

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ОБРАЗНА И ОРАЛНА ДИАГНОСТИКА
Ръководител: проф. д-р Ангелина Киселова-Янева, дмн

Д-р Добринна Павлова Караяшева

РОЛЯ НА СЛЮНКТА В
ЕТИОПАТОГЕНЕЗАТА НА ЗЪБНИЯ КАРИЕС

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователната и научна степен „доктор”

Научна специалност

03.03.01. Терапевтична стоматология

Научен ръководител

Доц. д-р Екатерина Стоянова Ботева, дм

Рецензенти

Проф. д-р Ангелина Илиева Киселова-Янева, дмн

Проф. д-р Иван Атанасов Филипов, дм

София, 2015 г.

Дисертационният труд е написан на 199 страници, онагледен е с 35 таблици, 41 фигури и 7 приложения. Библиографията включва 478 източника, от които 58 на кирилица и 420 на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на катедра „Образна и орална диагностика“ при Факултета по дентална медицина на Медицинския университет – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 22.06.2015 год., от 13.30 часа, в I аудитория на ФДМ, МУ – София, бул. „Св. Георги Софийски“ № 1, съгласно чл. 76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицинския университет – София, и заповед № РК 36-573/02.04.2015 г. на Ректора на МУ – София, на открито заседание на научно жури в състав:

Председател:

Проф. д-р Ангелина Илиева Киселова-Янева, дмн – вътрешен член и рецензент

Членове:

Акад. д-р Богдан Николов Петрунов, дмн – външен член

Доц. д-р Екатерина Стоянова Ботева, дм – вътрешен член и научен ръководител

Доц. д-р Снежана Цветанова Цанова, дм – външен член

Проф. д-р Иван Атанасов Филипов, дм – външен член и рецензент

Резервни членове:

Проф. д-р Росица Илиева Кабакчиева, дм – вътрешен резервен член

Доц. д-р Владимир Емануилов Панов, дм – външен резервен член

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по образна и орална диагностика на ФДМ, МУ – София.

Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	9
IV. РЕЗУЛТАТИ	21
V. ОБСЪЖДАНЕ	52
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	76
VII. ИЗВОДИ	77
VIII. ПРИНОСИ	79
IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	81

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АФ	Алкална фосфатаза
ВА	Въглеродни анхидрази
Вит.	Витамин
КФ	Кисела фосфатаза
МАО инхибитори	Моноаминооксидазни инхибитори
МУ	Медицински университет
СЗО (WHO)	Световна здравна организация
ТЗТ	Твърди зъбни тъкани
ФДМ	Факултет по дентална медицина
bp	Нуклеотидни двойки
CO ₂	Въглероден диоксид
DMFT	Индекс на Клайн
HI	Хигиенен индекс
MMP	Матриксни металопротеинази
ng	Нанограм (10 ⁹ грам)
ppm	Частици на милион
rpm	Обороти в минута
SNP	Единични нуклеотидни полиморфизми
U	Единици
UI	Международни единици

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Защо зъбният кариес продължава да е един от основните проблеми на общественото здраве е въпрос, на който все още няма отговор, но биха могли да бъдат получени много уточнения чрез оценката на рисковите фактори. Голямото разпространение и социалната значимост на зъбния кариес, както и връзката му с оралното и общото здраве, са обосновката на продължаващите проучвания за прецизиране на натрупаните до момента познания за етиологията и патогенезата на заболяването.

Слюнката като биоматериал за изследване и диагностичен източник предлага значителни предимства пред кръвния серум и останалите биологични течности, тъй като достъпът до нея е неинвазивен – събира се лесно и съдържа компоненти на серума. Тези компоненти идват от локалното кръвоснабдяване на слюнчените жлези и от гингивалната течност. Промените в повечето съставни елементи на слюнката са в пропорции, подобни на същите елементи в кръвния серум. Използват се специални, високочувствителни тестове и методи, разработени и подходящи само за слюнка, като е необходимо да се извършва правилно събиране на материала за изследване. Това, от друга страна, я прави труден за анализ биоматериал. Счита се, че нестимулираната смесена слюнка има по-важно значение за оралната хомеостаза в сравнение със стимулираната, тъй като през много малка част от денонощието действат дразнителни – най-често свързани с храненето, които стимулират слюноотделянето.

Въпреки че слюнката е лесно достъпен материал за изследвания и притежава редица предимства като диагностична среда, все още в литературата липсват достатъчно данни относно ролята ѝ като фактор в етиопатогенезата на зъбния кариес при млади и здрави лица, без общи и хронични заболявания.

Възрастта на участниците е важен фактор, който трябва да бъде контролиран в изследванията за кариес, защото има значителни разлики в разпространението на кариеса в зависимост от възрастта. Слюнчените тестове за определяне на риска от кариес – като определяне на количеството на стимулирана или нестимулираната смесена, обща слюнка, буферен капацитет, рН на слюнката и количеството кариесогенни бактерии в милилитър слюнка, трябва да се провеждат в ограничени възрастови групи, което да позволи установяването на подходящи критерии за определяне на категорията с висок риск за конкретната възрастова група. Тази информация би била от полза за избирането на най-ефективното превантивно лечение при тези лица.

В България слюнчените тестове за определяне на риска от кариес при индивиди с постоянно съзъбие обикновено се прилагат само в рамките на научни проучвания. Прегледът на специализираната научна литература показва доста противоречиви данни в публикуваните изследвания относно промените, които се наблюдават в активността на изследваните ензими в смесена слюнка. Като цяло превалират изследванията при деца. Въпросите, по които не открихме достатъчно изчерпателна информация и на които се търси отговор в настоящия дисертационен труд, са обобщени в анализа на литературния обзор.

Настоящият дисертационен труд представлява опит за доизясняване на ролята на общата, смесена слюнка, като фактор в етиопатогенезата на зъбния кариес при млади лица от една и съща социална група и етнос, със съхранено постоянно съзъбие и без съпътстващи общи и хронични заболявания.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да бъде изследвана локалната и пострезорбтивна роля на нестимулираната смесена слюнка, като се установят нейните рискови фактори в етиопатогенезата на зъбния кариес, в млада възраст.

За изпълнението на така формулираната цел са поставени следните **задачи**:

1. Да се подберат подходящи за настоящото изследване кариес-активни и кариес-резистентни лица.

2. Анкетно проучване на изследваните лица – чрез анкетен метод и интервю да бъдат проучени хранителните, хигиенните и вредните навици при млади и здрави лица, от 20 до 30-годишна възраст, без пародонтални, лигавични и общи заболявания.

3. Да се извършат клинични изследвания на участниците:

3.1. Количествено определяне на отделена нестимулирана, смесена слюнка, в два периода – хигиенен и ахигиенен.

3.2. Сравнително интраорално определяне на рН на нестимулираната смесена слюнка при двете изследвани групи в хигиенен и ахигиенен период.

3.3. Сравнително екстраорално определяне на рН на слюнката при двете изследвани групи в хигиенен и ахигиенен период.

3.4. Определяне на буферния капацитет на смесената слюнка на кариес-активните и кариес-резистентните лица.

3.5. Определяне на оралния въглехидратен клирънс на смесената слюнка на двете изследвани групи.

4. Извършване на лабораторни изследвания на участниците:

4.1. Определяне на микробните числа на кариесогенните *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus* в смесената, нестимулирана слюнка при изследваните групи.

4.2. Определяне на концентрациите на неорганичен калций и фосфор в смесена, нестимулирана слюнка на изследваните лица.

4.3. Количествено определяне на ензимите: алфа-амилаза, кисела и алкална фосфатаза в смесена, нестимулирана слюнка на изследваните лица.

4.4. Генетично изследване на единични нуклеотидни полиморфизми (SNP), разположени в два гена на матриксни металопроотеинази (MMP) – MMP2 и MMP3, на кариес-активни, кариес-резистентни и свободни от кариес лица.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. ПОДБОР НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЛИЦА

В изследването участват доброволно общо 110 студенти по дентална медицина (18–25 години), от III, IV, V и VI курс (49 мъже и 61 жени) на Факултета по дентална медицина, Медицински университет – гр. София. Изборът на участниците не е случаен. Обекти на изследването не са чуждестранни студенти с цел получаване на етнически изчистена, хомогенна група; бременни; студенти с пародонтални и лигавични заболявания; с метални и метало-керамични протетични конструкции – инлеи, онлеи, овърлеи, обвивни коронки и мостове, имплантати; с хронични и общи заболявания; студенти на поддържащо медикаментозно лечение и приемащите антибиотици в момента на изследването. Подбрани са лица, отговарящи на критериите за образованост, добра информираност, добро ниво на семейна и здравна култура и сравнително висока мотивация за участие в изследването. В изпълнение на задача 1 са извършени:

1.1. КЛИНИЧНИ ПРЕГЛЕДИ, ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА DMFT И ГРУПИРАНЕ НА УЧАСТНИЦИТЕ; ИЗВЪРШВАНЕ НА КЛИНИЧНО ПРОФЕСИОНАЛНО ПОЧИСТВАНЕ НА ЗЪБИТЕ

На специално създадени DMFT-карти са събрани данни за денталния статус на участниците, като е използван DMFT-индексът, без да се отчита загубата на зъби поради травма и по ортодонтски показания. За целта са използвани стандартни дентални комплекти, съдържащи: сонда, пинсета, огледало, пародонтална сонда (тип *Williams*), както и фотополимерна лампа (диафаноскопия), като са регистрирани броят на кариозните зъби – DT (Decayed Teeth), броят на obtурираните зъби – FT (Filled Teeth) с дентална амалга и/или композиционен материал и броят на екстрахираните, поради кариес и усложненията му зъби – MT (Missing Teeth). Осмите

зъби са изключени от изследването (приложение 2 от дисерт. труд). Рентгенографии, лазерна флуоресценция или други помощни методи и средства за ранна кариесна диагностика не са използвани. След изчисляване на DMFT, студентите бяха разделени на 2 групи съгласно критериите на СЗО (WHO) по наша модификация:

1) кариес-резистентни – с DMFT стойности от 0 до 5 включително (общо 21 – 11 жени и 10 мъже) и на

2) кариес-активни (нерезистентни) – с DMFT-стойности, по-големи или равни на 9 (общо 23 – 13 жени и 10 мъже).

Разпределението на участниците в изследването по възраст и по пол е равномерно и е представено в табл. 1.

На табл. 2 са представени получените средни стойности за компонентите на индекса DMFT.

2. АНКЕТЕН МЕТОД НА ИЗСЛЕДВАНЕ

Доброволно участващите в изследването студенти (n=110) са писмено и устно информирани за целта, задачите и методиката на изследването. На специално изготвени анкетни карти с 20 въпроса относно образование и професия на родителите, хранене и хигиенни навици, вредни навици, провеждана флуорна профилактика, ортодонтско лечение, честота на денталните профилактични прегледи, самооценка на слюноотделянето, минали заболявания, настоящи заболявания и др. са снети анамнестични данни на участниците и е проведено интервю (приложение 1 от дисерт. труд).

3. КЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

3.1. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИ ОТ НЕСТИМУЛИРАНА СМЕСЕНА СЛЮНКА И КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИВОТО НА СЛЮНЧЕНИЯ ПОТОК В ДВА ИЗСЛЕДВАНИ ПЕРИОДА – ХИГИЕНЕН И АХИГИЕНЕН

На всички участници е направено преданалитично екстраорално събиране на проби от смесена, нестимулирана

слюнка за 5 минути, по метода на плюенето. В светло и тихо помещение слюнката се събира на пода на устната кухина на пациента (в седнало положение), който изплюва в градуиран контейнер на всеки 60 секунди или при нужда от преглъщане. Използвани са стерилни пластмасови контейнери тип „Eppendorf”, от 15 ml. Измерванията и микробиологичните посеви са направени двукратно, преди и след спазен ахигиенен период от 24 часа, сутрин между 9.30–11.30 часа, на гладно.

Нивото на нестимулирания слюнчен поток е определено в ml за 5 min подобно на авторите Zero-Aguirre, Zero и Proskin. Анализирани са 44 проби от слюнка.

3.2. ИНТРАОРАЛНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА pH НА СМЕСЕНА СЛЮНКА – ДВУКРАТНО В ХИГИЕНЕН И АХИГИЕНЕН ПЕРИОД

Интраорално е определено pH на слюнка на:

– Горна челюст (ГЧ) едностранно вдясно (gl. parotis) в областта на горните пети и шести зъб вестибуларно —65 |.

– Долна челюст (ДЧ) едностранно вляво (gl. sublingualis) в областта на долните пети и шести зъб лингвално | 56—.

