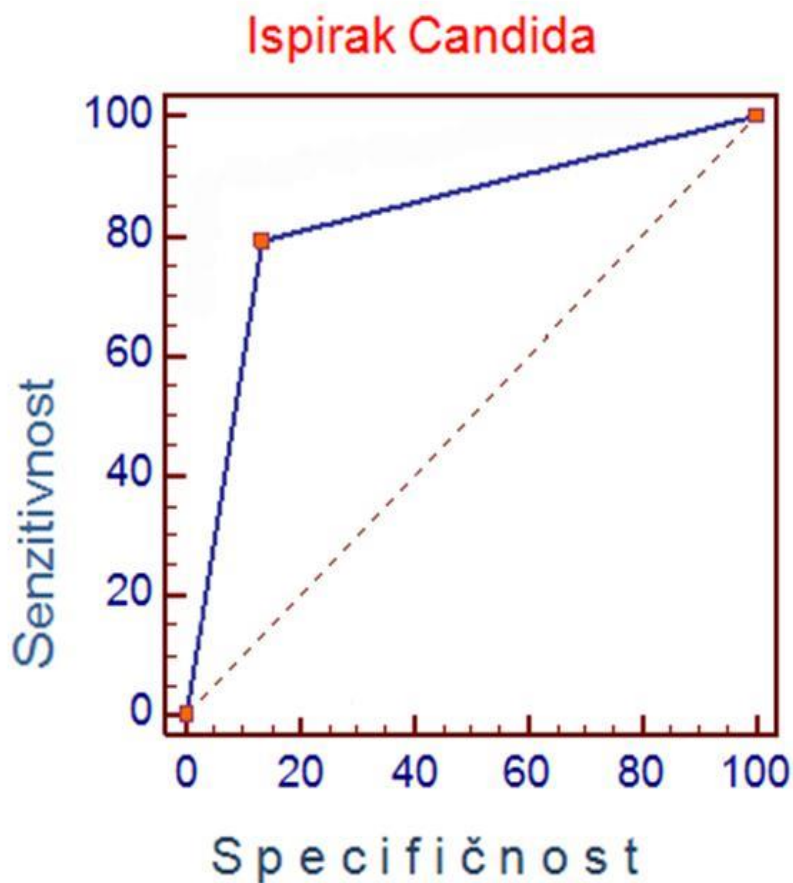
I na kraju, metodom ultrazvuk proteze gljive roda *Candida* su izolovane kod 82 pacijenta, a kod 15 pacijenata nisu, dok su metodom ispirak gljive roda *Candida* izolovane kod 67 pacijenata, a kod 30 pacijenata nisu. Od 67 pacijenata kod kojih su ispirkom izolovane gljive roda *Candida*, 65 pacijenata je imalo izolovanu *Candida* i ultrazvučno, dok kod 2 pacijenta ultrazvučno *Candida* nije verifikovana. Od 30 pacijenata kod kojih je ispirak bio negativan, ultrazvučno je 17 pacijenata imalo potvrđeno prisustvo gljiva roda *Candida*, a 13 pacijenata nije (tabela 25). Postoji statistički značajna razlika između nalaza ove dve metode uzorkovanja mikrobiološkog materijala ($p=0.01$).

Tabela 25. Poređenje metode ultrazvuk proteze sa metodom ispirak.

		Ultrazvuk proteze		ukupno	P vrednost
		negativan nalaz	pozitivan nalaz		
Ispirak	negativan nalaz	13 (13%)	17 (18%)	30 (31%)	^c $p=0.01^*$
	pozitivan nalaz	2 (2%)	65 (67%)	67 (69%)	
ukupno		15 (16%)	82 (81%)	97 (100%)	

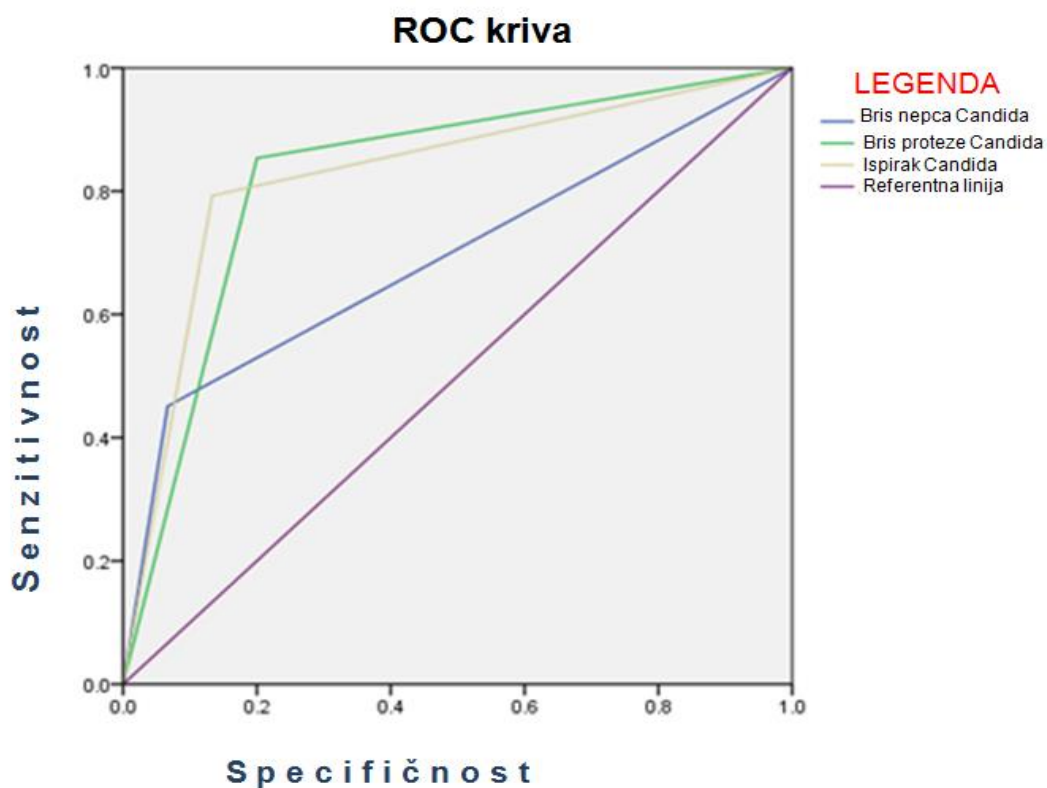
*statistički značajno, ^c McNemar test

Metoda ispirak je pokazala senzitivnost od 79.27 i specifičnost od 86.67 (grafikon 3).



Grafikon 3. Senzitivnost i specifičnost za metodu ispirak.

Ako se porede metode uzorkovanja mikrobiološkog materijala međusobom (pošto ne postoji metoda koja je zlatni standard, poređiće se metode bris nepca, bris proteze i ispirak sa metodom ultrazvuk proteze). Metoda ispirak daje slične rezultate kao metoda ultrazvuk proteze, kao i metoda bris proteze. Rezultati metode bris nepca se najlošije slažu sa rezultatima metode ultrazvuk proteze. Rezultati metode bris proteze je relativno sličan sa rezultatima metode ispirak, što je prikazano u grafikonu pomoću ROC krive (grafikon 4).



Grafikon 4. ROC kriva za metode uzorkovanja mikrobiološkog materijala.

Najveću površinu ispod ROC krive-AUC od tri metode ima ispirak. Bris proteze ima približnu vrednost AUC ispirku. Ove dve metode u odnosu na bris nepca preciznije (bolje) razlikuju mikrobiološki materijal obolelih od zdravih (tabela 26).

Tabela 26. Površina ispod ROC krive-AUC.

Parametri	AUC	95% I.P. AUC		P vrednost
		Donja granica	Gornja granica	
Bris nepca	0.692	0.569	0.816	0.018
Bris proteze	0.827	0.701	0.953	0.00
Ispirak	0.830	0.717	0.942	0.00

IP- interval poverenja

Senzitivnost i specifičnost za metode uzorkovanja su prikazane u tabeli 27. Najveću vrednost senzitivnosti ima bris proteze, a najmanju bris nepca. Najveću vrednost specifičnosti ima bris nepca, a najmanju bris proteze.

Tabela 27. Senzitivnost i specifičnost metoda uzorkovanja mikrobiološkog materijala.

Parametri	SE	95% IP SE	SP	95% IP SP
Bris nepca	45.12	34.1 - 56.5	93.33	68.1 - 99.8
Bris proteze	85.37	75.8 - 92.2	80.00	51.9 - 95.7
Ispirak	79.27	68.9 - 87.4	86.67	59.5 - 98.3

IP- interval poverenja; SE- senzitivnost; SP-specifičnost;

Poređenjem senzitivnosti i specifičnosti metoda uzorkovanja mikrobiološkog materijala, uočava se statistička značajnost između metoda ispirak i bris nepca. Kada se analiziraju senzitivnost i specifičnost između brisa nepca i brisa proteze, kao i između ispirka i brisa proteze ne postoji statistička značajnost (tabela 28).

Tabela 28. Poređenje senzitivnosti i specifičnosti metoda uzorkovanja mikrobiološkog materijala.

	Bris nepca	Bris proteze
Bris proteze	p=0.0636	
Ispirak	p=0.0015*	p=0.965

*statistički značajno

4.2.2 Kvantitativna i kvalitativna analiza mikrobiološkog nalaza kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije

Protezni stomatitis je klasifikovan na onovu inteziteta zapaljenja u tri stepena.

Analizom stepena zapaljenja i prisustva bakterija i gljiva kod pacijenata sa proteznim stomatitisom, nije uočena statistička značajnost, tako da stepen zapaljenja nije u korelaciji sa prisustvom bakterija i gljiva (tabela 29).

Tabela 29. Korelacija između stepena zapaljenja i prisustva bakterija i gljiva kod pacijenata sa proteznim stomatitisom.

		Pacijenati sa proteznim stomatitisom n=97					
		bakterije(-) gljive(-)	bakterije(+) gljive(-)	bakterije(-) gljive(+)	bakterije(+) gljive(+)	P vrednost	
Klasifikacija proteznog stomatitisa	lokalna hiperemija	4 (4%)	2 (2%)	14 (15%)	5 (5%)	^a p=0.567	
	difuzni eritem	7 (7%)	2 (2%)	36 (37%)	13 (14%)		
	papilarna hiperplazija	0 (0%)	0 (0%)	9 (9%)	5 (5%)		
	ukupno	11(11%)	4 (%)	59 (61%)	23 (24%)		

(-)-negativan nalaz, (+) - pozitivan nalaz, ^aHi kvadrat-test

Kada se analizira uticaj prisustva bakterija i gljiva na lokaciju eritematozne promene, takođe se ne uočava statistička značajnost (tabela 30).

Tabela 30. Korelacija između lokacije eritematozne zone i prisustva bakterija i gljiva kod pacijenata sa proteznim stomatitisom.

		Pacijenati sa proteznim stomatitisom n=97				
		bakterije(-) gljive(-)	bakterije(+) gljive(-)	bakterije(-) gljive(+)	bakterije(+) gljive(+)	P vrednost
Lokacija eritematozne zone	tvrd nepce	6 (6%)	2 (2%)	19 (20%)	3 (3%)	^a p=0.591
	tvrd, meko nepce	1(1%)	1 (1%)	5 (5%)	4 (4%)	
	tvrd nepce, alveolarni greben	4(4%)	1 (1%)	28 (29%)	13(14%)	
	tvrd, meko nepce alveolarni greben	0 (0%)	0 (0%)	6 (6%)	3 (3%)	
	protezni stomatitis i angularni hejlitis	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	
	ukupno	11(11%)	4 (4%)	59 (61%)	23(24%)	

(-)- negativan nalaz, (+)- pozitivan nalaz, ^aHi kvadrat-test

Od 97 pacijenata kod kojih je kliničkim pregledom dijagnostikovao protezni stomatitis, kod 82 pacijenta je utvrđeno prisustvo gljiva roda *Candida* kada je uzorkovanje vršeno izlaganjem zubne proteze blagom ultrazvuku.

Kvantitativna analiza broja kolonija gljiva roda *Candida*

Mikrobiološki uzorci nastali metodom ispirak i izlaganjem zubne proteze blagom ultrazvuku, omogućavaju kvantifikaciju (određivanje broja) kolonija gljiva roda *Candida*.

Između broja kolonija *Candida* pri uzorkovanju ispirkom i izlaganjem zubne proteze blagom ultrazvuku uočava se statistička značajnost. Postoji značajna korelacija između rezultata o broju kolonija dobijenih ispirkom i izlaganjem zubne proteze ultrazvuku. Izlaganjem zubne proteze ultrazvuku dobija se 30 puta veći broj kolonija *Candida* od broja kolonija koji se dobija ispirkom (tabela 31).

Tabela 31. Broj kolonija *Candida*, uzorkovanje vršeno ispirkom i izlaganjem proteze ultrazvuku.

	Metode uzorkovanja		P vrednost
Broj kolonija <i>Candida</i>	Ispirak	Ultrazvuk proteze	^b p=0.01*
	4175.09±10621.335	128463.69±308195.703	

Aritmetička sredina±standardna devijacija; *statistički značajno, ^b t-test

Kada se uzorkovanje mikrobiološkog materijala vrši ispirkom ne postoji statistički značajna razlika u broju kolonija po grupama (stepenu zapaljenja proteznog stomatitisa), međutim kada se uzorkovanje mikrobiološkog materijala vrši izlaganjem zubne proteze blagom ultrazvuku postoji statistički značajna razlika u broju kolonija po grupama (po stepenu zapaljenja proteznog stomatitisa) (tabela 32).

Tabela 32. Korelacija između stepena zapaljenja i broja kolonija *Candida*, uzorkovanje vršeno ispirkom i izlaganjem proteze ultrazvuku.

		Metode uzorkovanja	
Klasifikacija proteznog stomatitisa		Ispirak	Ultrazvuk proteze
	lokalna hiperemija	1076.56±1402.779	9228.42±11186.807
	difuzni eritem	4517.13±12184.831	89883.47±205424.145
	papilarna hiperplazija	7500.45±11905.495	329228.57±514001.101
	ukupno	4175.09±10621.335	112058.90±279939.416
	P vrednost	^d p=0.294	^d p=0.003*

*statistički značajno, ^d ANOVA

Kada je uzorkovanje vršeno izlaganjem zubne proteze ultrazvuku, postoji statistički značajna razlika u broju kolonija *Candida* između lokalne hiperemije (I) i papilarne hiperplazije (III) takođe, i između difuznog eritema (II) i papilarne hiperplazije (III). Ne postoji statistički značajna razlika u broju kolonija *Candida* između lokalne hiperemije (I) i difuznog eritema (II) (tabela 33).