– Смесена слюнка (СМ) – на гърба на езика (dorsum linguae).

Анализирани са 264 броя проби от слюнка, като стойностите на pH са определяни сутрин (9.30–11.30 ч.), в седнало положение на пациента, за 1 минута (За целта са използвани универсални pH-индикаторни лентички (pH 0–14, MERCK, Germany) за колориметрично определяне по скалата на фирмата производител. Отчитането се повтаря след 24-часов ахигиенен период при същите условия.

3.3. ЕКСТРАОРАЛНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА pH НА СМЕСЕНА СЛЮНКА – ДВУКРАТНО В ХИГИЕНЕН И АХИГИЕНЕН ПЕРИОД. ЕКСТРАОРАЛНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТЕМПЕРАТУРАТА НА СЛЮНКАТА

Анализирани са 88 проби от нестимулирана, неразредена, смесена слюнка, екстраорално, *in vitro*. За целта е използван дигитален pH-метър (модел HI-210 HANNA, с термосонда) по методика, подобно на авторите Zero-Aguirre, Zero и Proskin (фиг. 1).



Фиг. 1.
pH-
метър с
термо-
сонда

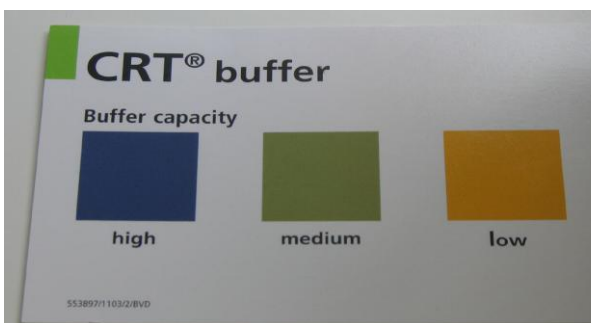
Електродът се калибрира преди и след всяко измерване със стандартни pH-буфери. След промиване на стъкления електрод с дестилирана вода (съхранение в разтвор на KCl) pH-метърът се калибрира по 2 точки за деня, с буферни разтвори, с киселинност съответно pH=4,0 и pH=7,0. За всяка проба pH се измерва трикратно, а отчетеният резултат се записва в индивидуалната карта на лицето. За крайна се приема и записва средната стойност от трите измервания. Прецизността на отчитане на електрода се влияе от температурата на пробата, а също и от температурата на околната среда. Последната се регистрира с термометър. След всяко измерване електродът е почистван с дестилирана вода и подсушаван с филтърна хартия. Трикратно се определя и pH на слюнчените проби, взети след 24-часов ахигиенен период. Едновременно с pH на слюнката в два периода се измерва и температурата на пробите, с термосондата на апарата.

3.4. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БУФЕРНИЯ КАПАЦИТЕТ НА СМЕСЕНАТА СЛЮНКА НА КАРИЕС-АКТИВНИТЕ И КАРИЕС-РЕЗИСТЕНТНИ ЛИЦА

Колориметрично е определена буферната способност на слюнката с помощта на лентички CRT® buffer. Определянето за всеки пациент се извърши двукратно, след накапване на около 1,0 ml неразредена слюнка върху тест-полето.

Отчитанията са извършени след изтичане на определеното от производителя реакционно време от 5 минути и сравняване по фабрично предоставена скала (фиг. 2):

- оцветяване в синьо – висок буферен капацитет;
- оцветяване в зелено – междинен буферен капацитет;
- оцветяване в жълто – слаба буферна способност.



Фиг. 2.
Колориметрична
фабрична скала
CRT® buffer

3.5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОРАЛНИЯ ВЪГЛЕХИДРАТЕН КЛИРЪНС НА ОБЩАТА СМЕСЕНА СЛЮНКА НА ДВЕТЕ ИЗСЛЕДВАНИ ГРУПИ

Оралният въглехидратен клирънс е определен в 6 периода с индикаторни, стандартни рН-ленти (MERCCK, Germany, 0–14) – общо 264 измервания. Концентрацията на водородните йони (рН) се определя интраорално преди започване на изследването (базови стойности) и на 5, 10, 15, 20 и на 30-та минута след изплакване с 15 ml 5% разтвор на захароза в дестилирана вода (5g на 100 ml), за 60 sec.

4. ЛАБОРАТОРНИ ПРОУЧВАНИЯ

4.1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МИКРОБНИТЕ ЧИСЛА НА КАРИЕСОГЕННИТЕ STREPTOCOCCUS MUTANS И LACTOBACILLUS В СМЕСЕНАТА НЕСТИМУЛИРАНА СЛЮНКА ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ГРУПИ

За определяне на микробните числа на *Str. mutans* и *Lactobacillus* в смесена, нестимулирана слюнка са използвани предлаганите в търговската мрежа микробиологични тестове за определяне на риска от зъбен кариес – CRT®-bacteria, Ivoclar–Vivadent® (Liechtenstein). Това са селективни хранителни агари, известни в научната литература като „тестове до стола на пациента” („chair-side tests”) (фиг. 3 и 3-а). Направени са общо 176 теста – на 44 лица, в 2 периода, за 2 вида бактерии.



Фиг. 3 и 3-а. CRT® bacteria, Intro Pack

„Chair-side tests” позволяват полуколичествено определяне на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus* в слюнка. Синият агар, съдържащ бацитрацин и метиленово синьо, е предназначен за *Streptococcus mutans*, докато прозрачният – *Rogosa* агар, се използва за оценка на лактобацилите. На всяка от средите се аплицира с пластмасова пипета около 0,5–1,0 ml неразредена, смесена слюнка. Предварително поставена на дъното на контейнерите таблетка от NaHCO₃ осигурява необходимия за култивирането CO₂. Обозначените и датирани среди се инкубират апаратно (CULTURA Incubator Brutschrank, temp. 25–

45°C, Ivoclar-Vivadent® , Liechtenstein) за 48 часа, при 37°C (фиг. 4 и 5).



Фиг. 4.
Инкубатор



Фиг. 5.
Готови за
инкубиране
посевки

След изтичане на инкубационния период стрептококите се визуализират под формата на малки сини колонии с диаметър, по-малък от 1mm, върху синия агар. На обратната страна лактобацилите се визуализират като бели колонии върху прозрачния агар. Сравняването на получените резултати с предоставената от производителя схема позволява да се направи оценка на риска от зъбен кариес (фиг. 6). Съгласно нея микробни числа, по-малки от 10^5 CFU/ml, се отчитат като нисък риск от развиване на зъбен кариес. Определянето на микробни числа, по-големи от 10^5 CFU/ml, се отчитат като висок риск от кариес.

На базата на литературни данни на пилотни проучвания и за целите на по-акуратното изследване, след направена консултация с микробиолог, сме въвели следните микробни числа за отчитане на получените от нас резултати:

– 10^2 CFU/ml – много нисък риск за развиване на зъбен кариес;

– 10^5 CFU/ml – нисък риск за развиване на зъбен кариес;

– 10^7 CFU/ml – висок риск за развиване на зъбен кариес;

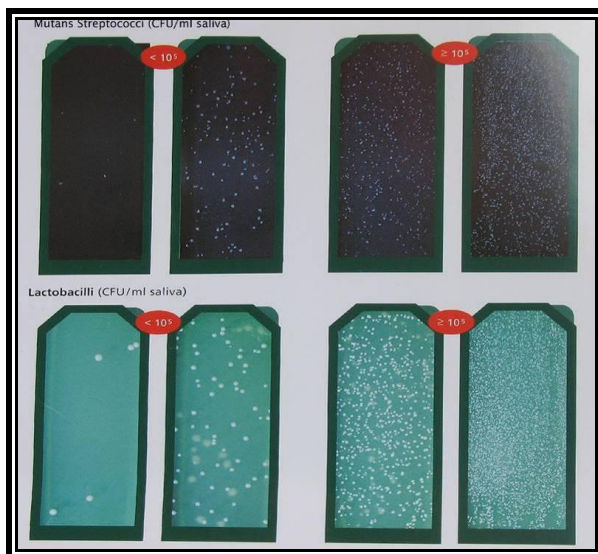
– 10^9 CFU/ml – много висок риск за зъбен кариес.

Намиращите се в търговската мрежа на страната „тестове до стола на пациента” са сравнително скъпи. Необходимо е и допълнително закупуване на апарат – инкубатор, за култивиране върху агарите (фиг. 4).

Описание на фигура 6:

– горе за *Str. mutans* → $<10^5$ CFU/ml слюнка и $\geq 10^5$ CFU/ml слюнка;

– долу за *Lactobacillus* → $<10^5$ CFU/ml слюнка и $\geq 10^5$ CFU/ml слюнка.



Фиг. 6. Скала на производителя за отчитане на микробните числа

4.2. и 4.3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИИТЕ НА НЕОРГАНИЧЕН КАЛЦИЙ И ФОСФОР И НА ЕНЗИМИТЕ: АЛФА-АМИЛАЗА, КИСЕЛА И АЛКАЛНА ФОСФАТАЗА В СМЕСЕНА, НЕСТИМУЛИРАНА СЛЮНКА НА КАРИЕС-АКТИВНИ И КАРИЕС-РЕЗИСТЕНТНИ ЛИЦА

Пробите от слюнката на доброволците, взети в два периода, сутрин на гладно, в стерилни контейнери, тип „Eppendorf” от 15 ml се транспортират по куриер в хладилна чанта (айс пак, 4°–8°C) до биохимичната лаборатория за анализ и определяне на активностите на слюнчените: α -амилаза, алкална и кисела фосфатаза, както и за определяне на концентрациите на калций и фосфор в двата изследвани периода. Без да се разрежда лабораторно, слюнката се центрофугира за 10 минути на 12 000 оборота/мин. Отпипетираната супернатантата се анализира в автоматичен биохимичен анализатор Hitachi 911.

4.4. АНАЛИЗИРАНЕ НА ЕДИНИЧНИ НУКЛЕОТИДНИ ПОЛИМОРФИЗМИ (SNP), РАЗПОЛОЖЕНИ В ДВА ГЕНА НА МАТРИКСНИ МЕТАЛОПРОТЕИНАЗИ (MMP) – MMP2 (RS2287074, P.THR460THR, C.1380G>A) И MMP3 (RS679620, P.LYS45GLU, C.133A>G)

Участници в проучването

Участници в генетичното проучване са 102-ма етнически българи доброволци (42 мъже и 60 жени), студенти в Медицинския университет – София. Всички участници са клинично обследвани и резултатите за кариозните, obtурираните и екстрахираните поради кариес и усложненията му зъби (DMFT) са записани в специални формуляри. Участниците са изпълнили изискванията за съответното здравно състояние, липса на системни заболявания или общи пародонтални възпаления. От изследването са отпаднали чуждестранните студенти, както и тези с общи и хронични заболявания. Клиничните прегледи са проведени със стандартни дентални комплекти за установяване на зъбен статус, източник на

изкуствена светлина и фотополимеризираща лампа. Не са приложени рентгенографски методи на изследване.

Въпросници

Доброволците са информирани за целта, материалите и методите на изследването и са попълнили анкетни карти с 20 въпроса относно хранителни навици, прием на закуски между основните хранения, хигиенни навици, вредни навици, прием на флуориди, провеждано ортодонтско лечение, честота на профилактичните дентални прегледи, самооценка на слюнчения поток.

Клинични прегледи и събиране на проби

Студентите са разделени на шест групи – три основни според стойността на DMFT и всяка една от тях е разделена и по пол – на мъже и жени. Трите основни групи са: свободни от кариес участници – DMFT=0, n=20, като контроли; кариес-резистентни участници, с DMFT≤5, n=41 и кариес-активни, с DMFT≥9, n=41.

Екстракция на ДНК

ДНК е екстрахирана от епителни букални клетки и нестимулирана, смесена слюнка чрез екстракционна техника на Chelex[®] 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Флаконите с букални клетки са центрофугирани при 7500 rpm в продължение на 15 min и супернатантата (течността над утайката) е отстранена. Утайката е ресуспендирана чрез пълно смесване в 150 µl разтвор от 5% Chelex[®] 100 смола и протеиназа К, последвано от инкубиране при 56°C в продължение на 2 часа в инкубатор със суха топлина. Сместа е нагрята до 96°C в инкубатор със суха топлина за 10 min и после охладена в лед за 5 min. След това е центрофугирана при 12 000 оборота в минута в продължение на 10 min. Новата супернатанта, съдържаща ДНК, е внимателно отстранена с избягване на Chelex[®] 100 смолата. ДНК е съхранявана при -20°C до момента на използването ѝ в PCR.

Анализ на генетични полиморфизми

Направен е анализ на 102 лица за MMP2 и MMP3 – общо 204 проби. За генотипиране на MMP2 единични нуклеотидни последователности (SNP) са амплифицирани ДНК фрагменти чрез използване на праймерни двойки

5'-GTCCAGGCATCTTCTTGTTA-3' и

5'-GAGGACAAGAAGCAAGCTCC-3' (322 bp).

Амплификацията чрез PCR е направена в обем от 25 μ l, съдържащ 100 ng геномна ДНК. Термичните цикли са инициирани за 5 min при 95°C, последвани от 30 цикли от 40 sec при 95°C, 30 sec при 58°C, 30 sec при 72°C и последно при 72°C за 10 min. Продуктите от PCR са подложени на анализ за полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP) 5U от BseYI (NEB, Germany) при 37°C за една нощ („over night”, т.е. между 12–16 часа) и продуктите са разделени върху 3% агарозен гел и оцветени с етидиев бромид, за да се получат G (122 and 200bp) и A (322 bp) алели, позволяващи съответно определянето на генотипове GG, GA и AA.

За генотипиране на MMP3 SNP са амплифицирани ДНК фрагменти, чрез използване на праймерни двойки

5'-GATTAAGAAGTGAGCAACTGCA-3' и

5'-CCTCCAATCCAAGGAАСТTC-3' (212 bp).

Амплификацията чрез PCR е извършена с използване на условията за MMP2 SNP. След това продуктите от PCR са подложени на RFLP с 5U от TaqI (NEB, Germany) и държани при 65°C, за една нощ (12–16 часа). Продуктите са разделени върху 3% агарозен гел и оцветени с етидиев бромид, за да се получат A (212bp), G (120 и 92 bp) алели, позволяващи съответно определянето на генотипове AA, AG и GG.

Генотипирането на двата полиморфизма rs2287074 (c.1380G>A) в MMP2 и rs679620 (c.133A>G) в MMP3 гените е извършено с помощта на рестрикционен анализ (RFLP). Алелите са визуализирани чрез разделяне на агарозна гел електрофореза.

Резултатите са потвърдени и чрез директно секвениране по Sanger (фиг. 10 и 11).

5. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет SPSS 13.0. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, е избрано $p < 0,05$.

Приложени са следните методи:

5.1. Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.

5.2. Вариационен анализ – изчисляване на оценките на централната тенденция и разсейване.

5.3. Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.

5.4. Алтернативен анализ – за сравняване на относителни дялове.

5.5. Точен тест на Фишер – за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.

5.6. Непараметричен тест на Шапиро–Уилк – за проверка на вида на разпределението.

5.7. Тест на Маучли – за проверка на разпределението за мултиномалност.

5.8. Т-критерий на Стюдънт – параметричен тест за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

5.9. Непараметричен тест на Ман-Уитни – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

5.10. Непараметричен тест на Фридман – за проверка на хипотези за различие между няколко зависимы извадки.

5.11. Непараметричен тест на Уилкоксон – за проверка на хипотези за различие между две зависимы извадки.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. РЕЗУЛТАТИ ОТ КЛИНИЧНИТЕ ПРЕГЛЕДИ – ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА ИНДЕКСА DMFT И ГРУПИРАНЕ НА УЧАСТНИЦИТЕ. РЕЗУЛТАТИ ОТ РЕГИСТРИРАНЕТО НА ПЛАКОВИЯ ХИГИЕНЕН ИНДЕКС (HI) И ИНДЕКСА ЗА КЪРВЕНЕ ПРИ СОНДИРАНЕ (BOR)

Разпределението на участниците в изследването по възраст и по пол е представено в таблица 1.

Табл. 1. Разпределение на участниците в изследването по възраст и пол

Показател Група	Пол	n	\bar{X}	Std. Dev.	Min.	Max.
DMFT \leq 5	Мъже	10	22,20	0,919	21	23
	Жени	11	23,36	1,206	21	25
	Общо	21	22,81	1,209	21	25
DMFT \geq 9	Мъже	10	23,20	1,932	21	26
	Жени	13	23,15	1,144	21	25
	Общо	23	23,17	1,497	21	26

Средната възраст на мъжете в кариес-резистентната група е $22,20 \pm 0,92$ г., а на жените – $23,36 \pm 1,20$, или общо за групата е $22,81 \pm 1,20$ години (табл. 1). Средната възраст на кариес-активните мъже е $23,20 \pm 1,93$ г., а на кариес-активните жени – $23,15 \pm 1,14$, или общо за групата е $23,17$ години. Средните стойности на DMFT са $2,72 \pm 1,76$ в групата на кариес-резистентните, в граници от 1 до 5, а в групата на кариес-активните средните стойности на DMFT са $13,7 \pm 3,51$, в граници от 9 до 22 (табл. 1). На табл. 2 се разкрива, че сигнификантно по-малък брой на кариозните (DT) ($p=0,003$) и obtурираните зъби (FT) ($p<0,001$) има при лицата с кариес-резистентно съзъбие в сравнение с кариес-активните. Няма статистически значими

разлики в броя на липсващите зъби (MT) между двете групи. DMFT-индексът при кариес-активните е сигнификантно по-висок ($p < 0,001$).

Табл. 2. Анализ на средните стойности на кариозните (DT), липсващите (MT) и obtурираните (FT) зъби и на DMFT-индекса на проучваната група (n=44)

Показател Група	Резистентност на съзъбието	n	\bar{X}	Min.	Max.	SD	Std. Err. M.	P-value
DT	Да	21	0,50	0	5	1,19	0,27	0,003
	Не	23	2,11	0	7	2,09	0,43	
MT	Да	21	0,10	0	1	0,30	0,07	0,271
	Не	23	0,28	0	2	0,53	0,11	
FT	Да	21	2,11	0	5	1,78	0,40	<0,001
	Не	23	11,36	3	17	3,46	0,71	
DMFT	Да	21	2,67	0	5	1,85	0,41	<0,001
	Не	23	13,75	4	22	3,95	0,81	

На всички участници е регистриран хигиенният индекс (Hygiene index) и индексът на кървене (Bleeding on probing) (табл. 3). Извършена е контролирана клинична процедура на плак контрол и отново е направено регистриране на хигиенния индекс (HI) (табл. 3).

От сравнителния анализ на резултатите за хигиенния индекс (HI) се констатира, че не се установяват значими разлики между групите активни-резистентни при хигиенния индекс. Значими са промените в хигиенния индекс преди и след професионалното клинично почистване, както се вижда от табл.

3, което всъщност се стремим да получим, когато извършваме професионално орално-хигиенно почистване. Значими разлики между групите се установяват само при индекса на кървене (BOP), където процентът при активните е по-висок.

Табл. 3. Сравнителен анализ на резултатите за хигиенния индекс (Hygiene index), получени преди и след професионалното почистване, и от индекса за кървене (Bleeding on probing index)

Показател		Кариес-резистентни			Кариес-активни			p-value
		n	\bar{x} %	SD %	n	\bar{x} %	SD %	
Hygiene index	Преди професионално почистване	21	71,7	6,12	23	70,1	5,9	0,389
	След професионално почистване	21	90,0	2,4	23	90,1	3,5	0,221
	p-value		<0,001			<0,001		
Bleeding on probing index		21	9,5	1,1	23	11,2	1,0	<0,001

2. РЕЗУЛТАТИ ОТ АНКЕТНИТЕ ПРОУЧВАНИЯ ЗА ФАКТИЧЕСКОТО ХРАНЕНЕ, ХИГИЕННИТЕ И ВРЕДНИТЕ НАВИЦИ, ФАМИЛНАТА АНАМНЕЗА

От таблица 4 се вижда, че не съществуват съществени разлики между кариес-активните и кариес-резистентните студенти по показател *образование и професия на родителите*. Процентното разпределение по професия е неравномерно. Не открихме и статистически значими разлики при сравняването на групите по пол ($p > 0,05$).

Табл. 4. Разпределение на участниците по показател *образование и професия на родителите*

Показател Група	ПОЛ	Образование на родителите			Професия на родителите		
		Основно	Средно	Висше	Лекари	Дентални лекари	Друга
Кариес-активни студенти DMFT≥9 n=23	Жени n=13	–	20%	80%	20%	20%	60%
	Мъже n=10	–	10%	90%	10%	30%	60%
Кариес-резистентни студенти DMFT≤5 n=21, p>0.05	Жени n=11	–	20%	80%	–	30%	70%
	Мъже n=10	–	10%	90%	10%	50%	40%

Не се установяват статистически значими разлики в процентното разпределение на родителите по показателите *образование и професия* между двете анкетиранни групи студенти – активни и резистентни (табл. 5, $p>0,05$).

Табл. 5. Сравнителен анализ на образованието и професията на родителите на анкетираните групи студенти (n=44)

Показател		DMFT група				P-value
		Резистентни		Активни		
		Бр.	%	Бр.	%	
Образование на родителите	Основно	0	0,0	0	0,0	1,000
	Средно	3	14,3	3	13,0	
	Висше	18	85,7	20	87,0	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Професия на родителите	Лекари	1	4,8	3	13,0	0,586
	Стоматолози	7	33,3	6	26,1	
	Друго	13	61,9	14	60,9	
	Общо	21	100,0	23	100,0	

Висок процент от студентите, независимо дали са кариес-активни или кариес-резистентни, консумират тестени, захарни изделия (закуски) между трите основни хранения през деня (70–

80%) (табл. 6). Ортодонтско лечение е провеждано при 40% от кариес-резистентните жени и при 30% от кариес-резистентните мъже. В групата на кариес-активните студенти процентите са съответно 20% за жените и 10% за мъжете (табл. 6).

Табл. 6. Процентно разпределение на участниците в зависимост от хранителните навици, флуорната профилактика и ортодонтското лечение

Показател Група	ПОЛ	Прием на закуски между основните храненияя	Честота на приема на закуски между осн. храненияя	С флуорна профилактика	С провеждано ортодонтско лечение
Кариес-активни студенти DMFT \geq 9 n=23, p>0.05	Жени n=13	80%	Средно 1 път/24 часа	50%	20%
	Мъже n=10	70%	Средно 3 пъти/седмично	50%	10%
Кариес-резистентни студенти DMFT \leq 5 n=21, p>0.05	Жени n=11	70%	Средно 3 пъти/седмично	70%	40%
	Мъже n=10	70%	Средно 3 пъти/седмично	30%	30%

В групите не са установени значими отклонения в подреждането на зъбите и оклузалните съотношения, които да са свързани с персистиращо възпаление на прилежащите околозъбни тъкани – интерпроксималните папили и маргиналната гингива, обуславящо се от присъствие на зъбна плака и кървене при сондиране, характерни в случаи, когато има

налични естествени ретенционни за плака фактори. Не се установяват значими разлики по отношение на хранителните навици при сравнителния анализ на резултатите между двете групи – кариес-активни и кариес-резистентни (табл. 7, $p>0,05$).

Табл. 7. Сравнителна характеристика на хранителните навици между кариес-резистентните и кариес-активните пациенти (n=44)

Показател		DMFT група				(p)
		Резистентни		Активни		
		Брой	%	Брой	%	
Закуска	Не закусва	4	19,0	5	21,7	0,860
	Нередовно	9	42,9	8	34,8	
	Редовно	8	38,1	10	43,5	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Обяд	Не обядва	0	0,0	0	0,0	1,000
	Нередовно	10	47,6	11	47,8	
	Редовно	11	52,4	12	52,2	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Вечеря	Не вечеря	0	0,0	0	0,0	0,176
	Нередовно	4	19,0	1	4,3	
	Редовно	17	81,0	22	95,7	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Закуска между основните храненияя	Не	5	23,8	6	26,1	0,570
	Да	16	76,2	17	73,9	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Честота на закуските между храненияята	Не консумира	3	14,3	1	4,3	0,619
	Рядко, в празнични дни	2	9,5	5	21,7	
	<4 пъти седмично	5	23,8	4	17,4	
	1 път дневно	7	33,3	9	39,1	
	2 пъти дневно	4	19,0	4	17,4	
	Общо	21	100,0	23	100,0	

Табл. 8. Сравнителен анализ на флуорната профилактика между кариес-резистентните и кариес-активните пациенти (n=44)

Флуорна профилактика	DMFT група				(p)
	Резистентни		Активни		
	Брой	%	Брой	%	
Да	11	52,4	11	47,8	1,000
Не	10	47,6	12	52,2	
Общо	21	100,0	23	100,0	

Не се установяват сигнификантни разлики в относителните дялове на студентите с проведена флуорна профилактика между кариес-резистентната и кариес-активната група (табл. 8, $p > 0,05$).