Tabela 33. Međugrupno poređenje broja kolonija *Candida*, kada je uzorkovanje vršeno izlaganjem proteze ultrazvuku.

	Lokalna hiperemija	Papilarna hiperplazija
Difuzni eritem	p=0.779	p=0.011*
Papilarna hiperplazija	p=0.003*	

* statistički značajno

Između broja kolonija *Candida* (pri uzorkovanju ispirkom i izlaganjem zubne proteze ultrazvuku) i lokacije eritematozne zone ne uočava se statistička značajnost (tabela 34).

Tabela 34. Korelacija između lokacije eritematozne zone i broja kolonija *Candida*, uzorkovanje vršeno ispirkom i izlaganjem proteze ultrazvuku.

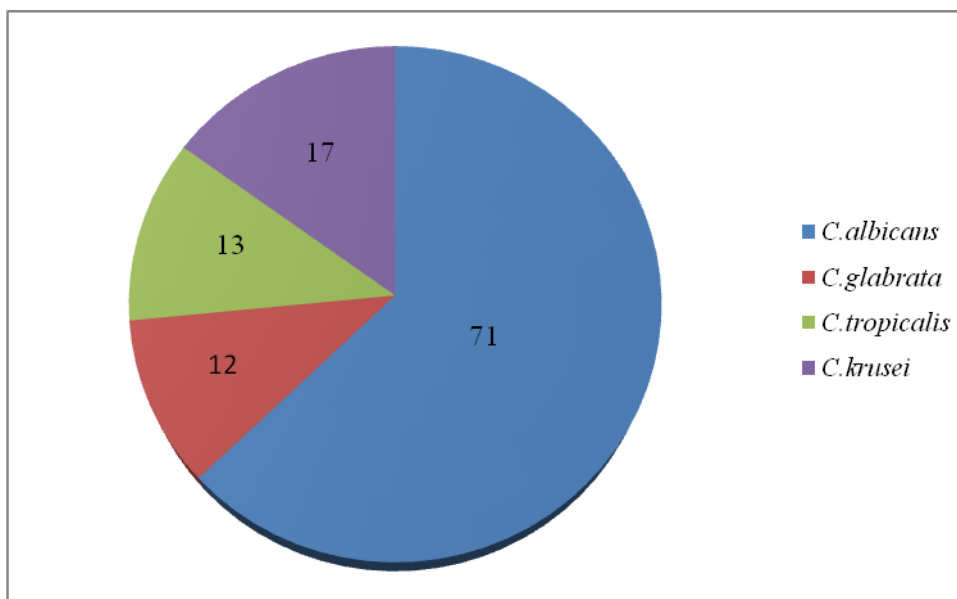
		Metode uzorkovanja	
		Ispirak	Ultrazvuk proteze
Lokacija eritematozne zone	tvrd nepce	875.00±1636.832	16634.55±41978.639
	tvrd, meko nepce	2025.00±2456.751	31762.22±50898.983
	tvrd nepce, alveolarni greben	5758.41±13732.729	142335.61±335715.632
	tvrd, meko nepce alveolarni greben	7590.83±10341.337	293194.44±385362.549
	protezni stomatitis i angularni hejlitis	1000.00±-	62500.00±-
	ukupno	4175.09±10621.335	112058.90±279939.416
	P vrednost	^d p=0.505	^d p=0.105

^d ANOVA

Kvalitativna analiza broja kolonija gljiva roda *Candida*

Od 82 mikrobiološka uzorka gde je utvrđeno prisustvo gljiva roda *Candida*, 54 ima samo jednu vrstu roda *Candida*, a u 28 uzoraka ima više vrsta roda *Candida*.

Od 82 mikrobiološka uzorka gde je utvrđeno prisustvo gljiva roda *Candida* *C. albicans* je prisutna u 71 uzorku, *C. glabrata* u 12, *C. tropicalis* u 13 i *C. krusei* u 17 uzoraka (grafikon 6).



Grafikon 6. Zastupljenost vrsta roda *Candida* kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije.

C. albicans je izolovana kao jedina vrsta roda *Candida* kod 47 pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije, *C. glabrata* kod 1, *C. tropicalis* kod 5 i *C. krusei* kod 1 pacijenta (tabela 35).

Kada je udruženo više vrsta roda *Candida*, uglavnom je prisutna *C. albicans* (kod 24 pacijenta) sa nekom drugom vrstom roda *Candida*. Samo kod 4 pacijenta u mešovitim infekcijama nije prisutna *C. albicans*. *C. glabrata* učestvuje sa drugim vrstama roda *Candida* kod 11 pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije, *C. tropicalis* kod 8 i *C. krusei* kod 16 pacijenata. *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. krusei* se statistički značajno češće javljaju udružene sa drugim vrstama roda *Candida* (tabela 35).

Tabela 35. Distribucija vrsta roda *Candida* kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije.

	Izolovane vrste roda <i>Candida</i> kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije n=82		
	Prisustvo kao jedina vrsta roda <i>Candida</i> u uzorku	Prisustvo sa drugim vrsta roda <i>Candida</i> u uzorku	P vrednost
<i>C. albicans</i>	47	24	^a p=0.868
<i>C. glabrata</i>	1	11	^a p=0.00*
<i>C. tropicalis</i>	5	8	^a p=0.023*
<i>C. krusei</i>	1	16	^a p=0.00*

*statistički značajno, ^a Hi kvadrat-test

Iz tabele 36 vidimo da je protezni stomatitis gljivične etiologije izazvan u većini slučajeva sa jednom vrstom roda *Candida* (54 pacijenta). Kod 25 pacijenata protezni stomatitis je bio izazvan sa dve vrste roda *Candida*. Samo kod tri pacijenta su prisutne tri vrste roda *Candida* i to: kod dva pacijenta je prisutna *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. krusei*, a kod jednog pacijenta *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. krusei*.

Tabela 36. Zastupljenost broja vrsta roda *Candida* kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije.

	n=82	%
1 vrsta roda <i>Candida</i>	54	65.9
2 vrste roda <i>Candida</i>	25	30,5
3 vrste roda <i>Candida</i>	3	3,7
ukupno	82	100

Prisustvo više vrsta roda *Candida* u nastanku infekcije kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije ima uticaja na stepen zapaljenja (postoji statistička značajnost $p=0.046$). Više vrsta roda *Candida* su prisutne kod pacijenata sa II i III stepenom zapaljenja. I stepen zapaljenja (lokalna hiperemija) je u najvećem broju slučajeva izazvana sa jednom vrstom roda *Candida* (tabela 37).

Tabela 37. Korelacija između stepena zapaljenja i broja vrsta roda *Candida* kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije.

	Klasifikacija proteznog stomatitisa, n=82			
	Lokalna hiperemija	Difuzni eritem	Papilarna hiperplazija	P vrednost
1 vrsta roda <i>Candida</i>	16 (84%)	32 (65%)	6 (43%)	^a $p=0.046^*$
više vrsta roda <i>Candida</i>	3 (16%)	17 (35%)	8 (57%)	

*statistički značajno, ^aHi kvadrat-test

Kada se analizira lokacija eritematozne zone i broj vrsta roda *Candida* koji učestvuje u nastanku infekcije kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije, uočava se statistička značajnost. Eritematozna zona je najčešće locirana na tvrdom nepcu i alveolarnom grebenu i tvrdom nepcu, mekom nepcu i alveolarnom grebenu kada je infekcija uzrokovana sa više vrsta roda *Candida* (tabela 38).

Tabela 38. Korelacija između lokacije eritematozne zone i broja vrsta roda *Candida* kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije.

	Lokacija eritematozne zone					P vrednost
	Tvrdo nepce	Tvrdo i meko nepce	Tvrdo nepce i alveolarni greben	Tvrdo i meko nepce i alveolarni greben	Protezni stomatitis i angularni hejlitis	
1 vrsta roda <i>Candida</i>	18 (82%)	9 (100%)	24 (59%)	3 (33%)	0 (0%)	^a p=0.006*
više vrsta roda <i>Candida</i>	4 (18%)	0 (0%)	17 (41%)	6 (67%)	1 (100%)	

*statistički značajno, ^aHi kvadrat-test

4.3 Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja na izolovane sojeve gljiva roda *Candida* u *in vitro* uslovima

Pri ispitivanju antifungalne aktivnosti etarskih ulja (limuna, grejpfruta, čajnog drveta, cimeta, timijana) u *in vitro* uslovima, prvo se određivala srednja MIK, a zatim srednja MFK za sve ispitivane sojeve roda *Candida*.

4.3.1 Određivanje vrednosti MIK za etarska ulja limuna, grejpfruta, čajnog drveta, cimeta, timijana

Pri dejstvu pet etarskih ulja na 10 sojeva *C. albicans*, najmanju srednju vrednost MIK ima etarsko ulje timijana, a najveću srednju vrednost MIK ima etarsko ulje čajnog drveta (tabela 39).

Tabela 39. MIK za pet etarskih ulja kada deluju na *C. albicans* (µg/ml).

					95% za aritmetičku sredinu			
Etarsko ulje	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna greška	Donja granica	Gornja granica	Min.	Max.
Timijan	10	0.350*	0.1581	0.0500	0.237	0.463	0.2	0.5
Cimet	10	0.650	0.2415	0.0764	0.477	0.823	0.5	1.0
Čajno drvo	10	2.800	1.0328	0.3266	2.061	3.539	2.0	4.0
Grejpfrut	10	0.600	0.2108	0.0667	0.449	0.751	0.5	1.0
Limun	10	0.460	0.2366	0.0748	0.291	0.629	0.2	1.0

IP- interval poverenja, *- najniža MIK vrednost

Kada analiziramo dejstvo pet etarskih ulja na 10 sojeva *C. glabrata*, najmanju srednju vrednost MIK imaju etarska ulja cimeta i limuna. Najveću srednju vrednost MIK ima etarsko ulje čajnog drveta (tabela 40).

Tabela 40. MIK za pet etarskih ulja kada deluju na *C. glabrata* (µg/ml).

					95% IP za aritmetičku sredinu			
Etarsko ulje	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna greška	Donja granica	Gornja granica	Min.	Max.
Timijan	10	0.525	0.2188	0.0773	0.342	0.708	0.2	1.0
Cimet	10	0.200*	0.0000	0.0000	0.200	0.200	0.2	0.2
Čajno drvo	10	1.625	0.5175	0.1830	1.192	2.058	1.0	2.0
Grejpfrut	10	0.463	0.1061	0.0375	0.374	0.551	0.2	0.5
Limun	10	0.200*	0.0000	0.0000	0.200	0.200	0.2	0.2

IP- interval poverenja, *- najniža MIK vrednost

Pri dejstvu pet etarskih ulja na 10 sojeva *C. tropicalis*, najmanju srednju vrednost MIK ima etarsko ulje timijana, a najveću srednju vrednost MIK ima etarsko ulje čajnog drveta (tabela 41).

Tabela 41. MIK za pet etarskih ulja kada deluju na *C. tropicalis* (µg/ml).

Etarsko ulje	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna greška	95% IP za aritmetičku sredinu		Min.	Max.
					Donja granica	Gornja granica		
Timijan	10	0.380*	0.1549	0.0490	0.269	0.491	0.2	0.5
Cimet	10	0.950	0.4378	0.1384	0.637	1.263	0.5	2.0
Čajno drvo	10	2.800	1.0328	0.3266	2.061	3.539	2.0	4.0
Grejpfrut	10	0.820	0.3011	0.0952	0.605	1.035	0.2	1.0
Limun	10	0.510	0.2923	0.0924	0.301	0.719	0.2	1.0

IP- interval poverenja, *- najniža MIK vrednost

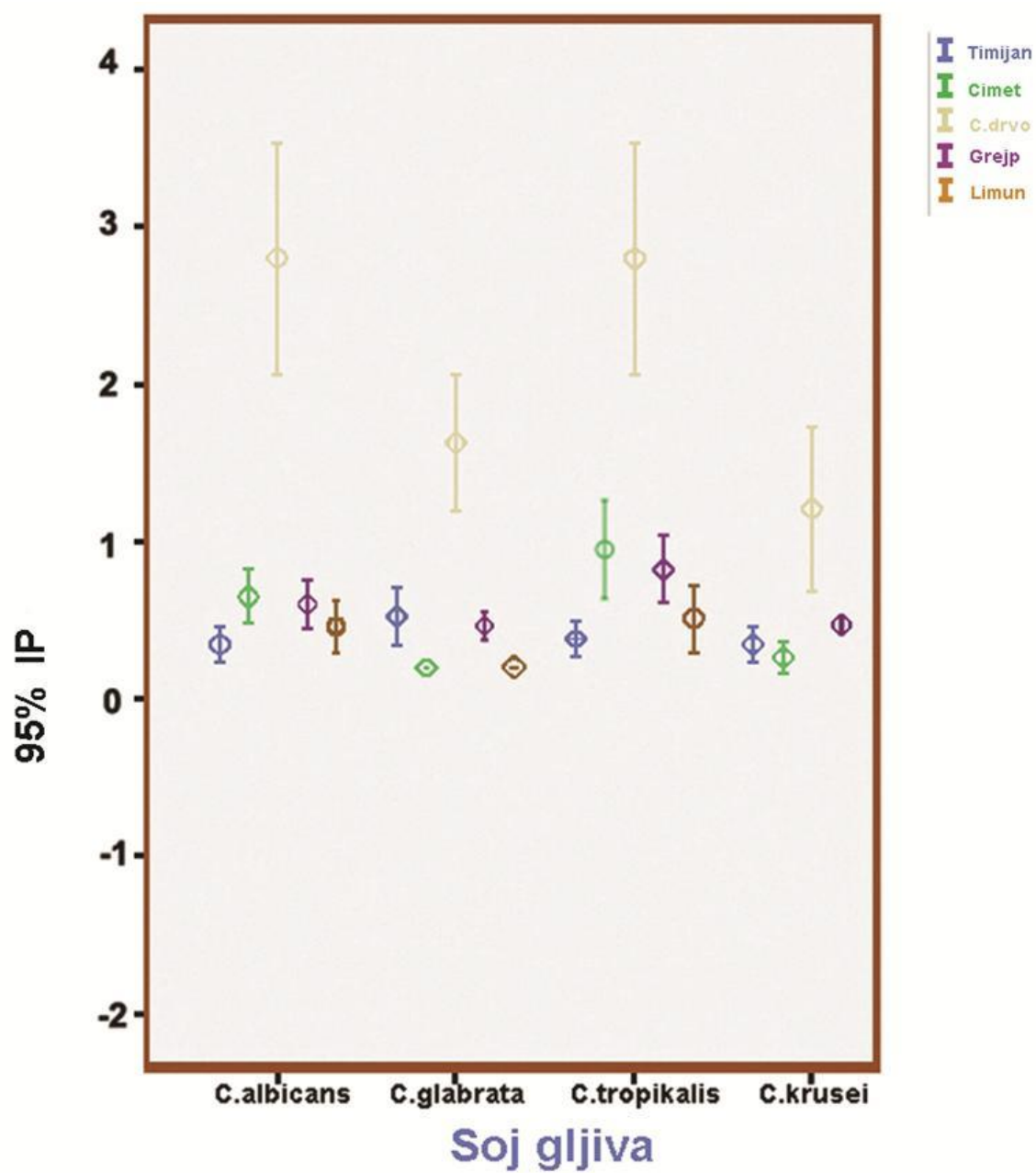
Kada analiziramo dejstvo pet etarskih ulja na 10 sojeva *C. krusei*, najmanju srednju vrednost MIK imaju etarska ulja cimeta i limuna. Najveću srednju vrednost MIK ima etarsko ulje čajnog drveta (tabela 42).

Tabela 42. MIK za pet etarskih ulja kada deluju na *C. krusei* (µg/ml).

					95% IP za aritmetičku sredinu			
Etarsko ulje	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna greška	Donja granica	Gornja granica	Min.	Max.
Timijan	10	0.350	0.1581	0.0500	0.237	0.463	0.2	0.5
Cimet	10	0.260*	0.1265	0.0400	0.170	0.350	0.2	0.5
Čajno drvo	10	1.210	0.7355	0.2326	0.684	1.736	0.1	2.0
Grejpfrut	10	0.470	0.0949	0.0300	0.402	0.538	0.2	0.5
Limun	10	0.260*	0.1265	0.0400	0.170	0.350	0.2	0.5

IP- interval poverenja, *- najniža MIK vrednost

Analizom rezultata srednjih vrednosti MIK etarskih ulja pri dejstvu na četiri vrste roda *Candida*, vidimo da najmanju srednju vrednost MIK ima etarsko ulje limuna (0.2 µg/ml) i etarsko ulje cimeta (0.2 µg/ml). Najveću srednju vrednost MIK ima etarsko ulje čajnog drveta (2.8 µg/ml), rezultati su prikazani i grafički (grafikon 7).



Grafikon 7. Srednje vrednosti MIK etarskih ulja pri dejstvu na četiri vrste roda *Candida*.

4.3.2 Određivanje vrednosti MFK za etarska ulja limuna, grejpfruta, čajnog drveta, cimeta, timijana

Pri dejstvu pet etarskih ulja na 10 sojeva *C. albicans*, najmanju srednju vrednost MFK ima etarsko ulje timijana, a najveću srednju vrednost MFK ima etarsko ulje čajnog drveta (tabela 43).

Tabela 43. MFK za pet etarskih ulja kada deluju na *C. albicans* (µg/ml).

Etarsko ulje	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna greška	95% IP za aritmetičku sredinu		Min.	Max.
					Donja granica	Gornja granica		
Timijan	10	0.750*	0.2635	0.0833	0.561	0.939	0.5	1.0
Cimet	10	1.300	0.4830	0.1528	0.954	1.646	1.0	2.0
Čajno drvo	10	5.600	2.0656	0.6532	4.122	7.078	4.0	8.0
Grejpfrut	10	1.200	0.4216	0.1333	0.898	1.502	1.0	2.0
Limun	10	0.950	0.4378	0.1384	0.637	1.263	0.5	2.0

IP- interval poverenja, *- najniža MFK vrednost

Kada analiziramo dejstvo pet etarskih ulja na 10 sojeva *C. glabrata*, najmanju srednju vrednost MFK imaju etarsko ulje limuna. Najveću srednju vrednost MFK ima etarsko ulje čajnog drveta (tabela 44).

Tabela 44. MFK za pet etarskih ulja kada deluju na *C. glabrata* (µg/ml).

					95% IP za aritmetičku sredinu			
Etarsko ulje	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna greška	Donja granica	Gornja granica	Min.	Max.
Timijan	10	1.063	0.4173	0.1475	0.714	1.411	0.5	2.0
Cimet	10	0.688	0.2588	0.0915	0.471	0.904	0.5	1.0
Čajno drvo	10	3.500	0.9258	0.3273	2.726	4.274	2.0	4.0
Grejpfrut	10	1.063	0.4173	0.1475	0.714	1.411	0.5	2.0
Limun	10	0.625*	0.2315	0.0818	0.431	0.819	0.5	1.0

IP- interval poverenja, *- najniža MFK vrednost

Pri dejstvu pet etarskih ulja na 10 sojeva *C. tropicalis*, najmanju srednju vrednost MFK ima etarsko ulje timijana, a najveću srednju vrednost MFK ima etarsko ulje čajnog drveta (tabela 45).

Tabela 45. MFK za pet etarskih ulja kada deluju na *C. tropicalis* (µg/ml).

					95% IP za aritmetičku sredinu			
Etarsko ulje	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna greška	Donja granica	Gornja granica	Min.	Max.
Timijan	10	0.950*	0.4378	0.1384	0.637	1.263	0.5	2.0
Cimet	10	2.000	0.8165	0.2582	1.416	2.584	1.0	4.0
Čajno drvo	10	6.000	2.1082	0.6667	4.492	7.508	4.0	8.0
Grejpfrut	10	1.650	0.5798	0.1833	1.235	2.065	0.5	2.0
Limun	10	1.050	0.5503	0.1740	0.656	1.444	0.5	2.0

IP- interval poverenja, *- najniža MFK vrednost

Kada analiziramo dejstvo pet etarskih ulja na 10 sojeva *C. krusei*, najmanju srednju vrednost MFK imaju etarska ulja timijana, cimeta i limuna. Najveću srednju vrednost MFK ima etarsko ulje čajnog drveta (tabela 46).

Tabela 46. MFK za pet etarskih ulja kada deluju na *C. krusei* (µg/ml).

Etarsko ulje	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna greška	95% IP za aritmetičku sredinu		Min.	Max.
					Donja granica	Gornja granica		
Timijan	10	0.800*	0.2582	0.0816	0.615	0.985	0.5	1.0
Cimet	10	0.800*	0.2582	0.0816	0.615	0.985	0.5	1.0
Čajno drvo	10	2.420	1.4711	0.4652	1.368	3.472	0.2	4.0
Grejpfrut	10	1.000	0.0000	0.0000	1.000	1.000	1.0	1.0
Limun	10	0.800*	0.4830	0.1528	0.454	1.146	0.5	2.0

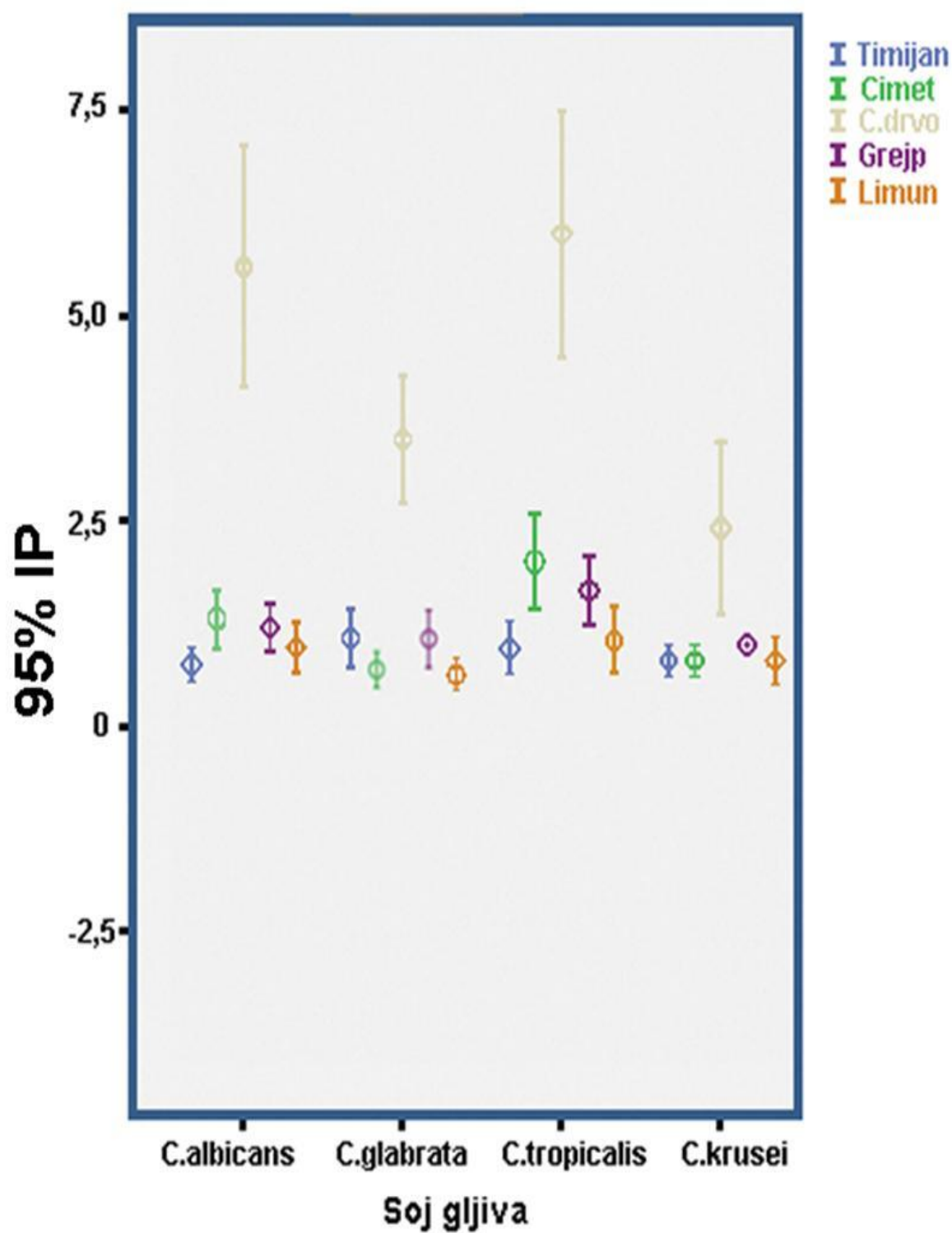
IP- interval poverenja, *- najniža MFK vrednost

Kada se analiziraju srednje vrednosti MFK za pet etarskih ulja kada deluju na četiri vrste roda *Candida*, najmanju vrednost ima etarsko ulje limuna (0.625 µg/ml) a najveću etarsko ulje čajnog drveta (6.00 µg/ml). Na osnovu datih rezultata, može se reći da je najefikasnije etarsko ulje limuna, a najmanje efikasno etarsko ulje čajnog drveta (tabela 47) rezultati su prikazani i grafički (grafikon 8).

Tabela 47. MIK i MFK za pet etarskih ulja kada deluju na četiri vrste roda *Candida* (µg/ml).

Etarsko ulje	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. krusei</i>		P vrednost #	
	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK
Timijan	0.350	0.750	0.525	1.063	0.380	0.950	0.350	0.800	0.163	0.325
Cimet	0.650	1.300	0.200	0.688	0.950	2.000	0.260	0.800	0.000*	0.000*
Čajno drvo	2.800	5.600	1.625	3.500	2.800	6.000	1.210	2.420	0.000*	0.000*
Grejpfrut	0.600	1.200	0.463	1.063	0.820	1.650	0.470	1.000	0.001*	0.006*
Limun	0.460	0.950	0.200	0.625	0.510	1.050	0.260	0.800	0.007*	0.228

*statistički značajno, # poređenje između sve četiri posmatrane vrste gljiva



Grafikon 8. Srednje vrednosti MFK etarskih ulja pri dejstvu na štiri vrste roda *Candida*.

Kada se analiziraju podaci iz tabele 47, uočava se razlika u minimalnim koncentracijama etarskih ulja kada deluju na četiri različite vrste gljiva roda *Candida*. Tako postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima MIK i MFK za etarska ulja cimeta, čajnog drveta i grejpfruta kada deluju na različite vrste gljiva roda *Candida*. A kod etarskog ulja limuna, postoji samo statistički značajna razlika u srednjim vrednostima MIK kada ulje deluje na različite vrste gljiva roda *Candida*. Pri dejstvu etarskog ulja timijana na četiri vrste roda *Candida* ne postoji statistički značajna razlika za srednje vrednosti MIK i MFK.

Kada se analizira osetljivost pojedinih vrsta roda *Candida* na etarsko ulje timijana, ne postoji statistički značajna razlika za srednje vrednosti MIK (tabela 48).

Tabela 48. Poređenje srednjih vrednosti MIK za ulje timijana kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 1.000	p= 1.000	p= 0.359
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 1.000	p= 0.793
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 0.359

Pri tretiranju sojeva različitih vrsta *Candida* na etarsko ulje cimeta, uočavaju se statistički značajne razlike u osetljivosti vrsta *Candida* za srednje vrednosti MIK (tabela 49). Uočava se statistički značajna razlika za srednje vrednosti MIK cimeta između: *C. albicans* i *C. krusei*, *C. krusei* i *C. tropicalis*, *C. tropicalis* i *C. glabrata*, *C. glabrata* i *C. albicans*. Najveća vrednost MIK je izmerena za *C. glabrata*, a najmanja za *C. albicans* i *C. krusei*.

Tabela 49. Poređenje srednjih vrednosti MIK za ulje cimeta kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 0.148	p= 0.02*	p= 0.009*
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 0.000*	p= 0.00*
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

*statistički značajno

Pri tretiranju sojeva različitih vrsta *Candida* na etarsko ulje čajnog drveta, uočavaju se statistički značajne razlike u osetljivosti vrsta *Candida* za srednje vrednosti MIK, i to između: *C. albicans* i *C. krusei*, *C. tropicalis* i *C. krusei* (tabela 50). Najveća vrednost MIK je izmerena za *C. tropicalis* a najmanja za *C. krusei*.

Tabela 50. Poređenje srednjih vrednosti MIK za ulje čajnog drveta kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 1.000	p= 0.002*	p= 0.68
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 0.000*	p= 0.68
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

*statistički značajno

Pri tretiranju sojeva različitih vrsta *Candida* na etarsko ulje grejpfruta, uočavaju se statistički značajne razlike u osetljivosti vrsta *Candida* za srednje vrednosti MIK, i to između: *C. tropicalis* i *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. krusei* (tabela 51). Najveća vrednost MIK je izmerena za *C. tropicalis* a najmanja za *C. krusei*.

Tabela 51. Poređenje srednjih vrednosti MIK za ulje grejpfruta kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 0.198	p= 1.000	p= 1.000
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 0.004*	p= 0.007*
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

*statistički značajno

Pri tretiranju sojeva različitih vrsta *Candida* na etarsko ulje limuna, uočava se statistički značajna razlika u osetljivosti vrsta *Candida* za srednje vrednosti MIK, između: *C. tropicalis* i *C. glabrata* (tabela 52), i to tako da je najveća vrednost MIK izmerena za *C. tropicalis* a najmanja za *C. glabrata*.