Табл. 9. Сравнителен анализ на честотата на ортодонтското лечение между двете групи пациенти (n=44)

Показател	DMFT група				p	
	Резистентни		Активни			
	Брой	%	Брой	%		
Ортодонтско лечение	Да	7	33,3	5	21,7	0,728
	Не	14	66,7	18	78,3	
	Общо	21	100,0	23	100,0	

Не се установяват значими разлики в честотата на ортодонтското лечение между двете групи пациенти (кариес-активни и кариес-резистентни) (табл. 9, $p > 0,05$).

Изследвани са при всички участници и хигиенните навици (табл. 10). Регистрирано е високо ниво на персонален контрол на плаката (табл. 3). Индексът *кървене при сондиране* (BOP – Bleeding on probing) е под 12%, което също подкрепя определеното състояние на здрав пародонт.

Табл. 10. Процентно съотношение на участниците, групирани по пол и DMFT, в зависимост от хигиенните навици

DMFT	ПОЛ	Честота на миене на зъбите за 24 ч.	Употреба на плакинхибиращи разтвори за лична орална хигиена	Употреба на зъбни конци и интердентални четки за лична орална хигиена	Употреба на клечки за зъби за лична орална хигиена
Кариес-активни студенти, DMFT \geq 9 n = 23, p>0.05	Жени n =13	2 пъти/ 24 ч.	70%	80%	20%
	Мъже n =10	2 пъти/ 24 ч.	50%	50%	50%
Кариес-резистентни студенти, DMFT \leq 5 n = 21, p>0.05	Жени n =11	2 пъти/ 24 ч.	70%	50%	50%
	Мъже n =10	2 пъти/ 24 ч.	50%	30%	60%

Табл. 10-а. Сравнителна характеристика на хигиенните навици на двете изследвани групи – кариес-резистентните и кариес-активните участници (n=44)

Показател	DMFT група				P-value	
	Резистентни		Активни			
	Брой	%	Брой	%		
Честота на измиване на зъбите/дневно	1 път	2	9,5	2	8,7	0,620
	2 пъти	18	85,7	18	78,3	
	3 пъти	1	4,8	3	13,0	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Употреба на плакинхибиращи разтвори	Да	13	61,9	14	60,9	1,000
	Не	8	38,1	9	39,1	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Употреба на конци за зъби	Да	9	42,9	15	65,2	0,225
	Не	12	57,1	8	34,8	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Употреба на клечки за зъби	Да	11	52,4	8	34,8	0,361
	Не	10	47,6	15	65,2	
	Общо	21	100,0	23	100,0	

Сравнителният анализ на резултатите между двете групи студенти, включително и след разделянето им по пол, не установи сигнификантни разлики в орално-хигиенните навици (табл. 10 и 10-а, $p>0,05$).

От таблица 11 се вижда, че не се установяват сигнификантни разлики в честотата на профилактичните прегледи между двете групи, както преди обучението, така и по време на обучението им по дентална медицина. Установяват се значими разлики в честотата на профилактичните прегледи при денталния лекар и в двете групи ($p=0,008$ за кариес-резистентните и съответно $p=0,006$ за кариес-активните). При сравнението между периодите преди и след следването в университета намаляват студентите, които посещават стоматолога на 12 или 24 месеца за сметка на тези, които го посещават значително по-често – на 3 или на 6 месеца.

Табл. 11. Сравнителен анализ на честотата на профилактичните прегледи между кариес-резистентните и кариес-активните участници (n=44)

Показател		DMFT група				P-value
		Резистентни		Активни		
		Брой	%	Брой	%	
Честота на профилактикт. прегледи като студенти	На 3 мес.	4	20,0	5	21,7	0,129
	На 6 мес.	11	50,0	16	69,6	
	На 12 мес.	3	15,0	2	8,7	
	На 24 мес.	3	15,0	0	0,0	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Честота на профилактикт. прегледи преди университета	На 3 мес.	2	10,0	1	4,3	0,388
	На 6 мес.	8	35,0	14	60,9	
	На 12 мес.	5	25,0	4	17,4	
	На 24 мес.	6	30,0	4	17,4	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
p-value		0,008		0,006		

Не се установяват сигнификантни разлики по отношение на вредните навици между двете групи изследвани лица (табл. 12, $p>0,05$).

Табл. 12. Сравнителен анализ на изследваните вредни навици между кариес-резистентните и кариес-активните участници (n=44)

Показател		DMFT група				(p)
		Резистентни		Активни		
		Брой	%	Брой	%	
Стискане на зъби	Да	7	33,3	4	17,4	0,303
	Не	14	66,7	19	82,6	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Дишане през устата	Да	1	4,8	3	13,0	0,609
	Не	20	95,2	20	87,0	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Тютюно-пушене	Не пуши	11	52,4	15	65,3	0,238
	Бивш пушач	3	14,3	1	4,3	
	<5 цигари дневно	5	23,8	2	8,7	
	>5 цигари дневно	2	9,5	5	21,7	
	Общо	21	100,0	23	100,0	
Консумация на алкохол	Не пие	1	4,8	2	8,7	0,624
	Рядко, по празници	14	66,7	17	73,9	
	1–2 пъти седмично	6	28,5	4	17,4	
	Общо	21	100,0	23	100,0	

3. РЕЗУЛТАТИ ОТ КОЛИЧЕСТВЕНОТО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НЕСТИМУЛИРАНИЯ СЛЮНЧЕН ПОТОК В ДВАТА ПЕРИОДА – ХИГИЕНЕН И АХИГИЕНЕН

Табл. 13. Резултати от определянето на слюнчения поток на групите в двата периода

Показател Група	ПОЛ	Определяне на слюнчения поток (в ml/5 min и в ml/ 1min)	Определяне на слюнчения поток (в ml/5 min и в ml/ 1min) след 24-часов ахигиенен период
Кариес-активни студенти DMFT≥9 n=23	Жени n=13	3,0 ml/5 min (0,6 ml/1 min)	2,7 ml/5 min (0,5 ml/1 min)
	Мъже n=10	3,7 ml/5 min (0,7 ml/1 min)	2,6 ml/5 min (0,5 ml/1 min)
Кариес-резистентни студенти DMFT≤5 n=21	Жени n=11	2,9 ml/5 min (0,6 ml/1 min)	2,8 ml/5 min (0,6 ml/1 min)
	Мъже n=10	3,0 ml/5 min (0,6 ml/1 min)	2,6 ml/5 min (0,5 ml/1 min)

Табл. 13-а. Сравнителен анализ на слюнчения поток при кариес-активни и кариес-резистентни лица в двата периода

Показател		DMFT-група						Р-стойност
		Кариес-активни			Кариес-резистентни			
		n	\bar{x}	SD	n	\bar{x}	SD	
Слюнчен поток ml/5 мин	Хигиенен период	23	3,35	1,38	21	2,95	1,62	0,468
	Ахигиенен период	23	2,65	1,01	21	2,70	0,88	0,873
	Р-стойност		0,015			0,219		

Не се установяват статистически значими разлики в средните стойности на слюнчения поток в хигиенен и ахигиенен период при сравнението между двете изследвани групи лица – кариес-активни и кариес-резистентни (табл. 13, 13-а, $p>0,05$). Средните стойности се понижават след 24-часов ахигиенен период, като се установява статистически значима разлика единствено в групата на кариес-активните студенти при сравнението между двата периода (табл. 13, 13-а, $p<0,05$).

4. РЕЗУЛТАТИ ОТ КЛИНИЧНИТЕ ТЕСТОВЕ НА pH НА СЛЮНКАТА ПО ИНТРАОРАЛНИ И ЕСКТРАОРАЛНИ МЕТОДИ

От таблици 14 и 15 се вижда тенденцията pH да бъде по-висока за долната челюст и за смесената слюнка в сравнение с горната челюст, което е валидно и при двете изследвани групи. Статистически достоверни разлики са установени в групите при сравнение между хигиенен и ахигиенен период (табл. 16-а, $p<0,001$).

Табл. 14. Резултати от интраоралното измерване на pH на слюнка с pH-ленти в хигиенен период

Показател Група	ПОЛ	Интраорално измерване на pH на слюнка с pH-ленти		
		pH – ГЧ	pH – ДЧ	pH – смесена слюнка
Кариес-активни студенти DMFT \geq 9 n=23	Жени n=13	6,0	6,6	7,2
	Мъже n=10	6,4	7,2	7,6
Кариес-резистентни студенти DMFT \leq 5 n=21	Жени n=11	6,0	6,9	7,4
	Мъже n=10	6,4	7,2	7,6

Табл. 15. Интраорално измерване на рН на слюнка с рН ленти в ахигиенен период

Показател Група	ПОЛ	Интраорално измерване на рН на слюнка с рН-ленти след 24-часов ахигиенен период		
		рН на ГЧ	рН на ДЧ	рН на смесена слюнка
Кариес-активни студенти DMFT \geq 9; n=23	Жени (n=13)	6,0	6,0	6,5
	Мъже (n=10)	6,2	6,6	7,1
Кариес-резистентни студенти, DMFT \leq 5; n=21	Жени (n=11)	6,0	6,7	6,9
	Мъже (n=10)	6,4	6,6	7,1

По-точно, но съвсем съпоставимо, е определянето на рН на слюнката с дигитален рН-метър (табл. 16). В таблица 16-а е представено статистическото сравняване на получените резултати за рН на слюнката и температурата ѝ, измерена интра- и екстраорално, в два периода – хигиенен и ахигиенен.

Табл. 16. Резултати от екстраоралното определяне на рН на смесена слюнка с рН-метър

Показател Група	ПОЛ	Екстраорално измерване на рН на смесена слюнка с рН-метър	Екстраорално измерване на рН на смесена слюнка с рН-метър след 24-часов ахигиенен период
Кариес-активни студенти DMFT \geq 9; n=23	Жени n=13	6,98	6,54
	Мъже n=10	7,00	6,91
Кариес-резистентни студенти DMFT \leq 5; n=21	Жени n=11	7,18	6,75
	Мъже n=10	7,15	6,95

Табл. 16-а. Сравнителен анализ на измерванията за рН на смесена слюнка и температурата ѝ между кариес-активните и кариес-резистентните лица в двата изследвани периода

Показател		DMFT-група						р-стойност
		Кариес-активни			Кариес-резистентни			
		n	\bar{x}	SD	n	\bar{x}	SD	
рН измер. с рН-метър	Хиг. период	23	6,99	0,43	21	7,17	0,38	0,086
	Ахиг. период	23	6,73	0,47	21	6,85	0,37	0,219
	р-стойност	<0,001			<0,001			
рН с ленти – ГЧ	Хиг. период	23	6,20	0,49	21	6,12	0,66	0,827
	Ахиг. период	23	6,10	0,44	21	6,20	0,54	0,395
	р-стойност	0,266			0,815			
рН с ленти – ДЧ	Хиг. период	23	6,90	0,79	21	7,05	0,54	0,396
	Ахиг. период	23	6,30	0,60	21	6,65	0,53	0,054
	р-стойност	<0,001			<0,001			
рН-ленти – см. слюнка	Хиг. период	23	7,40	0,75	21	7,50	0,52	0,497
	Ахиг. период	23	6,80	0,58	21	7,00	0,56	0,267
	р-стойност	<0,001			<0,001			
t°С на см. слюнка	Хиг. период	23	22,83	0,73	21	23,73	0,14	0,003
	Ахиг. период	23	23,10	0,73	21	23,70	0,85	0,015
	р-стойност	0,133			0,923			

Анализът на получените резултати за рН на слюнката и температурата ѝ (табл. 16-а) води до следните констатации:

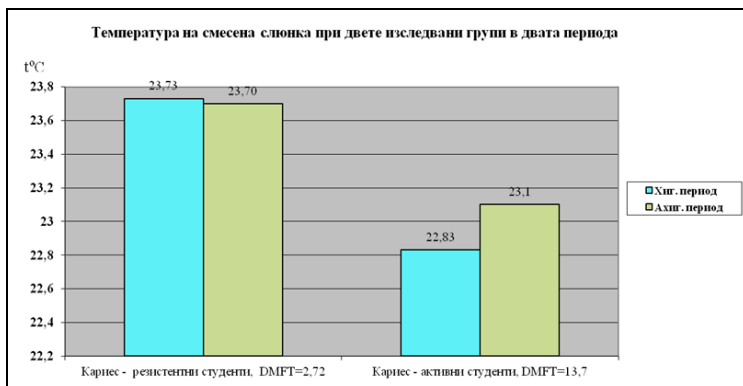
1. Не се установяват статистически значими разлики в средните стойности на рН в хигиенен и ахигиенен период между двете изследвани групи лица, независимо с кой метод са определяни ($p > 0,05$).