Tabela 52. Poređenje srednjih vrednosti MIK za ulje limuna kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 1.000	p= 0.328	p= 0.100
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 0.087	p= 0.026*
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

*statistički značajno

Kada se analizira osetljivost pojedinih vrsta roda *Candida* na etarsko ulje timijana, ne postoji statistički značajna razlika za srednje vrednosti MFK (tabela 53).

Tabela 53. Poređenje srednjih vrednosti MFK za ulje timijana kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 1.000	p= 1.000	p= 0.645
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 1.000	p= 1.000
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

Pri tretiranju sojeva različitih vrsta *Candida* na etarsko ulje cimeta, uočavaju se statistički značajne razlike u osetljivosti vrsta *Candida* za srednje vrednosti MFK (tabela 54). Uočava se statistički značajna razlika u srednjoj vrednosti MFK cimeta između: *C. albicans* i *C. tropicalis*, *C. krusei* i *C. tropicalis*, *C. tropicalis* i *C. glabrata*, i to tako da je najveća vrednost MFK izmerena za *C. tropicalis* a najmanja za *C. glabrata*.

Tabela 54. Poređenje srednjih vrednosti MFK za ulje cimeta kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 0.045*	p= 0.369	p= 0.170
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 0.000*	p= 0.00*
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

*statistički značajno

Pri tretiranju sojeva različitih vrsta *Candida* na etarsko ulje čajnog drveta, uočavaju se statistički značajne razlike u osetljivosti vrsta *Candida* za srednje vrednosti MFK, i to između: *C. albicans* i *C. krusei*, *C. tropicalis* i *C. krusei*, *C. tropicalis* i *C. glabrata* (tabela 55). Najveća vrednost MFK je izmerena za *C. tropicalis* a najmanja za *C. krusei*.

Tabela 55. Poređenje srednjih vrednosti MFK za ulje čajnog drveta kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 1.000	p= 0.002*	p= 0.146
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 0.000*	p= 0.042*
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

*statistički značajno

Pri tretiranju sojeva različitih vrsta *Candida* na etarsko ulje grejpfruta, uočavaju se statistički značajne razlike u osetljivosti vrsta *Candida* za srednje vrednosti MFK, između: *C. tropicalis* i *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. krusei* (tabela 56), i to tako da je najveća vrednost MFK izmerena za *C. tropicalis* a najmanja za *C. krusei* i *C. glabrata* (za poslednje dve navedene gljive su vrednosti približno iste).

Tabela 56. Poređenje srednjih vrednosti MFK za ulje grejpfruta kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 0.201	p= 1.000	p= 1.000
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 0.012*	p= 0.05*
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

*statistički značajno

Pri tretiranju sojeva različitih vrsta *Candida* na etarsko ulje limuna, ne uočava se statistički značajna razlika u osetljivosti vrsta *Candida* za srednje vrednosti MFK (tabela 57).

Tabela 57. Poređenje srednjih vrednosti MFK za ulje limuna kod vrsta roda *Candida*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	p= 1.000	p= 1.000	p= 1.000
<i>C. tropicalis</i>	/	p= 1.000	p= 0.517
<i>C. krusei</i>	/	/	p= 1.000

*statistički značajno

Etarska ulja timijana i limuna deluju bez statistički značajne razlike u srednjim vrednostima MFK na četiri vrste roda *Candida*.

5.DISKUSIJA

Protezni stomatitis je oralno oboljenje koje može da utiče na kvalitet života pacijenata. Mnogi koji koriste zubne proteze nisu ni svesni da imaju jednu vrstu oralne kandidoze, koja može dovesti do dugoročnih komplikacija ako se njihov imuni status poremeti.

Studija koju su sprovedi dos Santos i sar. (2010) podržava stav o ulozi proteznog plaka u etiologiji proteznog stomatitisa. Uticaj akumulacije plaka na zubnu protezu treba istaći, jer proteza može da deluje kao rezervoar za patogene mikroorganizme (Sumi i sar., 2002) koji mogu biti umešani u gastrointestinalne infekcije, aspiracione pneumonije i hronične opstruktivne bolesti pluća (Coulthwaite i Verran, 2007).

Učestalost proteznog stomatitisa od 38.8%, koja je zabeležena u ovoj studiji, sa prosečnom starošću pacijenata od 70.5 ± 10.68 godina slična je sa prevalencom proteznog stomatitisa u Grčkoj koja iznosi 39.6%, gde je prosečna starost pacijenata bila 67.7 godina (Kossini, 2011). Istraživanje u Grčkoj je sprovedeno 2009. godine. Slično istraživanje je sprovedeno na Stomatološkom fakultetu u Marmaru (Turska), gde je dobijena učestalost proteznog stomatitisa od 44% (Kulak-Ozkan i sar., 2002). Takođe, sprovedeno je istraživanje i u Portu (Portugalija) gde je dobijena vrednost prevalence proteznog stomatitisa od 45.3%, sa prosečnom starošću pacijenata od 59.8 godina (Figueiral i sar., 2007).

Manje vrednosti prevalence proteznog stomatitisa su zabeležene u Velikoj Britaniji i SAD-u. Istraživanje u Velikoj Britaniji sprovedeno je na Stomatološkom fakultetu u Bristolu, prijavljena je vrednost od 27%, prosečna starost pacijenata je 69.5 godina (Zissis i sar., 2006). U SAD-u je istraživanje sprovedeno 2007. godine i prijavljena je vrednost prevalence proteznog stomatitisa od 25.6% sa prosečnom starošću pacijenata od 59.2 godine (Shulman i sar., 2005).

Manje vrednosti prevalence proteznog stomatitisa u ekonomski razvijenijim zemljama se mogu objasniti boljim programima stomatološke edukacije pacijenata.

Istraživanje pokazuje da se protezni stomatitis sa većom učestalošću javlja kod starijih osoba, s čim se mnogi autori slažu (Jeganathan i sar., 1997; Shulman i sar., 2005; Zissis i sar., 2006), dok mali broj autora ukazuje na manju učestalost proteznog stomatitisa sa starenjem (Figueiral i sar., 2007). Kleinegger i sar. (1996) su pokazali da se intezitet i učestalost proteznog stomatitisa povećava starenjem.

Kada se analizira koja klinička forma je najbrojnija, rezultati studije ukazuju na tip II proteznog stomatitisa, što nije slučaj sa istraživanjima koja su sprovedi Kossini (2011), Kulak-Ozkan i sar. (2002), Figueiral i sar. (2007), gde su najbrojniji pacijenti tipa I proteznog stomatitisa. To se može objasniti izraženijom kliničkom slikom proteznog stomatitisa tipa II, zbog čega se pacijenti obraćaju za pomoć stomatologu.

U analiziranim studijama Kossinia (2011), Kulak-Ozkana i sar. (2002), Figueirala i sar. (2007), najmanje su zastupljeni pacijenti sa tipom III proteznog stomatitisa, što se poklapa sa rezultatima i ove studije.

Prevalenca proteznog stomatitisa i faktori rizika razlikuju se u različitim studijama, uglavnom zbog razlika u metodologiji istraživanja (starost studijske grupe, status zuba studijske grupe, pacijenti stomatološkog fakulteta, institucionalizovani ili neinstitucionalizovani pacijenti, drugačiji metod procene različitih faktora i statističke obrade, subjektivnost klasifikacija).

Prema saznanjima iz stručne literature ova studija je prva koja pravi razliku između proteznog stomatitisa gljivične etiologije i proteznog stomatitisa mehaničke etiologije. Istraživanja su uglavnom usmerena na protezni stomatitis gljivične etiologije.

Emmami i sar. (2008) smatraju da je inflamatorna reakcija u vidu proteznog stomatitisa posledica traume protezom. Shodno tome, zapaljenje zbog traume može da stvori povoljne uslove za bržu infekciju mikroorganizmima koji učestvuju u nastanku proteznog stomatitisa. Istraživanje ukazuje na mali broj pacijenata (15%) koji imaju protezni stomatitis mehaničke etiologije, što se može objasniti time da traumatizovano

tkivo lakše podleže infekciji i protezni stomatitis mehaničke etiologije vrlo brzo prelazi u protezni stomatitis gljivične etiologije.

Prisutnost proteznog stomatitisa gljivične etiologije u ovom istraživanju je statistički značajno veća kod žena, što je u saglasnosti sa većinom istraživanja (Shulman i sar., 2005; Zissis i sar., 2006; Figueiral i sar., 2007). Hormonski faktor i velika incidenca nedostatka gvožđa kod žena može biti odgovorna za ovu nejednakost među polovima (Figueiral i sar., 2007). Pored toga, ova razlika se može objasniti činjenicom da žene češće izrađuju zubne proteze u cilju zbrinjavanja krezubosti i bezubosti i vode više računa o spoljašnjem izgledu.

Pacijenti sa proteznim stomatitisom su uglavnom pušači. Mac Entee i sar. (1998) su primetili značajnu povezanost između korišćenja duvana i proteznog stomatitisa kod Kanađana starijih od 75 godina. Sluhman i sar. (2005) su otkrili vezu između pušača koji puše više od 15 cigareta na dan i proteznog stomatitisa, što potvrđuje i ovo istraživanje. Pacijenati sa proteznim stomatitisom mehaničke i gljivične etiologije konzumiraju više od 15 cigareta na dan, s tim što pacijenati sa proteznim stomatisom mehaničke etiologije konzumiraju veći broj cigareta (24 cigarete/dan). Histološke promene oralne sluzokože izazvane pušenjem, mogu povećati osetljivost tkiva na infekciju *Candida* spp., što je verovatno posledica kombinacije faktora uključujući i suzbijanje aktivnosti oralnih leukocita, promene površine sluzokože, kao posledica dejstva nikotina je i imunosupresija (Soysa i Ellepola, 2005).

Prosečna starost aktuelne proteze u istraživanju je visoka. Starost proteze je vezana za pojavu proteznog stomatitisa (Budtz Jorgensen, 1981). U ovoj studiji pacijenti sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije nose duže proteze od pacijenata sa proteznim stomatitisom mehaničke etiologije, što se može objasniti da kod pacijenata sa starim protezama su često prisutne traume tkiva i slabo izbalansirana okluzija, što utiče na pojavu infekcije (Figueiral i sar., 2007). Higijenske mere se teže sprovode kod starih proteza zbog veće poroznosti baze proteze, što favorizuje kolonizaciju *Candida* (Budtz Jorgensen, 1981).

Trajanje dugovremenog i neprekidnog nošenja proteza je faktor koji doprinosi proteznom stomatitisu (Figueiral i sar., 2007). Zamena zubnih proteza ne utiče na prevenciju oboljenja (Zissis i sar., 2006). Hronična lokalna iritacija povećava osetljivost oralne sluzokože. Relativno mlade osobe koje postanu bezube i nose proteze su podložnije (osetljivije) na nastanak proteznog stomatitisa.

Istraživanje je pokazalo da pacijenti kod kojih je dijagnostikovao protezni stomatitis gljivične etiologije imaju lošiju higijenu zubnih proteza. Međutim, postoje mnogi kontradiktorni rezultati o ovom pitanju. Figueiral i sar. (2007) nisu pronašli vezu između higijene proteze i proteznog stomatitisa, a Freitas i sar. (2008) i Kulak-Ozkan i sar. (2002) su dokazali suprotno. Jeganathan i sar. (1997), ispitujući samo pacijente sa proteznim stomatitisom tip II, pokazali su da je higijena proteza bila bolja kod pacijenata bez proteznog stomatitisa. MacEntee i sar. (1998) su takođe pronašli značajnu vezu između higijene proteze, proteznog stomatitisa, hiperplazija i angularnog hejlitisa. Kulak-Ozkan i sar. (2002) su našli vezu između učestalosti čišćenja proteze i proteznog stomatitisa. Mikkonen i sar. (1984) su pronašli različit stepen higijene zubne proteze kod muškaraca i žena. Evidentno je da često čišćenje proteze ne podrazumeva uvek i efikasno čišćenje, naročito u starijoj populaciji (Kulak-Ozkan i sar., 2002). Smanjena pokretljivost ruke, oštećenje vida, različiti mentalni problemi i nedostatak poznavanja odgovarajućih metoda i tehnika čišćenja zubnih proteza, česti su problemi sa kojima se susreću stariji pacijenti.

Dominantan faktor u nastanku proteznog stomatitisa je kontinuirano nošenje proteze. Ovaj stav je podržan od strane mnogih istraživača (Jeganathan i sar., 1997; Sluhman i sar., 2005; Zissis i sar., 2006; Figueiral i sar., 2007). Iako je etiologija proteznog stomatitisa multifaktorijalna, postoje neki primarni faktori rizika, kao što su trauma izazvana protezom i infekcija *Candida* spp. (Budtz-Jorgensen, 1981). Oba faktora su povezana sa kontinuiranim nošenjem proteze. Neprekidno nošenje proteze izaziva perzistirajuće lokalne traume. U ovoj studiji, loša retencija gornje totalne proteze, koja izaziva povećano pomeranje proteze u funkciji, je češća kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije. Veća prevalenca loše retencije gornje totalne proteze kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije se može objasniti, time da je

protezni stomatitis gljivične etiologije uglavnom II i III stepena zapaljenja koji se karakterišu većim edemom sluzokože i hiperplastičnim promenama, tako da je prisutno lošije naleganje zubne proteze na potporna tkiva, tj, retencija proteze je loša. Kontinuirano nošenje proteze povećava izloženost sluzokože gljivama koje postoje u proteznom plaku (Arendorf i Walker, 1987). Smanjen protok pljuvačke ispod površine proteze dovodi do neadekvatnog samočišćenja i povećanja broja mikroorganizama (Shulman i sar., 2005). Jezik ne može da izvrši svoju funkciju čišćenja (Shulman i sar., 2005), a povišena temperatura ispod proteze povećava broj mikroorganizama (Budtz-Jorgensen, 1981).

Od faktora koji se odnose na funkcionalni kavalitet zubne proteze, osim retencije gornje totalne proteze koja je bila loša kod većine pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije, i vertikalna dimenzija okluzije je kod većine pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije bila smanjena, što je takođe potvrđeno i od strane drugih autora (Figueiral i sar., 2007). Razlike u očuvanosti vertikalne dimenzije okluzije između pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične i mehaničke etiologije se mogu objasniti time da pacijenti sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije nose duže svoje zubne proteze, što dovodi do veće abrazije akrilatih zuba u zubnoj protezi i veće resorpcije alveolarnih grebena što sve zajedno dovodi do smanjenja vertikalne dimenzije okluzije. Gubitak vertikalne dimenzije okluzije može dovesti do nejednake raspodele okluzalnog opterećenja i traumatskih kontakata. Ovi nalazi su česti kod pacijenata koji nose slabo retiniranu protezu dugi niz godina.