2. Измерена е и сигнификантно по-ниска средна температура на слюнчените проби при кариес-активните студенти в

сравнение с кариес-резистентните и в двата изследвани периода (хигиенен, $p=0,03$; ахигиенен, $p=0,015$).

3. В ахигиенния период средните стойности на рН и в двете групи намаляват достоверно в сравнение с изходните стойности ($p<0,05$). Изключение прави единствено измерването на рН с ленти на слюнката в областта на горната челюст, при което при кариес-резистентната група в хигиенен период се отчита по-ниска средна стойност на рН в сравнение с ахигиенния период.

4. Установява се статистически достоверно по-висока екстраорална температура на смесената слюнка при кариес-резистентните студенти и в двата периода (хигиенен, $t^{\circ}\text{C}=23,73^{\circ}\text{C}$; ахигиенен, $t^{\circ}\text{C}=23,70^{\circ}\text{C}$). Недостоверно намалява екстраорално измерената температура на смесена слюнка в ахигиенен период и при двете групи.



Фиг. 7. Стойности на температурата на смесена слюнка при изследваните групи лица

5. РЕЗУЛТАТИ ЗА БУФЕРНИЯ КАПАЦИТЕТ НА СЛЮНКАТА

На таблици 17 и 17-а са представени получените резултати от определянето на буферния капацитет на смесена слюнка. С висок буферен капацитет в хигиенния период се установяват само 10% от кариес-резистентните жени и 20% от кариес-резистентните мъже или 15% от всички кариес-резистентни

лица. При кариес-активните студенти висок буферен капацитет в хигиенния период показват само 10% от мъжете или 5% от всички изследвани кариес-активни лица (табл. 17 и 17-а).

След спазване на 24-часов ахигиенен период висок буферен капацитет на слюнката демонстрират единствено кариес-резистентните мъже – 10% (табл. 17).

Табл. 17. Резултати от определяне на буферния капацитет на слюнката

DMFT-група	ПОЛ	Буферен капацитет на слюнка					
		Хигиенен период			След 24-часов ахигиенен период		
		Нисък	Межди-нен	Висок	Нисък	Межди-нен	Висок
Кариес-активни студенти DMFT≥9 n=23	Жени n=13	70%	30%	–	80%	20%	–
	Мъже n=10	60%	30%	10%	60%	40%	–
Кариес-резистентни студенти DMFT≤5 n=21	Жени n=11	70%	20%	10%	50%	50%	–
	Мъже n=10	40%	40%	20%	50%	40%	10%

Табл. 17-а. Сравнителен анализ на буферния капацитет на слюнката на изследваните лица в двата периода

Показател		DMFT-група				p-стойност
		Кариес-активни		Кариес-резистентни		
		Бр.	%	Бр.	%	
Буферен капацитет (хигиенен период)	Нисък	15	65,0	12	55,0	0,505
	Среден	7	30,0	6	30,0	
	Висок	1	5,0	3	15,0	
	Общо	23	100,0	21	100,0	
Буферен капацитет (ахигиенен период)	Нисък	16	70,0	11	50,0	0,290
	Среден	7	30,0	9	45,0	
	Висок	0	0,0	1	5,0	
	Общо		100,0		100,0	
p-стойност		0,655		0,480		

Статистическият анализ на резултатите не установи статистически значими разлики в буферния капацитет на слюнката при сравнението между кариес-активните и кариес-резистентните пациенти в хигиенен и ахигиенен период. Не се установяват статистически значими разлики и след 24-часов ахигиенен период в сравнение с хигиенния период (табл. 17-а, $p > 0,05$).

6. РЕЗУЛТАТИ ОТ МИКРОБИОЛОГИЧНИТЕ ТЕСТОВЕ

Табл. 18. Резултати от микробиологичното изследване

Група Период	Микроб- ни числа	Кариес- активни		Кариес- резистентни		p
		n=23	%	n=21	%	
Хигиенен	<i>Str. mutans</i>					
	10^2	11	46,9	13	61,35	n.s.
	10^5	7	29,25	8	38,65	n.s.
	10^7	5	23,85	0	0	<0,05
	<i>Lactobacillus</i>					
	10^2	10	41,9	12	56,8	n.s.
	10^5	8	33,1	9	43,2	n.s.
10^7	5	25,0	0	0	<0,05	
Ахигиенен	<i>Str. mutans</i>					
	10^2	0	0	1	5,0	n.s.
	10^5	9	39,25	14	66,8	n.s.
	10^7	8	34,25	6	28,20	n.s.
	10^9	6	26,50	0	0	<0,001
	<i>Lactobacillus</i>					
	10^2	1	3,85	6	28,65	<0,05
	10^5	10	43,05	11	52,75	n.s.
	10^7	7	29,25	4	18,60	n.s.
10^9	5	23,85	0	0	<0,05	

На табл. 18 са представени резултатите от микробиологичното изследване. Отчитането на резултатите за *Str. mutans* и лактобацилите е:

- $\leq 10^5$ CFU/ml – нисък риск за развитие на зъбен кариес;
- $> 10^5$ CFU/ml, но $< 10^7$ CFU/ml – умерен риск за развитие на зъбен кариес;

- $\geq 10^7$ CFU/ml – висок риск за развитие на зъбен кариес;
- $\geq 10^9$ CFU/ml – много висок риск за развитие на множествен, рампантен зъбен кариес.

Изводите, които могат да се изведат, са следните (табл. 18):

1. Разпределението по категории според степента на микробното число, както за стрептококите в хигиенен и ахигиенен период, така и за лактобацилите в ахигиенен период между кариес-активните и кариес-резистентните студенти, показва статистически значими разлики (табл. 18, $p < 0,05$).

2. В хигиенния период на изследване и при двата вида бактерии микробните числа със стойност 10^7 CFU/ml са със сигнификантно по-висок относителен дял при кариес-активните.

3. В ахигиенния период на изследване и при двата вида бактерии микробните числа със стойност 10^9 CFU/ml са със статистически значим по-висок относителен дял при кариес-активните, като при *Lactobacillus* процентът на тези, които са с микробно число 10^2 CFU/ml, е сигнификантно по-висок при резистентните на кариес участници (табл. 18, $p < 0,05$).

7. БИОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕНЗИМИТЕ АЛФА-АМИЛАЗА, АЛКАЛНА И КИСЕЛА ФОСФАТАЗА В СМЕСЕНА СЛЮНКА

От таблици 19 и 19-а се вижда, че тенденцията и при двата ензима – *кисела и алкална фосфатаза*, е еднаква за двата пола както при кариес-активните, така и при кариес-резистентните студенти, и тя е повишаване на стойностите на ензимите в ахигиенния период. Тенденцията за *α -амилазата* е обратна – понижаване на стойностите на ензима в ахигиенния период както при кариес-активните, така и при кариес-резистентните студенти и при двата пола (табл. 19 и 19-а, $p < 0,05$). Стойностите на ензима *алкална фосфатаза* в слюнката са под долната граница на дадените референтни стойности и за двата изследвани периода (табл. 19).

Табл. 19. Резултати на изследваните ензими в нестимулирана слюнка

Референт. стойности	Кисела фосфатаза (U/L)		Алкална фосфатаза (U/L)		α-амилаза (U/L)	
	0–5,5 U/L		50–170 U/L		60–180 U/L	
	Хигиен- ен период	Ахигиен- ен период	Хигиен- ен период	Ахигиен- ен период	Хигиен- ен период	Ахигиен- ен период
Група						
Кариес- активни жени, n=13	18,11	41,04	9,39	12,11	99,34	61,43
Кариес- резистентни жени, n=11	18,04	37,60	9,55	12,07	99,65	56,98
Кариес- активни мъже, n=10	25,99	31,36	7,64	11,84	71,30	41,96
Кариес- резистентни мъже, n=10	24,08	40,07	8,48	10,78	129,06	84,42

Табл. 19-а. Сравнителен анализ на стойностите на изследваните ензими

Показател		DMFT-група						p- стойност
		Кариес-активни			Кариес-резистентни			
		Бр.	Средна	Ст. откл.	Бр.	Средна	Ст. откл.	
АФ U/L	Хиг. период	23	8,52	7,16	21	9,02	6,85	0,971
	Ахиг. период	23	11,98	8,85	21	11,43	8,28	0,819
	p-стойн.		0,129			0,188		
КФ U/L	Хиг. период	23	22,05	14,79	21	21,06	11,13	0,965
	Ахиг. период	23	36,20	19,18	21	38,83	20,76	0,617
	p-стойн.		0,003			0,001		
α- амила- за	Хиг. период	23	85,32	42,30	21	114,36	89,35	0,210
	Ахиг. период	23	51,70	36,13	21	70,70	59,49	0,248
	p-стойн.		0,002			0,001		

Стойностите на *киселата фосфатаза* при всички групи и в двата периода са над горната граница на представените референтни стойности (табл. 19). Регистрираните нива за *α-амилазата* в хигиенния период на изследването са в границите на нормалните референтни стойности при всички групи (табл. 19). Изведени са следните констатации от анализа на резултатите:

1. Не се установяват сигнификантни разлики в средните стойности на ензимите алкална фосфатаза, кисела фосфатаза и алфа-амилаза в двете изследвани групи от студенти – кариес-активни и кариес-резистентни, независимо дали са измерени в хигиенен или в ахигиенен период (табл. 19-а).

2. Установяват се сигнификантно по-високи средни стойности на киселата фосфатаза при измерване след ахигиенен период в сравнение с хигиенния и в двете групи изследвани лица, като в групата на кариес-активните се наблюдава гранична по сигнификантност разлика (табл. 19-а, $p=0,003$).

3. Установяват се сигнификантно по-ниски средни стойности на алфа-амилазата в ахигиенния период, в сравнение с хигиенния и в двете групи изследвани лица (табл. 19-а).

8. РЕЗУЛТАТИ ОТ БИОХИМИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕЛЕКТРОЛИТИ – СА И P, В СМЕСЕНА СЛЮНКА

Получените резултати относно средните стойности на изследваните електролити в нестимулирана, неразредена, смесена слюнка са показани в таблици 20 и 20-а. Всички резултати са в посочените за нормални граници.

От данните в табл. 20 се вижда тенденцията за повишаване на стойностите на калция в ахигиенния период при кариес-активните и кариес-резистентните жени. При мъжете и от двете изследвани групи се наблюдава обратна тенденция – за понижаване на стойностите на калция в ахигиенния период. Получените резултати и за двата изследвани електролита в двата

изследвани периода са в границите на нормалните референтни стойности (табл. 20). Най-ниски стойности за калция са отчетени при кариес-активните мъже в ахиgienния период.

Табл. 20. Резултати от изследването на електролити в нестимулирана слюнка

Референтни стойности*	Ca (mmol/l)		P (mmol/l)	
	0,75–1,75 mmol/l		2,0–5,0 mmol/l	
Група	Хигиенен период	Ахиgienен период	Хигиенен период	Ахиgienен период
Кариес-активни жени, n=13	1,11	1,37	4,29	4,27
Кариес-резистентни жени, n=11	1,22	1,42	4,91	5,57
Кариес-активни мъже, n=10	0,93	0,87	4,44	4,45
Кариес-резистентни мъже, n=10	1,09	1,08	4,73	4,27

* *no Edgar, Dawes and O'Mullane, 2004*

В рамките на настоящото изследване не се установяват статистически достоверни разлики в получените резултати за средните стойности на калция и на фосфора в двата изследвани периода (табл. 20-а, $p > 0,05$). Данните от таблица 20-а показват, че средните стойности за калция в слюнката на кариес-активните и кариес-резистентните се повишават в ахиgienния период; за фосфора при кариес-активните няма изменение в средните стойности в двата изследвани периода, докато при кариес-резистентните средната стойност за концентрацията на фосфора (P) намалява от 4,82 mmol/l на 4,68 mmol/l в ахиgienния период ($p > 0,05$).

Табл. 20-а. Резултати от изследването на електролитите

Изследвани електролити		Група		Карис-активни		Карис-резистентни	
		Статистика	р-стойност	Статистика	р-стойност		
Калций (хигиенен период):	Брой (n)	23	0,388	21	0,822		
	Средна	1,020		1,155			
	Ст. откл.	0,492		0,493			
Калций (ахигиенен период):	n	23		21			
	Средна	1,120		1,250			
	Ст. откл.	0,575		0,574			
Фосфор (хигиенен период):	n	23	0,388	21	0,639		
	Средна	4,365		4,820			
	Ст. откл.	1,539		1,184			
Фосфор (ахигиенен период):	n	23		21			
	Средна	4,360		4,920			
	Ст. откл.	1,229		0,953			

От анализа на получените резултати от изследването на електролити в смесена слюнка (табл. 20-а) се констатира, че:

1. По-ниски стойности на калций в слюнката са регистрирани при карис-активните лица и в двата изследвани периода – хигиенен и ахигиенен, без това да е статистически

достоверно при изследваните лица (табл. 20-а, $p > 0.05$). Те са в долната граница на нормата при кариес-активните мъже.