Biofilm koji postoji na zubnoj protezi definiše se kao strukturna mikrobiološka zajednica koja je inkorporirana u ekstrapolimerni matriks (Kolenbrander, 2000; Ramage i sar., 2005). Sada se procenjuje stav da značajan deo ljudskih infekcija podrazumeva formiranje biofilma mikroorganizama (Douglas, 2003; Ramage i sar., 2005). Složen i mešovit bakterijsko-gljivični biofilm povećava otpornost na antifungalnu i antibakterijsku terapiju, i služi kao rezervoar infekcije (Chandra i sar., 2001; Ramage i sar., 2005). Adhezija *Candida* je prvi korak u razvoju biofilma i adhezija je pod uticajem karakteristika baze zubne proteze (He i sar., 2006). Veliki broj podataka u stručnoj literaturi opisuje biofilm na površini gleđi (Kolenbrander i sar., 2006), međutim, malo se zna o

mikrobiološkim zajednicama vezanim za mobilnu zubnu protezu. Istraživanja pokazuju da se razlikuje sastav biofima na biotičkim i abiotičkim površinama (Ganguly i sar., 2011). Biofilm *C. albicans* na abiotičkim površinama sastoji se od dve vrste ćelija: ćelija gljiva i filamentoznih ćelija (Ramage i sar., 2006; Finkel i Mitchell, 2011). *In vitro* formiran biofilm sastoji se od bazalnog sloja, koga čine ćelije gljiva od kojih potiču filamentozne ćelije. Ove ćelije gljiva i filamentozne ćelije su ugrađene u gust ekstracelularni matriks (Ramage i sar., 2006; Finkel i Mitchell, 2011). Osnovna komponenta matriksa je β - glukan (Nett i sar., 2007; Finkel i Mitchell, 2011). *In vivo* formiran biofilm ima haotičnu građu koja je prošarana sa gljivama i filamentoznim ćelijama, i ekstracelularni sloj koji sadrži ćelije imunog odgovora domaćina, kao što su neutrofili (Andes i sar., 2004; Schinabeck i sar., 2004).

Biofilm *C. albicans* zubne proteze i oralne sluzokože ima značajan broj bakterijskih i gljivičnih ćelija (Dongari-Bagtzoglou i sar., 2009; Nett i sar., 2010). Nedavna istraživanja pokazuju pravu dimenziju raznovrsnosti mikrobioma u usnoj duplji i biofilma oralne sluzokože (Avila i sar., 2009). Interakcija između *C. albicans*, bakterija i domaćina može da utiče na opstanak *C. albicans* i morfogenezu (Peleg i sar., 2010). Ova interakcija između bakterija i gljiva može da podstakne ili spreči nastanak oboljenja (Morales i Hogan, 2010). Nekoliko studija pokazuje interakciju između *C. albicans* i oralnih bakterija kao što su: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* i *Staphylococcus aureus* (Harriott i Noverr, 2009; Jarosz i sar., 2009; Bamford i sar., 2009; Silverman i sar., 2010; Peters i sar., 2010). *S. mutans* inhibira stvaranje filamentoznih ćelija *C. albicans* preko „quorum-senzornih“ molekula (koji su zaduženi za stimulaciju peptida) (Jarosz i sar., 2009). Nasuprot tome, *S. gordini* podstiče stvaranje filamentoznih formi (Silverman i sar., 2010). Fizička adhezija formiranjem filamentoznih formi *C. albicans* i formiranjem biofilma je rezultat bakterijskih signala (Bamford i sar., 2009). Bakterije mogu da ublaže ili da pojačaju gljivičnu invaziju i virulentnost u biofilmu. U okviru nedavnih studija, koje su otkrile raznovrsnost gljiva u oralnom mikrobiomu (Ghannoum i sar., 2010), ističe se da interakcija između gljiva ima ulogu u nastanku infekcije (Ghannoum i sar., 2010).

Treba naglasiti, da je do sada, koristeći metodu kultura, u prethodnim studijama zabeležen broj od 11 do 30 vrsta bakterija u biofilmu (Kulak i sar., 1997; Koopmans i sar., 1988). U ovim studijama je dokazano prisustvo *Streptococcus species*, *Veillonella parvula*, *Lactobacillus species* i *Bacteroides species*. Danas se rade studije koje na osnovu različitih PCR metoda pokušavaju da otkriju bakterijski sastav biofilma (Paster i sar., 2001; Paster i sar., 2006). Studija Campos i sar. (2008) je dokazala prisustvo 82 vrste bakterija u proteznom biofilmu, da nema značajne razlike u sastavu mikroorganizama na površini nepca i površine proteze i da se razlikuje sastav biofilma zdravih i pacijenata sa proteznim stomatitisom. Ta razlika se ogleda u sastavu *Prevotella* spp. Istraživanje je pokušalo da dokaže prisustvo patogenih vrsta oralnih bakterija kod pacijenata sa proteznim stomatitisom, ali nije uočena nikakva značajnost. Protezni stomatitis gljivične etiologije izgleda ne predstavlja kontributivni faktor za invaziju bakterija.

U aktuelnoj stručnoj literaturi opisani su lokalni i opšti predisponirajući faktori vezani za nastanak proteznog stomatitisa, ali ne postoji dovoljno podataka o faktoru domaćina (npr. imuni sistem) i mikrobiološkom statusu i kako se dešava prelaz od zdravlja do bolesti. Osim toga, formiranje biofilma podrazumeva aktivaciju gena koji su od suštinskog značaja za opstanak i osobine biofilma, kao što su povećana otpornost na ćelije imunog odgovora i antimikrobna jedinjenja (Kolenbrander, 2000; Chandra i sar., 2001; Kumamoto, 2002; Douglas, 2003;).

Standardne tehnike uzorkovanja mikrobiološkog materijala, kao što su brisevi sluzokože nepca, brisevi proteze i ispiranje usta mogu pružiti kvalitativnu informaciju, ali ne mogu dati precizne kvantitativne podatke o mikološkoj flori. Postavlja se pitanje da li se tokom ispiranja usta oslobađaju ćelije iz proteznog plaka koje su čvrsto adherirane za protezu, kada se ispiranje usta vrši sa zubnom protezom u ustima i koliko ćelija plaka ostane na sluzikoži ako se ispiranje usta vrši bez proteze u ustima (Jin i sar., 2005). Proteza je i dalje najznačajniji izvor i zaštitno okruženje za gljivični biofilm. Izvlačenje ćelija gljiva iz proteze brisom je ograničeno (Ramage i sar., 2004). Coco i sar. (2008) su prvi poboljšali tehniku uzorkovanja mikrobiološkog materijala blagim ultrazvukom proteze da bi se dobio tačan kvantitativan i kvalitativan nalaz gljiva. Blagi ultrazvuk od 35 kHz nema uticaja na

vitalnost mikroorganizama (Tunney i sar, 1998). Ova metoda je korišćena u studiji. I rezultati studije se slažu sa rezultatima istraživanja Coco i sar. (2008), da se sa povećanjem stepena zapaljenja statistički značajno povećava broj ćelija gljiva kada je uzorkovanje mikrobiološkog materijala vršeno ultrazvukom, statistička značajnost ne postoji kada je uzorkovanje mikrobiološkog materijala vršeno ispirkom. Coco i sar. (2008) su utvrdili da ultrazvuk pokazuje najmanje 10 puta veći broj kolonija *Candida* od ispirka, dok ova studija pokazuje da skoro 30 puta veći broj kolonija daje ultrazvuk od ispirka. Takođe, Coco i sar. (2008) su ukazali da je ultrazvuk proteza najpreciznija metoda uzorkovanja mikrobiološkog materijala, i da se ova kvantitativna metodologija može koristiti za razlikovanje kolonizacije od infekcije (infekcija podrazumeva više od 50 CFU).

Nije iznenađujuće što je u ovom istraživanju *C. albicans* daleko najviše izolovana gljiva (86.5%), što je u skladu sa ranijim istraživanjima (Coco i sar., 2008; Vanden Abbeele i sar., 2008). Dar – Odeh i Shehabi (2003) su izolovali *C. albicans* kod 73% pacijenata sa proteznim stomatitisom. U drugoj studiji stopa kolonizacije proteze *C. albicans* je bila 67% (Daniluk i sar., 2006). Pored svojih faktora virulencije, *C. albicans* ima sposobnost promene antigene aktivnosti, morfologije kolonija i promene afiniteta za tkiva, što može dovesti do adaptacije ćelija gljiva na loše uslove domaćina (Calderone i Fonzi, 2001). Iako *C. albicans* ostaje dominantna gljiva u razvoju proteznog stomatitisa, nivo zapaljenja ne može se objasniti samo prisustvom ovog oportunističkog mikroorganizma. Drugi faktori su odgovorni za težinu bolesti, kao što su mikološko okruženje, kvantitet ćelija prisutnih gljiva, karakteristike rasta ćelija gljiva. Pored toga, oralna higijena ima važnu ulogu. He i sar. (2006) su primetili da sastav materijala baze proteze utiče na adheziju *Candida* i koje će vrste *Candida* da se adheriraju.

Iako je *C. albicans* i dalje najčešće izolovana vrsta kod pacijenata sa infekcijom, rastuća prevalenca non-*albicans* vrsta *Candida* daje zabrinutost. Kod nas, druga po zastupljenosti je *C. krusei*, pa *C. tropicalis*, pa *C. glabrata* što nije u skladu sa istraživanjem Vanden Abbeele i sar. (2008) koji su takođe, našli najveću učestalost *C. albicans* ali i druge vrste *C. glabrata* i *C. tropicalis*. U drugoj studiji, *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. tropicalis* predstavljaju više od 80% izolata kod kliničkih infekcija (Khosravi

i sar., 2008). U pogledu raspodele učestalosti vrsta *Candida* neke studije su pokazale da je *C. tropicalis* identifikovana kao druga najrasprostranjenija vrsta (de Resende i sar., 2006). Međutim, drugačiji su rezultati studija gde je *C. glabrata* najčešća gljiva nakon *C. albicans* (Webb i sar., 2005; Coco i sar., 2008; Vanden Abbeele i sar., 2008). U istraživanju slične su zastupljenosti *C. glabrata* i *C. tropicalis*, ali u odnosu na njih dominira učestalost *C. krusei* kao druge najzastupljenije vrste kod nas. *C. krusei* kao drugu najrasprostranjeniju vrstu *Candida* kod pacijenata sa proteznim stomatitisom, dobili su i Rabelo i sar. (2011).

Razlike u nalazima između studija verovatno su posledica više faktora, kao što su tehnike uzorkovanja (Webb i sar., 2005; de Resende i sar., 2006; Vanden Abbeele i sar., 2008; Coco i sar., 2008) i diferencijalne podloge koje se koriste za zasejavanje materijala (Pfaller i sar., 1996). Konvencionalna tehnika uzorkovanja, koja se koristi u različitim studijama, obuhvata ispiranje usta - ispirak (Coco i sar., 2008). Iako ova tehnika uzorkovanja pruža adekvatne kvalitativne podatke, postavlja se pitanje da li su sve ćelije biofilma uklonjene ovim postupkom. Da bi se prevazišla ova ograničenja, uzima se bris gingivalne površine baze proteze ili se proteza izlaže ultrazvuku (Coco i sar., 2008; Vanden Abbeele i sar., 2008), što je korišćeno i u ovoj studiji. HROMagar *Candida* je generalno osetljivija od drugih podloga za otkrivanje mešovitih kultura gljiva (Pfaller i sar., 1996). HROMagar *Candida* medijum koji je korišćen u studiji obezbedio je diferencijalno bojenje i istakao kolonijalne morfološke varijacije između *Candida* vrsta, čime se povećava osetljivost detekcije gljiva (Coco B.J. i sar. 2008; Vanden Abbeele i sar., 2008).

Velika razlika učestalosti vrsta je dokumentovana u različitim delovima sveta (Pfaller i sar., 2000; Colombo i sar., 2003;). Nekoliko autora izvestilo je da je *C. tropicalis* jedna od najčešćih non-*albicans* vrsta u Brazilu i Južnoj Americi (Pfaller i sar., 2000; Colombo i sar., 2003). Literaturni podaci ukazuju da se *C. glabrata* nalazi mnogo češće u Severnoj Americi (Pfaller i sar., 2000; Colombo i sar., 2003). Iako ove non-*albicans* vrste su generalno manje virulentne od *C. albicans* (Lyon i Resende, 2007; Pinto i sar., 2008), zabeleženo je da *C. tropicalis* i *C. glabrata* mogu da izazovu fungemije kod ljudi (Goldani i Mario, 2003) i povezane su sa većim mortalitetom od *C. albicans* (Goldani i Mario, 2003).

Dakle, patogenost ovih vrsta nije dovoljno ispitana, pa se mora više pažnje posvetiti ovom problemu.

Udruživanje vrste *Candida* je prisutno u istraživanju *C. albicans* sa *C. glabrata* ili *C. tropicalis* ili sa *C. krusei*, što su pokazala i druga istraživanja (Webb i sar., 2005). Da li te kombinacije gljiva doprinose većoj patogenosti i imaju veze sa stepenom zapaljenja pokušalo se dokazati. Došlo se do zaključka da se sa povećanjem stepena zapaljenja povećava i broj infekcija koje su izazvane sa više vrsta *Candida* (mešovita infekcija). Kod većine pacijenata protezni stomatitis je hroničan proces, koji zahteva duže lečenje, pogotovu ako je došlo do pojave non-*albicans* vrsta *Candida* i formiranja mešovitog biofilma (Martinez i sar., 2002). Nekoliko faktora virulencije je karakteristično za non-*albicans* vrste kao što su: adhezija i kolonizacija različitih podloga, formiranje mešovitog biofilma, lučenje degradacionih enzima i razvoj rezistencije na lekove (Martinez i sar., 2002; Paulitsch i sar., 2009). Složene interakcije između četiri vrste *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) nisu dobro definisane, ali nalazi iz studije sugerišu na sinergistički odnos ovih kombinacija *Candida* vrsta u povećanju patogenog potencijala i lakšoj pojavi infekcije.

Dejstvo etarskih ulja i njihovih komponenti na *Candida* spp. je bio predmet istraživanja mnogih *in vitro* i *in vivo* studija (Giordani i sar., 2004; Tamperi i sar., 2005; Duarte i sar., 2005; Pinto i sar., 2006; He i sar., 2007; Palmeira-de Oliveira i sar., 2009).