2. Аналогични са резултатите за фосфора в хигиенен период – по ниски стойности се установяват при кариес-активните мъже и жени.

3. Не се установяват сигнификантни разлики в средните стойности на калция и фосфора между двете групи участници – кариес-активни и кариес-резистентни, определени в двата периода (табл. 20-а, $p > 0.05$).

4. Не се установяват сигнификантни разлики в средните стойности на калция и фосфора и между хигиенен и ахигиенен период в двете изследвани групи студенти (табл. 20-а, $p < 0.05$).

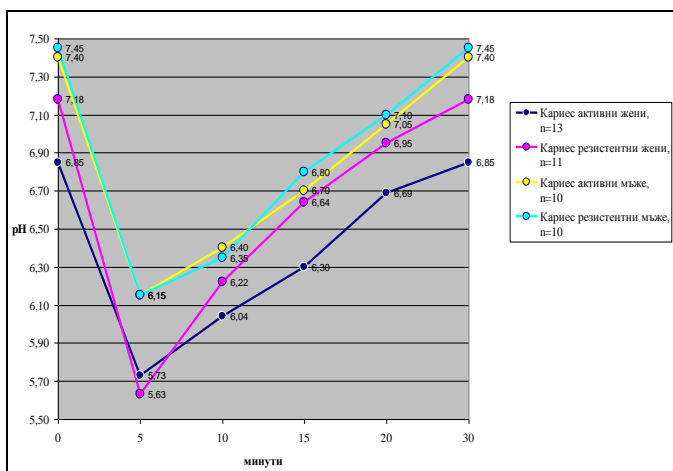
9. РЕЗУЛТАТИ ОТ КЛИНИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ОРАЛНИЯ ВЪГЛЕХИДРАТЕН КЛИРЪНС НА КАРИЕС-АКТИВНИ И КАРИЕС-РЕЗИСТЕНТНИ ЛИЦА

На табл. 21 се наблюдава, че средното изходно рН на изследваните лица във всички групи е доста високо, но е в границите на нормата – от 6,85 до 7,45. При разделяне на групите по пол се наблюдават по-високи средни стойности на изходното рН на слюнката на мъжете в сравнение с изходното рН на жените. Най-високи средни стойности показват кариес-резистентните мъже. Точката на достигнатото най-ниско рН – *пиковата стойност* е на 5-та минута, след което започва повишаване на рН, отчетено на 10-та, 15, 20 и 30-та минута, когато се възстановяват напълно изходните стойности (фиг. 8 и

9). Получените стойности за рН при всички групи са над „критичната” стойност от 5,5.

Табл. 21. Средни стойности на рН на слюнката след изплакване с 5% разтвор на захароза при участниците разделени по пол

Група	Показател	Средни стойности на рН/време на отчитане					
		0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
Кариес-активни жени, n=13		6,85	5,73	6,04	6,30	6,69	6,85
Кариес-резистентни жени, n=11		7,18	5,63	6,22	6,64	6,95	7,18
Кариес-активни мъже, n=10		7,40	6,15	6,40	6,70	7,05	7,40
Кариес-резистентни мъже, n=10		7,45	6,15	6,35	6,80	7,10	7,45

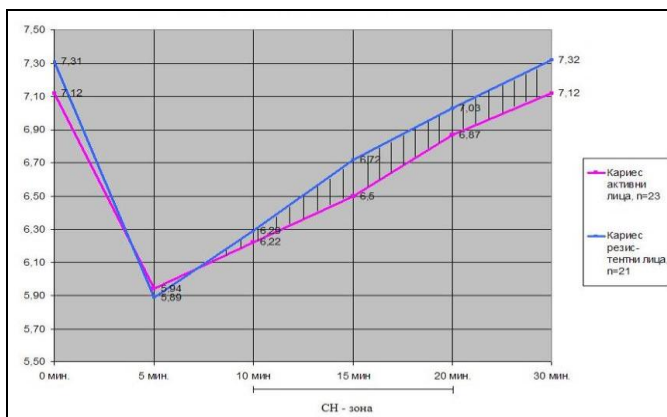


Фиг. 8. Средни стойности на рН на слюнката след изплакване с 5% разтвор на захароза, при разделените по пол лица

Табл. 22. Средни стойности за рН на слюнката след изплакване с 5% разтвор на захароза при двете изследвани групи участници

Показател Група	Средни стойности на рН/време на отчитане					
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
Кариес-активни лица, n=23	7,12	5,94	6,22	6,50	6,87	7,12
Кариес-резистентни лица, n=21	7,31	5,89	6,29	6,72	7,03	7,32

На фиг. 9. е показана СН-зоната – от 10-та до 20-та минута, която е с по-ниски стойности при кариес-активните лица.



Фиг. 9. Средни стойности на рН на слюнката след изплакване с 5% разтвор на захароза при кариес-активни и кариес-резистентни лица

На таблица 23 са представени данните от сравнителния статистически анализ на средните рН стойности на слюнката, отчетени при двете изследвани групи (активни и резистентни).

Табл. 23. Сравнителен анализ на рН на нестимулирана слюнка при изследване на въглехидратен клирънс в двете групи

Време на отчитане на рН на нест. слюнка	DMFT– група						p-value
	Карис-активни			Карис-резистентни			
	n	\bar{x}	SD	n	\bar{x}	SD	
0 минути	23	7,12	0,56	21	7,31	0,37	0,130
5 минути	23	5,94	0,65	21	5,89	0,67	0,873
10 минути	23	6,22	0,58	21	6,29	0,46	0,670
15 минути	23	6,50	0,49	21	6,72	0,41	0,090
20 минути	23	6,87	0,49	21	7,03	0,33	0,174
30 минути	23	7,12	0,56	21	7,32	0,37	0,130

Табл. 24. Сравнителен анализ на динамиката на рН на слюнката в изследваните групи

Показател Група	Период от време (минути)	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	SD	p-value
Карис-активни	0–5	1,18	0,60	<0,001
	5–10	-0,28	0,29	<0,001
	10–15	-0,28	0,30	<0,001
	15–20	-0,37	0,34	<0,001
	20–30	-0,25	0,30	0,001
Карис-резистентни	0–5	1,42	0,62	<0,001
	5–10	-0,40	0,46	0,001
	10–15	-0,43	0,29	<0,001
	15–20	-0,31	0,25	<0,001
	20–30	-0,29	0,34	0,001

Констатациите, които могат да се направят от анализа на таблици 21, 22, 23 и 24, са:

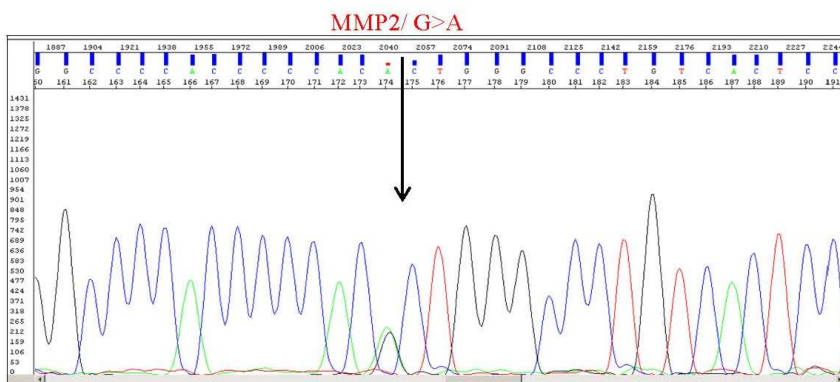
1. Различие с гранична сигнификантност ($p=0,09$) (табл. 23) между кариес-активната и кариес-резистентната група се установява единствено на 15-та минута, при която при резистентните на кариес участници в проучването средната стойност е по-висока.

2. Оралният въглехидратен клирънс на слюнката разгледан в динамика, и при двете групи се различава статистически достоверно във всяка една от времевите точки на измерване. На петата минута се установява сигнификантен спад, след което се наблюдава перманентно повишение.

10. РЕЗУЛТАТИ ОТ ГЕНЕТИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КАРИЕС-СВОБОДНИТЕ, КАРИЕС-АКТИВНИТЕ И КАРИЕС-РЕЗИСТЕНТНИТЕ УЧАСТНИЦИ

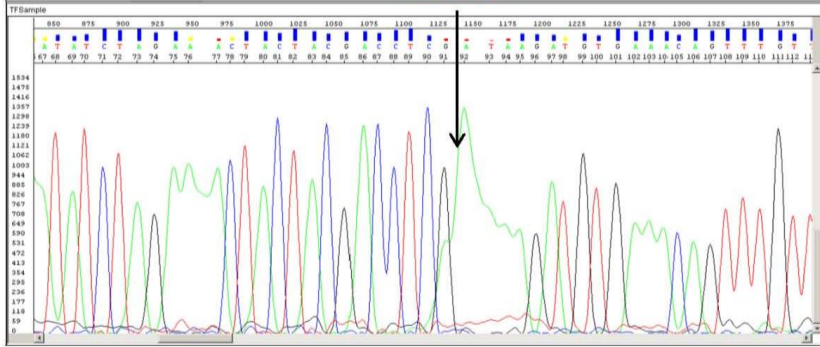
Генотипирани са 102-ма доброволци (42 мъже и 60 жени) за следните полиморфизми: rs2287074 в MMP2 гена и rs679620 в MMP3 гена. На фиг. 10 и 11 със стрелки са показани местата на нуклеотидна замяна при секвенирането по Sanger за двата полиморфизма в изследваните гени. Разпределението на алелните и генотипните честоти е показано в таблица 26. Не са установени разлики във възрастовото и половото разпределение между групите. Независимото разглеждане на двата единични нуклеотидни полиморфизма показва, че генотипните разпределения съответстват на равновесието на Харди-Вайнберг сред групата на свободните от кариес участници. Статистическият анализ на ген MMP2 показва достоверни

разлики между алелните и генотипните честоти при свободните от кариес и кариес-резистентните студенти (табл. 25). Установени са статистически значими разлики и между групата на кариес-резистентните и тази на кариес-активните участници за несинонимните MMP3 SNP (табл. 25). При разделяне на трите групи по пол не са установени статистически значими разлики между групите и MMP2 алела и генотипните честоти. След статистически анализ на MMP3 се установява, че сигнификантната разлика между кариес-резистентната и кариес-активната група се дължи на случаите сред жените, а не сред мъжете (табл. 26 и 27). След статистическата обработка с програмата SPSS 16.0 става ясно, че алел G от MMP2 гена е протективен фактор, а алел A от MMP3 гена е рисков фактор за развитието на зъбен кариес (табл. 25, 26 и 27).