Jedno od najopsežnijih istraživanja je sproveo Hammer i sar. (1999). Oni su ispitivali antibakterijsku i antifungalnu aktivnost 37 različitih etarskih ulja pomoću mikrodilucione metode i agar difuzione disk metode. Utvrdili su da ulja timijana imaju najnižu MIK (0,03%) na *C. albicans*. MIK za timijan u studiji je nešto viša i iznosi 0.035%. Poređenje podataka dobijenih u ranijim studijama je problematično. Prvo, sastav biljnih ulja i ekstrakata varira u zavisnosti od lokalnih klimatskih i ekoloških uslova (Hammer i sar., 1999). Drugo, rezultati zavise od metoda koji se koristi za procenu antibakterijske i antifungalne aktivnosti.

Istraživanje Warnike i sar. (2009) je pokazalo najveću efikasnost ulja timijana, limuna, limunove trave i cimeta na sojeve *Candida* izolovane iz usne duplje. Oni su koristili difuzionu-disk metodu za određivanje efikasnosti etarskih ulja, gde veličina inhibitorne zone zavisi od rastvorljivosti i difuzionih karakteristika supstance koja se testira.

U istraživanju Omrana i sar. (2010) ispitivana je antifungalna aktivnost ulja timijana, metvice i limuna mikrodilucionom metodom. Dobijeni rezultati pokazuju da ulje timijana ima najjači fungicidni efekat, a dobijena inhibitorna koncentracija timijana je 2 mg/ml (0.02%). Rezultati pokazuju nešto više MIK, i ulje limuna je efikasnije od ulja timijana. U Omranovom (2010) istraživanju najosetljiviji je soj *C. glabrata*, pa zatim *C. albicans* pa *C. krusei*, kao i u studiji najosetljivija je *C. glabrata* pa *C. krusei*, pa *C. albicans*. Razlike u osetljivosti sojeva mogu nastati zbog različitog porekla sojeva *Candida*. Omran i sar. (2010) su uzimali izolate iz vulvovaginalne regije. Mogu postojati i genske razlike između standardnih i kliničkih sojeva *Candida* koje mogu usloviti ova neslaganja (Godoy i sar., 2003; Devkatte i sar., 2005). Uticaj, takođe, mogu imati vlažnost i temperatura vazduha, jer utiču na jedinjenja etarskih ulja a samim tim i na njihovu antikandidnu aktivnost.

U studiji Živković i sar. (2013), potvrđeno je dejstvo ulja timijana na kliničke izolate *Candida* izolovanih kod pacijenata sa proteznom stomatitisom. Sojevi *C. albicans* pokazali su veću osetljivost u odnosu na *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. tropicalis*.

U studiji Carvalhinho i sar. (2012), gde se pratila osetljivost sojeva *Candida* izolovanih iz usta pacijenata sa ortodontskim aparatima na etarska ulja (cimet, limun, mandarina, nana, lovor, ružmarin, eukaliptus), nejefikasnije je ulje cimeta.

Efikasnost etarskog ulja limuna je potvrđena u istraživanjima Devkatte i sar. (2005) i Hammera i sar. (1999), (što je dokazano i u ovoj studiji). Razlike koje se dobijaju kod ispitivanja ulja limuna mogu nastati zato što se u nekim istraživanjima koristi ulje od celog ploda, a u nekim ne. Ulje limuna od celog ploda je efikasnije, jer sadrži više kiselih komponenti, koje povećavaju antifungalnu aktivnost (Devkatte i sar., 2005).

Ulje čajnog drveta je dosta istraživano i dokazano je njegovo antibakterijsko i antifungalno dejstvo. Jedno od najopsežnijih istraživanja sprovedi su Oliva i sar. (2003) sa preko 115 sojeva, kliničkih izolata i ATCC laboratorijskih sojeva. Njihove MIK ulja čajnog drveta za *C. albicans* i *C. glabrata* su niže i iznose 0.125 %, što se može objasniti različitim poreklom ispitivanih sojeva.

Treba naglasiti da postoje značajne teškoće da se uporede rezultati sa rezultatima drugih autora zbog različitih *in vitro* testova koji se koriste za određivanje antifungalne aktivnosti, kao i zbog varijacija u osetljivosti izolata i ispitivanih sojeva. Zbog toga je u ovom istraživanju korišćen CLSI metod (2008), koji je zvanični referenti metod za određivanje antifungalne (antibakterijske) aktivnosti.

Nove terapijske strategije u rešavanju problema proteznog stomatitisa gljivične etiologije zasnivaju se na korišćenju prirodnih proizvoda u sastavu rastvora za ispiranje usta ili različitih antimikrobnih gelova. Zahvaljujući svom fungistatičkom i fungicidnom dejstvu, etarska ulja i njihove komponente obećavaju kao terapijska sredstva u lečenju oralnih infekcija. Dalja istraživanja treba usmeriti ka proučavanju potencijalne netolerancije i/ili toksičnosti ovih jedinjenja.

Dijagnostički protokol koji se predlaže obuhvata:

1. klinički pregled, klasifikacija proteznog stomatitisa
2. uzorkovanje mikrobiološkog materijala brisom gingivalne površine zubne proteze ili ultrazvukom proteze. Pre uzorkovanja mikrobiološkog materijala ne smeju se sprovoditi higijenske mere zubne proteze najmanje 3 h.
3. mikrobiološki materijal se mora transportovati u mikrobiološku laboratoriju u najkraćem vremenu (do sat vremena od momenta uzorkovanja mikrobiološkog materijala).
4. Obrada materijala standardnim mikrobiološkim tehnikama.
5. U zavisnosti od toga da li je dokazano prisustvo gljiva u uzrokovanom materijalu potrebno je sprovesti terapiju koja bi podrazumevala:

- Adekvatnu higijenu zubne proteze (**Mehaničko čišćenje** zubne proteze adekvatnim pastama i četkicama. Treba koristiti meke najlonske četkice dovoljno male da dopru unutar svih područja proteznih površina. Ultrazvučno čišćenje je efektivno, ali nije široko u upotrebi, jer zahteva aparaturu. Pored ultrazvučnog čišćenja zubnih proteza, čišćenje se može sprovesti i mikrotalasima. Preporučuje se nabavka ovih aparata u staračkim domovima i bolnicama. Nova komponenta komercijalnih čistača za proteze je tanak sloj silikon-polimera koji obuhvata sve površine proteze i na koji oralne bakterije ne mogu da se adheriraju, efikasan je i koristan. **Hemijsko čišćenje** potapanjem zubne proteze u dezinfekcione rastvore (komercijalni rastvori, natrijum-hipohlorit, hlorheksidin, rastvor sa etarskim uljima)
- Skidanje zubne proteze preko noći
- Premazivanje obolele sluzokože gelom na bazi etarskih ulja
- Korišćenje antimikotičnih lekova (nistatin, amfotericin B, mikonazol, flukonazol)
- U slučaju upornih infekcija koje ne reaguju na preporučenu terapiju uraditi podlaganje ili izraditi nove zubne proteze.

6. Obavezni kontrolni pregledi na 6 meseci.

Pacijentima treba dati savete, demonstrirati tehnike pranja, ali isto tako uputstva priložiti i u pisanoj formi u vidu brošura, kako bi efekat bio još bolji. Kontrola pravilnog čišćenja i održavanja proteza najznačajnija je mera u prevenciji proteznog stomatitisa. Da bi se održali terapijski efekti, potrebni su pregledi na kojima se vrši kontrola količine proteznog plaka (plak indikatori) i remotivacija pacijenta za održavanje oralne higijene.

6. ZAKLJUČCI

1. Protezni stomatitis je najčešće oboljenje usne duplje kod pacijenata koji koriste totalne zubne proteze. Najzastupljenija je klinička forma sa II stepenom zapaljenja (makularni eritem bez hiperplazije – generalizovano zapaljenje).
2. Protezni stomatitis gljivične etiologije je učestaliji u odnosu na protezni stomatitis mehaničke etiologije.
3. Pol i higijena zubne proteze su značajni prediktori tipa proteznog stomatitisa. Povećanje dužine nošenja proteze ima za posledicu promene u funkcionalnim karakteristikama proteze (loša retencija proteze, smanjena verikalna dimenzija okluzije), što povećava rizik za nastanak proteznog stomatitisa gljivične etiologije.
4. Ne postoji korelacija između prisustva oralnih patogenih bakterija i proteznog stomatitisa.
5. Najefikasnija metoda za uzorkovanje mikrobiološkog materijala je ultrazvuk proteze. Uzorak dobijen izlaganjem zubne proteze blagom ultrazvuku omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu mikrobiološkog materijala. Tako dobijen uzorak omogućava adekvatnu mikrobiološku identifikaciju, na osnovu koje se može dobiti podatak o eventualnim biološkim uzročnicima stomatitisa. Zadovoljavajuće rezultate, kao i jednostavniji način primene omogućava bris zubne proteze.

C. albicans je dominantna vrsta kod pacijenata sa proteznim stomatitisom gljivične etiologije. Uglavnom se nalazi samostalno, ali može se udružiti sa drugim vrstama roda (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*). Sa povećanjem stepena zapaljenja povećava se i kvantitativna zastupljenost gljiva roda *Candida*.
6. Etarska ulja limuna, timijana, grejpfruta, cimeta i čajnog drveta pokazala su antimikotičnu aktivnost. Iz tog razloga njihova upotreba može biti alternativa antimikoticima, pri čemu se oni mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji sa antimikoticima.
7. Predloženi dijagnostički protokol podrazumeva:

- A) klinički pregled, klasifikacija proteznog stomatitisa
- B) uzorkovanje mikrobiološkog materijala brisom gingivalne površine zubne proteze ili ultrazvukom proteze. Pre uzorkovanja mikrobiološkog materijala ne smeju se sprovoditi higijenske mere zubne proteze najmanje 3 h
- C) mikrobiološki materijal se mora transportovati u mikrobiološku laboratoriju u najkraćem vremenu (do sat vremena od momenta uzorkovanja mikrobiološkog materijala)
- D) obrada uzoraka standardnim mikrobiološkim tehnikama
- E) u zavisnosti od toga da li je dokazano prisustvo gljiva u uzorkovanom materijalu potrebno je sprovesti terapiju, koja podrazumeva:
- Adekvatnu higijenu zubne proteze (**mehaničko čišćenje** zubne proteze adekvatnim pastama i četkicama, **hemijsko čišćenje** potapanjem zubne proteze u dezinfekcione rastvore (komercijalni rastvori, natrijum-hipohlorit, hlorheksidin, rastvor sa etarskim uljima)
 - Skidanje zubne proteze preko noći
 - Premazivanje obolele sluzokože gelom na bazi etarskih ulja
 - Korišćenje antimikotičnih lekova (nistatin, amfotericin B, mikonazol, flukonazol)
 - U slučaju upornih infekcija koje ne reaguju na preporučenu terapiju uraditi podlaganje ili izraditi nove zubne proteze.

7. LITERATURA

Agarwa V, Lal P, Pruthi V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. Mycopathologia. 2008;165: 13-19.

Ahmad N, Alam MK, Shehbaz A, Khan A, Mannan A, Hakim SR, Bisht D, Owais M. Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. J. Drug Target. 2005; 13:555-61.

Allison RT, Douglas WH. Micro- colonization of the denture-fitting surface by *Candida albicans*. J. Dent. 1973; 1: 198-201.

Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. Infect Immun. 2004; 72: 6023–6031.

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. J Oral Rehabil. 1987; 14: 217–227.

Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. DNA Cell Biol. 2009; 28 : 405–411.

Avon SL, Goulet JP, Deslauriers N. Removable acrylic resin disk as a sampling system for the study of dental biofilms in vivo. J. of Prosth. Dentistry. 2007; 97: 32-38.

Bagg J, Petrina Sweeney M, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D. High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. Palliat Med. 2003; 17:477-81.

Bagg J, Jackson MS, Petrina Sweeney M, Ramage G, Davies AN. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. Oral Oncol. 2006; 42: 487-92.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. Food Chem. Toxicol. 2008; 46: 446-75.

Bamford CV, d'Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. Infect Immun. 2009; 77: 3696–3704.

Baser K, Demitri F. Chemistry of essential oils. In *Flavours and Fragrances - chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Press. Berlin. 2007: 43-86.

- Beneyto-Martinez, Lopez-Jornet P, Velandrino- Nicolas A, Jornet-Garsia V.** Use of antifungal agents for oral candidiasis: results of a national survey. *Int. J. Dent. Hyg.* 2010; 8: 47-52.
- Bennis, S.; Chami, F.; Chami, N.; Bouchikhi, T.; Remmal, A.** Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 38: 454-8.
- Bilhan H, Sulun T, Erkoş G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O.** The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. *Clin. Oral Investig.* 2009; 13: 363-8.
- Blankenship JR, Mitchell AP.** How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006; 9: 588-594.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E.** Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric.Food. Chem.* 2007; 55: 7879-85.
- Braga PC, Alfieri M, Culici M, Dal Sasso M.** Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses.* 2007; 50: 502-6.
- Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M.** Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 31: 472-7.
- Branting C, Sund ML, Linder LE.** The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro. *Arch. Oral. Biol.* 1989; 34, 347-353.
- Brown MR, Gilbert P.** Sensitivity of antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol.* 1993; 74: 87s-97s.
- Budtz-Jorgensen E, Bertram U.** (1970b) Denture stomatitis II: The effect of antifungal and prosthetic treatment. *Acta Odontologica Scandinavica.* 28: 283-283.
- Budtz-Jorgensen E.** Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol.* 1981; 10: 65–80.
- Burt S.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94: 223-53.
- Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, Van Der Mei HC.** Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J. of Dental Research.* 2010; 89: 657-665.

- Calderone RA, Fonzi WA.** Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9: 327–335.
- Campos MS, Marchini L, Bernardes LAS, Paulino LC, Nobrega FG.** Biofilm microbial communities of denture stomatitis. Or. microbiol. and immunol. 2008; 23(5): 419-424.
- Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindos G.** Antifungal agents: mode of action in yeast cells. Rev. Esp. Quimioter. 2006; 19: 130-9.
- Carson CF, Riley TV.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Appl. Bacteriol. 1995; 78: 264-9.
- Catalan A, Pacheco JG, Martinez A, Mondaca MA.** *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2008; 105: 327-32.
- Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A.** Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. Braz. J. Infect. Dis. 2004; 8: 217-26.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD et al.** Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. J Dent Res. 2001; 80: 903–908.
- Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, et al.** Modification of surface properties of biomaterials the ability of *Candida albicans* to form biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71: 8795-8801.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute:** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. In *CLSI document M27-A3*, Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2008.
- Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G.** Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 377–383.
- Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, et al.** Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003; 22: 470–474.
- Cosentino S, Tuberioso CI, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F.** *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Lett. Appl. Microbiol. 1999; 29: 130-5.

Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. Br J Biomed Sci. 2007; 64: 180–189.

Cox, S. D.; Mann, C. M.; Markham, J. L.; Bell, H. C.; Gustafson, J. E.; Warmington, J. R.; Wyllie, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J.Appl. Microbiol. 2000; 88: 170-5.

Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Appl.Microbiol. 2001; 91: 492-7.

Crvalho S, Costa AM, Koeljo AK, Martins E, Sampajo A. Susceptibilities of *Candida albicans* Mouth Isolates to Antifungal Agents, Essentials Oils and Mouth Rinses. Micopathologia, 2012;174(1): 69-76.

Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. Adv Med Sci. 2006; 51(suppl 1): 77–80.

Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. Mycoses. 2003; 46: 187–191.

Darwazeh AMG, Lamey PJ, Samaranayake LP, Mac-Farlane TW, Fisher BM, MacRury SM. et al. The relationship between colonisation, secretor status and in vitro adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from diabetics. J Med Microbiol. 1990; 33: 43–49.

da Silva Cde B, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. Braz. J. Infect. Dis. 2008; 12: 63-6.

da Silva B, Acosta EJ, Pinto LR, Spolidorio DM, Almeida RS. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. Mycoses. 2011; 54: e 712-717.

das Neves J, Pinto E, Amaral M, Bahia M. Antifungal activity of a gel containing *Thymus vulgaris* essential oil against *Candida* species commonly involved in vulvovaginal candidosis. Pharm. Biol. 2009; 47: 151-3.

de Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Souza-Gugelmin MCM. Effect of Chlorhexidine on denture biofilm accumulation. J. of Prosthodontics. 2012; 21: 2-6.

de Resende MA, de Sousa LV, de Oliveira RC, Koga-Ito CY, Lyon JP. Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. Mycopathologia. 2006; 162: 39–44.

- Devkotte AN, Zore GB, Karuppayil SM.** Potential of plant oil inhibition of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research*. 2005; 5: 867-73.
- Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK.** Health benefits of saliva: a review. *J Dent*. 2005; 33: 223-33.
- Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J.** Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS ONE*. 2009; 4: 7967.
- Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S.** Noninsulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 1996; 25: 411–415.
- dos Santos CM, Hilgert JB, Pereira Padilha DM, Hugo F.** Denture stomatitis and its risk indicators in south Brazilian older adults. *Gerodontology*. 2010; 27(2): 134–140.
- Douglas LJ.** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003; 11: 30–36.
- Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C.** Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*. 2005; 97: 305-11.
- Ellepola AN, Samaranayake LP.** Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral. Dis*. 2001; 7: 11-17.
- Emami E, de Grandmont P, Rompré PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS.** Favoring Trauma as an Etiological Factor in Denture Stomatitis. *J. Dent. Res*. 2008; 87(5): 440-4.
- Evans W.** *Pharmacognosy*. 15th ed.; Saunders: London, 2002.
- EUCAST** Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeast, 2012.
- Farag RS, Shalaby AS, El-Baroty GA, Ibrahim NA, Ali MA, Hassan EM.** Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytother. Res*. 2004; 18: 30-5.
- Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C.** Denture-related stomatitis: Identification of aetiological and predisposing factors—a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007; 34: 448–455.
- Finkel JS, Mitchell AP.** Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 109–118.

Freitas JB, Gomez RS, de Abreu MHNG et al. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. J Oral Rehabil. 2008; 35: 370–374.

Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilm of *Candida albicans*. Curr. Opin Microbiol. 2011; 14: 380-385.

Gasparoto TH, Dionisio TJ, de Olivera CE, Porto VC, Gelani V, Santos CF, Campanelli AP, Lara VS. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. J. of Medical Microbiology. 2009; 58: 959-962.

Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet PM. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. PLoS Pathog. 2010; 6: 1000713.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J. Of Prosthodontics. 2011; 20(4): 251-260.

Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. Phytother. Res. 2004; 18: 990-5.

Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. Phytother. Res. 2006; 20: 58-61.

Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American Hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. 2003; 98:401-5.

Goldani LZ, Mário PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. J Infect. 2003; 46: 155–160.

Gonsalves WC, Wrightson AS, Henry RG. Common oral conditions in older persons. Am. Fam. Physician. 2001; 78: 845-52.

Hammer KA, Carson C.F, Riley TV. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. J. Antimicrob. Chemother. 1998; 42: 591-5.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 1999; 86: 985-90.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J. Appl. Microbiol. 2003; 95: 853-60.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antimicrob. Chemother. 2004; 53: 1081-5.

Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 3914–3922.

He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. Mycoses. 2006; 49: 80–84.

He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. Mycopathologia. 2007; 163: 137-43.

Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine. 2008; 15: 639-52.

Hsu LY, minah GE, Peterson DE, Wingard JR, Merz WG, Altomonte V, Tylenda CA. Coaggregation of oral *Candida* isolates with bacteria from bone marrow transplant recipients. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2621-2626.

Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. Microbiol. Immunol. 2001; 45: 201-8.

International Organization for Standardisation, Aromatic Natural Raw. In Geneve, Switzerland, 1997.

International Organization for Standardisation, Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). In ISO 4730:2004, Geneve, Switzerland, 2004.

Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. AIDS. 1998; 12: 1033-7.

Janković LJ, Čakić S, Leković V, Dimitrijević B, Hadži-Mihajlović M, Pucar A. Oralna medicina-praktikum. Zavod za udžbenike, Beograd. 2007.

Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. Streptococcus mutans competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation Eukaryot Cell. 2009; 8: 1658–1664.

Jeganathan S, Payne JA, Thean HPY. Denture stomatitis in an elderly edentulous Asian population. *J Oral Rehabil.* 1997; 24: 468–472.

Jin Y, Samaranayake YH, Yip HK, Samaranayake LP. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 2005; 160: 191–200.

Khosravi AR, Yarahmadi S, Baiat M, Shokri H, Pourkabireh M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabeter mellitus. *J Mycol Med.* 2008; 18: 83–88.

Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2246–2254.

Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors goveming adherence of *Candida* species to plastic surfacws. *Infect. Immun.* 1985; 50: 97-101.

Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.*2000; 54: 413–437.

Kolembrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH et al. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 2006; 42: 47–79.

Koopmans AS, Kippuw N, De Graaff J. Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. *J Dent Res.* 1988; 67: 1246–1250.

Kossini E. The prevalence of denture stomatitis and its predisposing conditions in an older Greek population. *Gerodontology.*2011; 28: 85-90.

Kremery Jr VV, Krupova I, Mateieka F, Jurga L, Suleova M, Spanik S, Kunova A, Novotny J. *Candida glabrata* fungemia in a tertiary cancer institution in Slovakia. *J. Infect. Chemother.* 1999; 5: 163-167.

Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil.* 1997; 24: 788–790.

Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral RehabiL.* 2002; 29: 300–304.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2002; 5: 608–611.

Lai F, Loy G, Manconi M, Manca M L, Fadda AM. *Artemisia arborescens* L essential oil loaded beads: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8: E67.

Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 2001; 91: 453-62.

Li L, redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. J. Dent. Res. 2007; 86: 204-215.

Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. J. Dent. Res. 1999; 78: 857–868.

Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. J. Agric. Food. Chem. 2007; 55: 4348-56.

Lyon JP, Resende MA. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. Mycoses, 2007; 50: 21–24.

Machado AL, Komiyama EY, Santos SS, Jorge AO, Brighenti FL, Koga-Ito CY. In vitro adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis. J. Appl. Oral. Sci. (n press, accepted 2011).

MacEntee MI, Glick N, Stolar E. Age, gender, dentures and oral mucosal disorders. Oral Dis. 1998; 4: 32–36.

Mann CM, Markham JL. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. J. Appl. Microbiol. 1998; 84: 538-44.

Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, Preuss HG. Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. Mol. Cell Biochem. 2001; 228: 111-7.

Manou I, Bouillard L, Devleeschouwer M.J, Barel AO. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. J. Appl. Microbiol. 1998; 84: 368-76.

Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus–infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3135–3139.

Mikkonen M, Nyyssonen V, Paunio I et al. Oral hygiene, dental visits and age of denture for prevalence of denture stomatitis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1984; 12: 402–405.

Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog.* 2010; 6:e 1000886.

Nalbant AD, Kalkanci A, Filiz B, Kustimur S. Effectiveness of different cleaning agents against the colonization of *Candida* spp and the in vitro detection of the adherence of these yeast cells to denture acrylic surfaces. *Yonsei. Med. J.* 2008; 4: 647-654.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 510–520.

Nett J, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an *in vivo* *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun.* 2010; 78: 3650–3659.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999; 12: 153–9.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology.* 2010; 98: 15-25.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of *in vitro* and *in vivo* methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999;12: 153.

Nzeako B, Bushra A. Comparative studies of antimicotic potential of thyme and clove oil extracts with antifungal antibiotics on *Candida albicans*. *Afr. J. Biotechnol.* 2008; 7: 1612-19.

Odds FC. *Candida* and candidosis. A review and bibliography (2 edition). London: Bailliere Tindall, 1988: 42-59.

Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontologica Scandinavica.* 1990; 48(1): 71-74.

Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Aureli P, Ferrini AM. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett. Appl. Microbial.* 2003; 37(2): 185-7.

Oliver RJ, Pemberton MN, Theaker ED. Miconazole oral gel and drug interactions. *British Dental J.* 2004; 196: 529-531.

Omran SM, Esmaeilzadeh S, Rahmani Z. Laboratory study of anticandidal activity of thyme, pennyroyal and lemon essential oils by micro dilution method. Jundishapur J. of Microbiology. 2010; 3(4): 161-167.

Orafidiya LO, Oyedele AO, Shittu AO, Elujoba AA. The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. Int. J. Pharm. 2001; 224: 177-83.

Paillaud E, Merlier I, Dupeyron C, Scherman E, Poupon J, Bories PN. Oral candidiasis and nutritional deficiencies in elderly hospitalised patients. British J. of Nutrition. 2004; 92: 861-867.

Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz JA, Rodrigues AG. Anti-Candida Activity of Essential Oils. Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2009; 9: 1292-1305.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontol 2000. 2006; 42: 80–87.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001; 183: 3770–3783.

Pauli, A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. Med. Res. Rev. 2006; 26: 223-68.

Paulitsch AH, Willinger B, Zsalcz B, Stabentheiner E, Marth E, Buzina W. In-vivo *Candida* biofilms in scanning electron microscopy. Med Mycol. 2009; 47: 690–696.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nat Rev Microbiol. 2010; 8: 340–349.

Pereira – Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of Candida – associated denture stomatitis: New insights (review). J. Appl. Oral Sci. 2008; 16(2): 86-94.

Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. J. Prosthet. Dent. 2005; 93: 288-293.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* dual-species biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010; 59: 493–503.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of Chromagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol. 1996; 34: 58–61.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A. et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 747–751.

Pina-Vaz C, Goncalves Rodrigues A, Pinto E, Costa-de- Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, Goncalves MJ, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2004; 18: 73-8.

Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Goncalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinezde- Oliveira, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. J.Med. Microbiol. 2006; 55: 1367-73.

Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. J Oral Pathol Med. 2008; 37: 587–592.

Rabelo GD, Noborikawa E, Siqueira CS, da Silveira FRX, Lotufo MA. Detection of single and mixed colonization of *Candida* species in patients with denture stomatitis. Braz J Oral Sci. 2011; 10 (3): 184-188.

Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. J Dent. 1998; 26: 577-83.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 98: 53-9.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. Eukaryotic Cell. 2005; 4: 633–638.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res. 2006; 6: 979–986.

Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging germans. Community Dentistry and Oral Epidemiology. 2000; 28(5): 390-398.

Ribeiro DG, Pavarina AC, Giampaolo ET et al. Effect of oral hygiene education and motivation on removable partial denture wearers: longitudinal study. *Gerodontology*. 2009; 26: 150–156.

Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, MacHado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Prevalence of *Candida* spp. associated with bacteria species on complete dentures. *Gerodontology*. 2012; 29: 203-208.

Rios, J L, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J.Ethnopharmacol*. 1988; 23: 127-49.

Rosato A, Vitali C, Gallo D, Balenzano L, Mallamaci R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. 2008; 15: 635-38.

Salgueiro LR, Cavaleiro C, Pinto E, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Palmeira A, Tavares C, Costa-de-Oliveira S, Goncalves MJ, Martinez-de-Oliveira J. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. *Planta Med*. 2003; 69: 871-4.

Salgueiro L, Pinto E, Gonçalves MJ, Costa I, Palmeira A, Cavaleiro C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Martinez-de-Oliveira A. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus capitellatus* against *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte strains. *Flavour Fragr. J.* 2006; 21: 749-53.

Salerno C, pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal*. 2011; 16(2): e139-43.

Samaranayake LP, Lamb AB, Lamey PJ, MacFarlane TW. Oral carriage of *Candida* species and coliforms in patients with burning mouth syndrome. *J.of Oral Path.and Med*. 1989; 18: 233-235.

Samaranayake LP, Macfarlane TW, Darwazeh AMG, Lamey PJ, Fisher BM, Macrury SM, Maccuish AC. The relationship between colonisation, secretor status and in-vitro adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from diabetics. *Journal of Medical Microbiology*. 1990; 33: 43-49.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida crusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J. Med. Microbiol*. 1994; 41: 295-310.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiosis in animal models. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14: 398-429.

Sanchez ME, Turina AV, Garcia DA, Nolan MV, Perillo MA. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2004; 34: 77-86.

Sanita PV, Pavarina AK, Dampaolo JT, Montenegro Silva M, de Oliveira, Mima EG, Ribeiro DG, Vergani CE. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Or. Surg.Or.med.Or. Path. Or. Radiol*. 2011;111(6): 726-33.

Schinabeck MK, Long LA, Hossain MA, Chandra J, Mukherjee PK, Mohamed S, Ghannoum MA. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 1727–1732.

Scorzoni L, Benaducci T, Almeida A, Silva D, Bolzani V, Mendes-Giannini M. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*. 2007; 28: 25-34.

Scully, Crispian. Oral and maxillofacial medicine : the basis of diagnosis and treatment (2nd ed. ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone. 2008: 201–203.

Sheiham A, Steele JG, Marcenes W, Tsakos G, Finch S, Walls AWG. Prevalence of impacts of dental and oral disorders and their effects on eating among older people: a national survey in Great Britain. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 2001; 29: 195-203.

Shin S, Pyun MS. Anti-Candida effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytother. Res*. 2004; 18: 827-30.

Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34: 340–346.

Silverman RJ, Nobbs AH, Vickerman MM, Barbour ME, Jenkinson HF. Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species communities. *Infect Immun*, 2010; 78: 4644–4652.

Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent.* 2001; 29: 197-204.

Soll DR, Lockhart SR, Zhao R. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2003; 2: 390-397.

Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. *Oral Oncol.* 2004; 40: 971–978.

Soysa NS, Ellepola AN. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral Dis.* 2005; 11: 268–273.

Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet Med.* 2006; 23: 455–459.

Strajnić LJ, Đokić M, Vučinić P. Savremene metode i sredstva za dezinfekciju mobilnih zubnih proteza i njihov značaj kod starije populacije. *Med pregl.* 2011; 64: 497-502.

Suhr KI, Nielsen PV. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 94: 665-74.

Sumi Y, Miura H, Sunakawa M et al. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Gerodontology.* 2002; 19: 25–29.

Sun S, Gao Y, Ling X, Lou H. The combination effects of phenolic compounds and fluconazole on the formation of ergosterol in *Candida albicans* determined by high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2005; 336: 39-45.

Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL, Morelli I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia.* 2005; 159: 339-45.

Tanida T, Ueta E, Tobiume A, Hamada T, Rao F, Osaki T. Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30: 328-35.

Tavares CB, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Pinto E, Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Palmeira A, Martinez-de-Oliveira J. The fungicidal activity of eugenol on *Candida* spp results from a primary lesion of the cell membrane. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003; 9: 89.

Thompson GR, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandesen J, Redding SW. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radhol. Edodod. 2010; 109: 488-459.

Tournu H, Van Dijck P. Candida biofilms and the host: Models and new concepts for eradication. Int. J. of Microbiol. 2012; 845352.

Tunney MM, Patrick S, Gorman SP et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. J Bone Joint Surg Br. 1998; 80: 568–572.

Uzunović-Kamberović S, Zorman T, Berce I, Herman L, Smole Možina S. Comparison of the frequency and the occurrence of antimicrobial resistance among *C. jejuni* and *C. coli* isolated from human infections, retail poultry meat and poultry in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. Med Glas. 2009; 6:173-80.

Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira- Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. J. of Dentristry. 2013; 41: 420- 427.

Valerio HM, Weikert-Oliveira RC, Resende MA. Differentiation of Candida species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39: 174- 178.

Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. Gerodontology. 2008; 25: 222–228.

Vazquez JA, Zawawi AA. Efficacy of alcohol-based and alcohol- free melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. HIV Clin. Trials. 2002; 3: 379-85.

Warnike PH, Becker ST, Podschun R, Siwananthan S, Springer IN, Russo PAJ, Wiltfang J. The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2009; 37 (7): 392–39.

Webb BC, Thomas CJ, Harty DWS, Willcox MDP. Candida – associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part I. Factors influencing distribution of candida species in the oral cavity. Australian Dental J. 1998; 43 (1): 45-50.

Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. Gerodontology. 2005; 22: 168–176.

Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *British Dental Journal*. 1998; 185(8): 380-384.

Zissis A, Yannikakis S, Harrison A. A joint clinicostatistical study on the prevalence of Denture Stomatitis. *Int Dent J*. 2006; 19: 621–625.

Živković R, Perić, M, Arsić-Arsenijević V, Martinović Ž, Pekmezović M, Stojić Ž, Raičković V, Đurišić S. Susceptibility profile of *Candida spp.* isolated from humans and dogs with stomatitis to the essential oil of *thimus vulgaris*. *Acta veterinaria*. 2013; 63, 707-715.

8. PRILOZI

Prilog 1:

INFORMACIJE ZA PACIJENTA

Vi ste korisnik mobilne zubne proteze koja Vam olakšava ishranu, govor i poboljšava ukupni estetski izgled lica. Kao i prirodni zubi i proteza zahteva održavanje higijene, redovno pranje i pravilno korišćenje.

Prisustvo zubne proteze, kao stranog tela povećava broj mikroorganizama u usnoj duplji, posebno u prostoru između proteze i sluzokože. Povećanje broja mikroorganizama može da izazove oboljenje protezni stomatitis. **Protezni stomatitis** predstavlja zapaljenje sluzokože usne duplje, najčešće locirano na površinama sluzokože koje pokriva proteza. Promene u ustima se karakterišu različitim stepenom inflamacije sluzokože. Osim crvenila i naslaga čiji izgled može i da uznemiri pacijenta, drugi simptomi (svrab, bol, promena ukusa) najčešće nisu prisutni. Ukoliko se ne leči infekcija se može proširiti na druge organe, izazivajući:

- ✓ Zapaljenje pluća
- ✓ Bakterijski endokarditis
- ✓ Infekcije organa za varenje.

Zbog svega navedenog, neophodno je obratiti pažnju na oralnu higijenu, posebno na higijenu zubne proteze na kojoj se nakupljaju naslage bakterija, gljiva, kamenca i hrane. Higijenske mere su u obliku:

- ✓ Pranje proteze posle svakog jela (najmanje dva puta dnevno) četkicom i posebnom pastom za pranje proteza
- ✓ 1-2 puta sedmično potopiti protezu u dezinficijens za proteze ili koristiti šumeće tablete za održavanje proteza (kupuju se u bolje snabdevenim apotekama)
- ✓ Zubne proteze se van usta uvek drže u destilovanoj vodi
- ✓ Zubne proteze se obavezno skidaju u toku noći
- ✓ Neophodno je jednom godišnje dolaziti kod stomatologa na kontrolni pregled
- ✓ Starost zubne proteze ne bi trebala da bude veća od 5 godina.

Na Klinici za stomatološku protetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu, bi se izvršio pregled, na kome bi se odredio stepen zapaljenja sluzokože. Pacijent će odgovarati na postavljena pitanja vezana za opšte zdravstveno stanje, oralno zdravlje i ishranu.

- ✓ Da bi se utvrdilo prisustvo bakterija i gljiva iz roda Candida kao najčešćih uzročnika proteznog stomatitisa, izvršiće se prikupljanje mikrobiološkog materijala

i to: bris sluzokože nepca i bris zubne proteze, ispirak usta i rastvor nakon izlaganja zubne proteze ultrazvuku.

- ✓ Da bi se utvrdio stepen higijene zubne proteze, proteza će se premazati sredstvima za identifikaciju proteznog plaka (naslaga).
- ✓ Ukoliko budete imali bilo kakav problem nakon ove posete obratite se Dr Mirjani Perić, Klinika za stomatološku protetiku, Stomatološki fakultet Beograd, na telefon 011-2433-433 lok.154, svakog radnog dana od 8-18 časova!

SAGLASNOST PACIJENTA

Dobrovoljno pristajem da učestvujem u istraživanju u kome će za potrebe kliničkog ispitivanja biti uzorkovan mikrobiološki materijal brisom sluzokože nepca, brisom zubne proteze, ispiranjem usta sterilnim fiziološkim rastvorom i izlaganjem zubne proteze ultrazvuku. Objašnjeno mi je da prikupljeni podaci ne smeju biti korišćeni u druge svrhe osim onih koje predviđa ovo istraživanje. Na sva moja pitanja u vezi samog istraživanja odgovoreno je na meni razumljiv i zadovoljavajući način.

Neprihvatanje učestvovanja u istraživanju neće uticati na neophodnu terapiju i neću biti uskraćen svojih zakonskih prava kao pacijent. Svojim dobrovoljnim pristankom da učestvujem u ovom istraživanju neću ostvariti nikakvu ličnu, niti materijalnu korist.

UČESNIK

.....
.....

Ime i prezime

potpis

datum

ISTRAŽIVAC

.....

Ime i prezime

potpis

datum

Prilog 2:

UPITNIK
pacijenta:.....

evidencioni br.

GENERALIJE :

Ime:

Prezime:.....

Pol: M1 Ž2

Starost:

Stepen obrazovanja: osnovno.....1

zanimanje:.....

srednje2

više.....3

visoko.....4

MEDICINSKA ISTORIJA:

BOLESTI: Dijabetes melitus

DA

NE

Carcinom

DA

NE

Andjuvantna terapija (radio terapija i hemo terapija)DA

NE

Hipertenzija

DA

NE

LEKOVI: Antihipertenzivi

DA

☐

NE

☐

Anksiolitici

DA

☐

NE

☐

Antidepresivi

DA

☐

NE

☐

Kortikosteroidi

DA

☐

NE

☐

Diuretici

DA

☐

NE

☐

(tokom poslednjih 6 meseci)

NAVIKE:---duvan

Pušački status: nikad0

bivši pušač1

pušač.....2

Koliko na dan cigareta koristite ?.....

Koliko godina pušite?.....

----alkohol

DA

☐

NE

☐

Žestoka pića DA ☐ NE ☐
 Blaga pića DA ☐ NE ☐

Kariogena ishrana: DA ☐ NE ☐

KLINIČKI PREGLED:

Prisustvo subjektivnih tegoba:

- Žarenje i pečenje DA ☐ NE ☐
- Suvoća usta DA ☐ NE ☐

Klasifikacija proteznog stomatitisa po Budtz-Jorgenson i Bertram:

0. Bez zapaljenja
1. Lokalizovana hiperemija
2. Difuzni eritem
3. Papilarna hiperplazija

Lokacija proteznog stomatitisa:

1. Tvrd nepce
2. Tvrd nepce + meko nepce
3. Tvrd nepce + alveolarni greben
4. Tvrd nepce + meko nepce + alveolarni greben
5. Protezni stomatitis + angularni hejlit
6. Protezni stomatitis + pseudomembranozna kandidioza + angularni hejlit

EVALUACIJA ZUBNE PROTEZE:

1. DIREKTNO ISPITIVANJE ZUBNE PROTEZE :

- Koliko dugo nosite zubnu protezu/e? Gornju..... donju.....
- Koliko dugo nosite aktuelnu zubnu protezu?.....
- Antagonisti su:
 - totalna proteza.....1
 - parcijalna proteza (parcijalna ili skeletirana)....2
 - most.....3
 - prirodni zubi.....4
 - bezubi alveolarni greben.....5

Higijena zubne proteze (Budtz-Jorgenson index):

- Dobra (nijedna ili nekoliko mrlja plaka)1
- Srednja (manje od ½ proteze prekriveno plakom).....2
- Loša (više od ½ proteze prekriveno plakom).....3

Kako čistite vašu zubnu protezu?

- Vodom.....1
- Vodom i četkicom.....2
- Vodom + četkicom i pastom.....3

- Da li potapate zubnu protezu u neki dezinfekcioni rastvor?

DA ☐ NE ☐

Koji?.....

- Natrijum- hipohlorit.....1
- Hlorheksidin.....2
- Tablete za održavanje proteza..3
- Soda bikarbona.....4
- Sirće.....5

- Frekvencija oralne higijene : Koliko često na dan perete zubnu protezu?

- posle svakog obroka.....2
- 1 dnevno.....1
- manje od 1 dnevno.....0

- Da li nosite zubnu protezu i noću?:

DA ☐ NE ☐

- Da li koristite sredstva za lepljenje proteze?

DA ☐ NE ☐

- Retencija i stabilnost proteze – dobra

DA ☐ NE ☐

- Vertikalna dimenzija okluzije - očuvana

DA ☐ NE ☐

- Okluzija - stabilna

DA ☐ NE ☐

- Da li je zubna proteza podlagana:

DA ☐ NE ☐

2. SUBJEKTIVNO MIŠLJENJE PACIJENTA:

Da li ste zadovoljni vašom zubnom protezom?

DA ☐ NE ☐

Da li ste do sada imali slične promene?

Pre koliko vremena?.....

DA ☐ NE ☐

9. BIOGRAFIJA

Mr sci dr Mirjana Perić je rođena u Užicu 24.07.1977. godine, gde je završila osnovnu i srednju školu. Stomatološki fakultet Univeziteta u Beogradu upisala je 1996/97. godine, a diplomirala 1. oktobra 2002. godine sa prosečnom ocenom 9,06 (devet 6/100). U toku studija dobila je dve nagradne stipendije: Nagradna stipendija Republike Srbije za 500 najboljih studenata Beogradskog univerziteta, Nagradna stipendija vlade Kraljevine Norveške. Obavezan lekarski staž, u trajanju od godine dana obavila je na Klinikama Stomatološkog fakulteta. Marta 2003. godine Dr Mirjana Perić je položila državni stručni ispit.

Akadske 2002/03. godine upisala je poslediplomske studije iz oblasti stomatološke protetike i položila sve ispite predviđene planom i programom. Odbranila je magistarsku tezu pod nazivom „Raspodela okluzalnog opterećenja na koštani fundament donje vilice kod nosilaca totalnih proteza“, čime je 2009. godine stekla titulu magistra stomatoloških nauka.

Na Klinici za stomatološku protetiku počela je da radi 2003. godine prvo kao volonter, a od oktobra 2005. godine je primljena na određeno radno vreme na mesto asistenta pripravnika. Aktivno učestvuje u izvođenju praktične nastave iz predmeta klinička protetika, mobilna stomatološka protetika, fiksna stomatološka protetika, stomatološka protetika - predklinika, dentalna anatomija i gnatologija. Specijalistički staž iz oblasti stomatološke protetike započela je na Stomatološkom fakultetu u Beogradu 2011. godine i polaže odgovarajuće kolokvijume sa odličnom ocenom.

Dr Mirjana Perić je izabrana u zvanje asistenta za bazične stomatološke nauke 2010. godine, za nastavne predmete: dentalna anatomija i gnatologija.

Do sada je objavila 24 stručna i naučna rada, u časopisima sa recenzijom ili saopštila na kongresima i simpozijumima u zemlji i inostranstvu. Bila je učesnik u projektu: „Istraživanje i razvoj nove generacije mini dentalnih implantata“, evidencioni br. 391-00-00027/2009-02/151, 2009 – 2010. godine. Član je SLD-a i BaSS-a (Balkanska asocijacija stomatologa).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Mirjana Perić

број индекса 4/4009.

Изјављујем

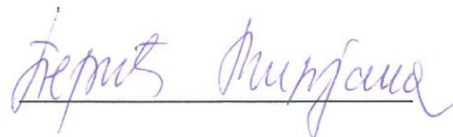
да је докторска дисертација под насловом

„Komparativna analiza kliničkog i mikrobiološkog nalaza kod pacijenata sa proteznim stomatitisom“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _17.04. 2014.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ____Mirjana Perić_

Број индекса _____4/4009.

Студијски програм _____

Наслов рада „Komparativna analiza kliničkog i mikrobiološkog nalaza kod pacijenata sa proteznim stomatitisom“

Ментор _Doc. dr _Rade Živković

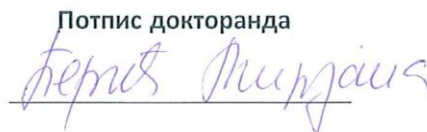
Потписани/а Mirjana Perić

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 17.04.2014

Потпис докторанда


Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Komparativna analiza kliničkog i mikrobiološkog nalaza kod pacijenata sa proteznim stomatitisom“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 17.04.2014.