Фиг. 10. Секвениране по Sanger на полиморфизъм rs2287074 (с.1380G>A) в MMP2 гена

MMP3/ A>G



Фиг. 11. Секвениране по Sanger на полиморфизъм rs679620 (с.133A>G) в MMP3 гена

Табл. 25. Аленно и генотипно разпределение в кохортните групи (n=102) на полиморфизмите в гените за MMP2 и MMP3

Показател Група	DMFT=0	DMFT≤5	DMFT≥9	DMFT=0/ DMFT≤5	DMFT≤5/ DMFT≥9
	n=20	n=41	n=41		
ген MMP2					
rs2287074	n (%)	n (%)	n (%)		
алел G	19 (48)	26 (32)	34 (41)	p = 0,041	p>0,05
алел A	21 (52)	56 (68)	48 (59)		
генотип GG	3 (15)	4 (10)	8 (19)	p = 0,048	p>0,05
генотип GA	13 (65)	18 (44)	18 (44)		
генотип AA	4 (20)	19 (46)	15 (37)		
ген MMP3					
rs679620	n (%)	n (%)	n (%)		
алел A	23 (58)	32 (39)	41 (50)	p>0,05	p = 0,008
алел G	17 (42)	50 (61)	41 (50)		
генотип AA	7 (35)	9 (22)	7 (17)	p>0,05	p = 0,013
генотип AG	9 (45)	14 (34)	27 (66)		
генотип GG	4 (20)	18 (44)	7 (17)		

Табл. 26. Алелно и генотипно разпределение на полиморфизми в гените на MMP2 и MMP3 сред групата на жените (n=60)

Показател Група	DMFT=0	DMFT≤5	DMFT≥9	DMFT=0	DMFT≤5
	n=13	n=23	n=24	DMFT≤5	DMFT≥9
ген MMP2					
rs2287074	n (%)	n (%)	n (%)		
алел G	13 (50)	15 (33)	19 (40)	p>0,05	p>0,05
алел A	13 (50)	31 (67)	29 (60)		
генотип GG	3 (23)	1 (4)	5 (21)		
генотип GA	7 (54)	13 (57)	9 (37)	p>0,05	p>0,05
генотип AA	3 (23)	9 (39)	10 (42)		
ген MMP3					
rs679620	n (%)	n (%)	n (%)		
алел A	15 (58)	18 (39)	26 (50)	p>0,05	p = 0,007
алел G	11 (42)	28 (61)	22 (50)		
генотип AA	5 (38)	5 (22)	4 (17)		
генотип AG	5 (38)	8 (34)	18 (75)	p>0,05	p = 0,014
генотип GG	3 (24)	10 (44)	2 (8)		

Табл. 27. Аелно и генотипно разпределение на полиморфизми в MMP2 и MMP3 сред групата на мъжете (n=42)

Показател Група	DMFT=0	DMFT≤5	DMFT≥9	DMFT=0/ DMFT≤5	DMFT≤5 DMFT≥9
	n=7	n=18	n=17		
ген MMP2					
rs2287074	n (%)	n (%)	n (%)		
алел G	6 (43)	11 (31)	15 (44)	p>0,05	p>0,05
алел A	8 (57)	25 (69)	19 (56)		
генотип GG	0 (0)	3 (17)	3 (18)		
генотип GA	6 (86)	5 (28)	9 (53)	p>0,05	p>0,05
генотип AA	1 (14)	10 (55)	5 (29)		
ген MMP3					
rs679620	n (%)	n (%)	n (%)		
алел A	8 (57)	14 (39)	15 (44)	p>0,05	p>0,05
алел G	6 (43)	22 (61)	19 (56)		
генотип AA	2 (29)	4 (22)	3 (18)		
генотип AG	4 (57)	6 (34)	9 (53)	p>0,05	p>0,05
генотип GG	1 (14)	8 (44)	5 (29)		

Констатациите от получените резултати са:

1. Анализът на аелното и генотипното разпределение на полиморфизмите в гените за MMP2 и MMP3 показва статистически достоверни разлики между кариес-активните и кариес-резистентните лица под 30-годишна възраст.

2. Недостоверна е разликата между кариес-резистентните и свободните от кариес лица (DMFT=0).

V. ОБСЪЖДАНЕ

Обсъждане по задача 1 и подзадача 1.1. Подбор на подходящи за настоящото изследване кариес-активни и кариес-резистентни лица. Клинични прегледи, изчисляване на DMFT и групиране на участниците

Въпросите, свързани с денталното здраве на хората над 18–20-годишна възраст и качеството на живот в България са разглеждани, но се нуждаят от по-задълбочено изследване. В тази насока усилията са оправдани и те биха помогнали за създаването на основа за подобряване на състоянието на денталното здраве на населението. Дефинирането на изследваните групи на кариес-активни и кариес-резистентни е основано на десетилетен опит в скрининга и лечението на млади пациенти и студенти от Факултета по дентална медицина – гр. София, както и на проучванията на много изследователи в областта по проблемите на епидемичността на зъбния кариес. Обект на настоящото изследване са млади лица, студенти от ФДМ, МУ – София. В случая изследваните лица са специфична група от подбрани лица на възраст от 20 до 30 години, без общи и хронични заболявания, без пародонтални и лигавични заболявания, без протетични възстановявания и конструкции – инлеи, онлеи, обвивни корони, мостови конструкции и имплантати. Подбраните участници са разделени на 2 групи – кариес-активни и кариес-резистентни, съгласно критериите на СЗО за стойностите на индекса DMFT, но по наша модификация, съобразно с по-високата заболеваемост от кариес в България и поради недостатъчния брой свободни от кариес студенти.

Ролята на общата, смесена слюнка сама по себе си и при идеални условия може да се изследва, само когато в устата няма протетични конструкции, изработени от различни метали и метални сплави, за да се предотвратят хетерогенни химични взаимодействия със слюнката, корозионни потенциали и

патогалванизъм; когато не се приемат периодично медикаменти във връзка с поддържащо лечение на общи и системни хронични заболявания и без лекарствена екскреция в смесената слюнка. Нужно е да се елиминира действието на факторите: хормони, възрастовите промени, свързани с понижаване на слюноотделянето и обмяната на веществата, като цяло. Трябва да се има предвид, че в този случай става въпрос за хора с предполагаемо ниво на обща и здравна култура над средното, което оказва влияние върху оралния им статус. Регистрираните от нас средни стойности за DMFT на изследваните доброволци са: при жените 7,77 и 8,65 при мъжете. Допълнително участниците са разделени на кариес-резистентни (DMFT до 5,0) и кариес-активни (DMFT над 9,0) съгласно изискванията на СЗО, но по наша модификация и подобно на авторите Ahumada et al., които разширяват стойностите за DMFT/S и dmft/s за кариес-резистентните пациенти до стойност 6,0. Разделянето е направено и съобразно получените резултати от клиничните прегледи за заболяемостта на изследваните лица от зъбен кариес и условията на страната ни, в която липсват профилактични програми на национално ниво. Получените средни стойности за DMFT са основно за сметка на FT компонентата на избрания индекс (DMFT) и са съпоставими с данните от четири български проучвания. Първото е проведено през 2002 г. и включва 44 пациенти на ФДМ – София, на възраст от 18–25 г. Второто е от 2003 г. и включва 57 студенти по дентална медицина на същата възраст. В първото проучване данните за стойностите на DMFT са: при жените DMFT=11,8, при мъжете DMFT=10,2 и съответно във второто: при жените DMFT = 9,9, при мъжете DMFT= 9,8.

Стойностите за DMFT, регистрирани в тези проучвания, както при студентите, така и при пациентите, са доста над 6,5, като DMFT-стойностите при студентите по дентална медицина са по-ниски в сравнение с тези на пациентите от проучванията.

Това би могло да се обясни с по-добрата информираност и здравна култура на студентите относно правилните хигиенни и хранителни навици и превантивните мерки по отношение на кариеса и усложненията му.

Разпространението и заболяемостта от зъбен кариес в света е различно. Дори в рамките на една единствена страна географските и социалните фактори оказват силно влияние върху развитието на зъбен кариес. Финансовите възможности в частност се считат също, като рисков фактор в етиопатогенезата на зъбния кариес. Според различни изследвания епидемичността на кариеса в България е в рамките на 76–97% и се повишава с възрастта. Това налага необходимостта от ефективна профилактика на населението, повишаване на здравната култура, навременна и точна диагностика и лечение на зъбния кариес.

Обсъждане по задача 2. Анкетно проучване на изследваните лица – чрез анкетен метод и интервю да бъдат проучени хранителните, хигиенните и вредните навици при млади и здрави български лица от 20 до 30-годишна възраст без пародонтални, лигавични и общи заболявания

За нуждите на настоящото проучване е създадена анкетна карта, писмено попълнена от всички участници. Разпределението по пол при всички анкетирани е равномерно. Анкетното проучване показва, че съществуват малки разлики в резултатите на изследваните групи лица и не се откриват статистически достоверни разлики по отношение на: образование и професия на родителите, хранителни, хигиенни и вредни навици, флуорна профилактика, провеждано ортодонтско лечение, честота на редовните профилактични прегледи при дентален лекар. Анализът на данните за хранителните навици и предпочитания показва сериозни грешки в храненето на участниците, които водят до дълготрайни нарушения в оралната хомеостаза.

Разлики по отношение на честотата на миене на зъбите на изследваните лица в това изследване не се установяват (табл. 10

и 10-а). Според резултатите от направената анкета доброволците почистват зъбите си предимно два пъти на ден, като използват основно четка и паста за зъби (табл. 10 и 10-а). Интерес представлява фактът, че кариес-активните жени са тези, които в най-голям процент употребяват допълнителни средства за лична орална хигиена – плак-инхибиращи разтвори (70%) и дентални конци за почистване на междузъбните пространства (80%), а клечки за зъби използват най-много кариес-резистентните мъже – 60% от анкетираните (табл. 10). Получените от нас резултати относно хигиенните навици на изследваните лица се различават от тези на Madléna et al.

В настоящото изследване на всички участници преди клиничните прегледи е направена професионална клинична орална хигиена, с регистриране на плаковия хигиенен индекс (HI), резултатите от който са представени в табл. 3.

От анкетния метод на изследване се установи, че най-много доброволци с проведена флуорна профилактика и ортодонтско лечение има сред кариес-резистентните участници, като най-голям е дялът на кариес-резистентните жени (табл. 8 и 9). Изводите, които се извеждат са следните:

1. Разликите между кариес-активните и кариес-резистентните студенти по отношение на: образование и професия на родителите, хранителни, хигиенни и вредни навици, флуорна профилактика, ортодонтско лечение са малки и статистически достоверни разлики не се установяват (табл. 4–13), с изключение на посещенията при денталния лекар (табл. 12). Това потвърждава хомогенността на групите от подбраните участници в изследването.

2. Добре изразена е обратнопропорционалната зависимост между рН стойностите на смесената слюнка и разпространението на кариеса (DMFT) при изследваните лица (табл. 2, 14, 15, 16, 16-а).

Обсъждане по задача 3 и подзадача 3.1. *Определяне на нивото на нестимулирания слюнчен поток и буферния капацитет на слюнката на кариес-активни и кариес-резистентни лица от двата пола*

Изследваният от нас нестимулиран слюнчен поток при здрави индивиди на възраст от 20 до 30 години е с нормални стойности и при двете групи изследвани лица: кариес-активни и кариес-резистентни (средно около 0,6 ml/min) в двата периода на изследване. Получените разлики не са полово обусловени, като се отчете слабо понижение по време на ахиgienния период - средно около 0,5 ml/min (табл. 14, 15 и 16). Отчетените стойности са в съответствие с установените от М. Маринова при пациенти с рецесии в групата до 25 години и от Е. Карова – при здравите контроли (20–55 г.), при изследване на слюнката и денталното здраве при астматици, а също и на авторите Flink H., A. Tegelberg, F. Lagerlöf (2005 г.). Последните експериментално потвърждават, че времето на събиране на пробите слюнка през деня е от важно значение за полученото количество нестимулирана обща слюнка. Събирането на слюнката на участниците в настоящото изследване се извършва в сутрешните часове на денонощието (9.30–11.30 ч.), което е едно от условията за обективизиране на изследванията на слюнка според С. Dawes. Участниците в изследването са предварително информирани и инструктирани – за целите на изследването да не са закусвали, като по време на събирането на пробите са помолени да не говорят, за да се избегнат допълнителни стимули.

Leone и Oppenheim установяват, че хронично ниското ниво на слюнчения поток (по-малко от 0,8–1,0 ml/min за стимулираната слюнка) е най-важният индикатор за повишен риск от зъбен кариес. Установено е, че при повишаване на нивото на слюнчения поток се наблюдава тенденция към по-бързо отстраняване на въглехидратите от устата и към раздвижване на много финия биофилм, който покрива повърхностите на зъбите и

узната лигавица, докато слабата секреция на слюнката често е съпроводена от ниска буферна способност и голямо количество *Str. mutans*.

Обсъждане по подзадачи 3.2 и 3.3. Сравнително интраорално и екстраорално изследване на рН на нестимулирана смесена слюнка при двете изследвани групи в хигиенен и ахигиенен период

В настоящият дисертационен труд обект на изследванията е нестимулираната, смесена слюнка, която по литературни данни оказва по-значимо влияние върху оралното здраве, отколкото стимулираната. Киселинността на слюнката зависи от концентрацията на бикарбонатите, като колкото по-голяма е тя, толкова по-високо е рН. При това концентрацията на бикарбонатите в слюнката е в правопрпорционална зависимост с нивото на слюнчения поток. При нормални условия рН стойностите на смесената слюнка варират в диапазона между 6,0 и 7,0, като рН на нестимулираната слюнка е със средна стойност от 6,8. Лицата с присъщо ниско рН на слюнката, например 6,2, са по-склонни да развият дентален кариес в зависимост от техните хранителни навици и орална хигиена. В настоящото изследване интраорално определеното рН на смесената, нестимулирана слюнка с рН-ленти не отчита отклонения от границите на физиологичната норма: рН=6,7–7,4, без да са установени статистически достоверни разлики между сравняваните групи, включително и след 24-часов ахигиенен период. Изключение правят кариес-активните жени, при които след спазен ахигиенен период се отчита най-ниска стойност за рН на смесената слюнка (рН=6.5; табл. 14 и 15), което е потвърдено и от по-точното екстраорално определяне с рН-метър (табл. 16).

Резултатите от екстраоралното определяне на рН чрез трикратно измерване на всяка проба, във всеки период, показват корелация със стойностите на рН на смесената слюнка,

изследвана с рН-лентите, в двата периода на измерването (табл. 16).

При екстраорално измерване на рН на течност, каквато е слюнката, трябва да се вземе под внимание и температурата на околната среда, в случая стайната температура. Поради изпаряване на CO_2 рН на слюнката може да се повиши. Това повишаване на рН се дължи на наличното равновесие на въглеродната киселина в слюнката ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$). При разтварянето на CO_2 в слюнката равновесието се премества на дясната страна на уравнението, което води до намаляване на количеството на водородни катиони (H^+), причиняващо увеличаване на рН на слюнката. От химията е известно, че: $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$, където $K_w = [\text{H}_3\text{O}^+].[\text{OH}^-]$ е автопротолизната константа на водата (или йонно произведение на водата). Тази константа е температурно зависима:

$$K_w = 1.10^{-14} \text{ mol}^2/\text{l}^2 \text{ за } 22^\circ\text{C}$$

$$K_w = 1,37.10^{-15} \text{ mol}^2/\text{l}^2 \text{ за } 0^\circ\text{C}$$

$$K_w = 1,29.10^{-14} \text{ mol}^2/\text{l}^2 \text{ за } 25^\circ\text{C}$$

$$K_w = 7,42.10^{-13} \text{ mol}^2/\text{l}^2 \text{ за } 100^\circ\text{C}$$

С повишаване на температурата рН скалата се стеснява и неутралното рН намалява. Съответно при понижаване на температурата рН скалата се разширява и неутралното рН нараства. Измерванията в изследването са направени при стайна температура в границите от 21–23°C, средно 22°C.

Получените от нас резултати за рН на слюнката съвпадат с тези от изследванията на други български автори. Сравнителният анализ на резултатите между двете групи студенти, включително и след разделянето им по пол, не установява сигнификантни разлики в орално-хигиенните навици (табл. 10 и 10-а, $p > 0.05$), поради което не следва да се има предвид при разглеждане на локалните фактори в развитието на зъбния кариес. На първо място, сред общите, системни фактори в развитието на зъбния

кариес следва да се разгледат слюнката и промените, които настъпват в нея под действие на хранителния режим. Особено важни фактори са видът на системно приеманата храна, концентрацията на основните хранителни вещества в нея, консистенцията и адхезията. Изброените особености влияят на количеството и качествата на слюнката. Намалването на количеството слюнка води до повишаване на риска от развитие на зъбен кариес.

pH е важен параметър и в микробната екология на устата. При понижаване на pH по дефиниция се активират буферните системи на слюнката (бикарбонати, фосфати, протеини), които са ефективни антагонисти на киселините, което, от своя страна, играе роля при предпазването на зъбните структури от развитие на зъбен кариес. Ericsson определя буферния капацитет на слюнката, като *нормален* – при стойности за pH=5,0–7,0, *понижен* – при pH=5,0–4,0 и *нисък* – при pH под 4,0. Тези стойности от средата на XX век са остарели и днес, в ерата на флуоридите, не звучат така актуално.

Добре изразена е обратнопропорционалната зависимост между pH стойностите на нестимулираната смесена слюнка и разпространението на кариеса (DMFT) при изследваните от нас лица. Очевидно не са нарушени и засегнати всички буферни качества на смесената слюнка при изследваните групи, тъй като дори след спазен 24-часов ахигиенен период pH на смесената слюнка не се понижава под 6,5. Системната консумация на рафинирани въглехидратни храни между основните хранения при кариес-активните жени обуславя повишеното киселинообразуване и понижените стойности на pH на тяхната смесена слюнка (табл. 7, 14, 15, 16).

Относно температурата на слюнката Eastoe и Cole считат, че е пряко свързана с телесната температура, с хидратацията на макроорганизма и с вискозитета на телесните течности. Температурата на околната среда също може да окаже влияние

върху отчетените показания. Във връзка с наши дългогодишни изследвания на взаимовръзката между количеството, буферния капацитет и състава на смесената, нестимулирана слюнка, допускаме като нулева хипотеза следните възможни следствия от хронични различия и промени в температурата на смесената слюнка: влияние върху калциево-фосфатното и ензимното равновесие, локалната хидратация, титър на микроорганизмите, имуноглобулините, а също и влияние върху муцина и протекцията на зъбната пеликула. Очевидна от намерените резултати (табл. 16-а, фиг. 7) е следната зависимост: правопрпорционално на температурата намаляват калцият и фосфорът и обратнопропорционално на нея се покачват алкалната и киселата фосфатази (табл. 19 и 20). Обратнопропорционална е и зависимостта с изследваните микроорганизми. Намалените стойности на екстраоралната температура на смесената слюнка при кариес-активните индивиди вероятно е свързана с начина на дишане, който повишава сухотата в устната кухина. Това може да доведе до взаимодействие между бактериалните клетки по повърхността и богатия на муцин повърхностен слой, като оказва влияние върху агрегацията по зъбните повърхности. Възможно е да има отношение и към състава на имуноглобулините (Ig), тъй като различните автори описват различна видова характеристика на имуноглобулините в смесена слюнка. Както се вижда от фиг. 7, при кариес-активните индивиди екстраоралната температура е по-ниска, обяснение на което може да е наличие на вредни навици, например дишане с отворена уста (вкл. смесеното дишане), или тютюнопушенето и/или други нокси (ортодонтски апарати, замърсители от храната и въздуха и др.), които сериозно засягат оралната хомеостаза. Увеличаването на сухотата повишава титъра на кариесогенните, киселинообразуващи микроорганизми.

Обсъждане по подзадача 3.4. Определяне на буферния капацитет на слюнката на кариес-активни и кариес-резистентни лица

Буферният капацитет на слюнката, който се определя основно от бикарбонатите (въглеродна киселина с $pK_a=6,3$), по-малко от фосфатите ($pK_a=6,9$) и минимално от протеините (pK_a под 4,0), е от значение за неутрализирането на киселините в плаката, продуцирани от ацидогенните микроби. Бикарбонатите се разпространяват в зъбната плака и се стремят да неутрализират киселините в нея, като увеличават времето на минералните соли в слюнката, за което те трябва да реминерализират твърдите зъбни тъкани.

Най точният метод за определяне на буферната способност на слюнката е титрацията, но тъй като са необходими лабораторно оборудване и добре обучени специалисти, този метод не се прилага бързо и лесно в ежедневната дентална практика. Ериксон разработва опростен метод, който включва прибавяне на солна киселина и отстраняване на въглеродния диоксид (CO_2) от въглеродната киселина в слюнката (H_2CO_3), с помощта на мехурчета въздух. Фростел (1980 г.) още повече опростява метода и предлага прилагането на цветомеричния метод с тест-ленти – Dentobuff[®], при който предварително малко количество киселина се изсушава върху подготвена индикаторна лента за рН. Една капка от слюнката, поставена върху тест-полето, разгражда киселината и крайната рН се отчита, като промяна в цвета на рН-индикаторната лента.

Според Kidd и Joyston-Bechal буферният капацитет на слюнката се повишава след хранене и затова е препоръчително той да се определя около 2 часа след консумация на храна. Буферният капацитет в това изследване е определян в сутрешните часове на деня, на гладно и без стимулация на слюнчения поток.

Ериксон определя буферния капацитет на слюнката като нормален при $pH=5,0-7,0$, понижен при $pH=5,0-4,0$ и нисък при pH под $4,0$. Авторите Kidd и Joyston-Bechal представят същите референтни стойности за буферния капацитет. В съответствие с това нисък буферен капацитет показват 70% от изследваните кариес-активни и кариес-резистентни жени, докато при мъжете нисък буферен капацитет показват съответно 60% от изследваните кариес-активни мъже и 40% от изследваните кариес-резистентни мъже (табл. 17). Изследваният от нас буферен капацитет на слюнката показва липса на висок буферен капацитет при кариес-активните жени и в двата изследвани периода. В групата на кариес-резистентните студенти само 10% от изследваните жени показват висок буферен капацитет в хигиенен период срещу 20% от изследваните мъже, което е в корелация с по-честия прием на захарни изделия между основните хранения при жените. Най-голям процент студенти с висок буферен капацитет се регистрира в групата на кариес-резистентните мъже – 20%, което ние смятаме, че е във връзка с липсата на тютюнопушене при тях (табл. 17). Получените резултати могат да се дължат на по-честата консумация на захарни изделия от жените в сравнение с мъжете, както и на по-големия процент пушачи сред кариес-активните мъже.

Обсъждане по подзадача 3.5. *Определяне на оралния въглехидратен клирънс на смесена, нестимулирана слюнка на двете изследвани групи*

Честото излагане на захароза и произтичащите от това ниски стойности на pH , на слюнка и плака в устата намаляват времето, за което слюнката може да възстанови загубата на минерали от твърдите зъбни структури и да промени биохимичния характер на плаката, което води до високи концентрации на неразтворими полизахариди и ниски концентрации на калций, неорганичен фосфор и флуор.

Някои автори твърдят, че първите минути от прочистването на захарта от слюнката са критични. Други отдават най-голямо значение за оралния клирънс, на периода след 5–10-та до 20-та минута и наричат този период – *СН-зона*.

В настоящото *in vivo* проучване на клирънса на слюнката, като функция от времето, киселинността на контролния разтвор на захароза, измерена предварително, е 6,8. Изходните стойности на рН на слюнката при всички изследвани от нас лица са със стойности над 7,0, което означава, че се поддържа една достатъчно добра орална хигиена от участниците и не се позволява продукция на органични киселини в голямо количество. Най-ниска средна стойност за рН или т.нар. *пикова стойност* се определя на 5-та минута и при кариес-активните, и при кариес-резистентните лица. При жените отчетените стойности се оказват по-ниски, като $\text{pH}_{5\text{min}}=5,63$ при кариес-резистентните жени и $\text{pH}_{5\text{min}}=5,73$ при кариес-активните жени (табл. 21, фиг. 8). Полученият от нас резултат за $\text{pH}_{5\text{min}}=5,63$ при кариес-резистентните жени е в съответствие с този, получен от Aires и кол.

От литературата е известно, че прочистването на глюкозата и захарозата от слюнката се състои от две експоненциални фази. Първоначалната бърза фаза продължава около шест минути, след което се наблюдава по-бавна фаза с продължителност от 6 до 20 минути. Обяснението за това двуфазово проявление на кривата на прочистване на захарта е по-голямата скорост на слюнчения поток в началния период. В съответствие с това измерването започва от петата минута. Нашите резултати са в съответствие с получените от Sreebny и кол. и в противоречие с тези на Goulet и Brudevold, които установяват, че процесът на прочистване от слюнката е еднофазов процес от приблизително една минута след интраорално излагане на влиянието на захар. В това изследване втората, по-бавна фаза на прочистване на захарозата,

продължава до 30-та минута при всички участници в изследването (табл. 21, 22, фиг. 8 и 9), което не съответства на резултатите, докладвани от Пенева при изследване на движението на плаковото рН след прием на 10% разтвор на захароза, и на Stephan, които наблюдават възстановяване на изходната стойност след 30-та минута. Кариеc-активните лица поддържат по-ниски стойности в СН-зоната – от 10-та до 20-та минута. Може да се заключи, че за пренасянето на разтворената захар чрез дифузия в зъбната плака първите минути са най-важни.

На 5-та минута след изплакването стойностите на рН при жените се доближават до стойността, посочвана в научната литература, като „*критична рН*” при $pH=5,5$ (фиг. 8), при която зъбният емайл започва да се деминерализира. Тази стойност на рН не е константна, а е обратнопропорционална на концентрациите на калций и фосфат в слюнката и течността на плаката, които варират при различните хора. При хора с ниски концентрации на калций и фосфат в слюнката и плаковата течност, праговата критична рН може да има стойност от 6,5, докато при такива с високи концентрации – 5,5.

Заклучението, което се извежда от изследването на оралния въглехидратен клирънс, е, че прочистващата функция на слюнката се състои от 2 фази – първоначална по-бърза, с продължителност около пет минути, и по-бавна, с продължителност от 10 до 20 минути (фиг. 9). Това двуфазово проявление на кривата на слюнчения клирънс ние отдаваме на по-голямата скорост на слюнчения поток в началния период поради стимулиращото действие на захарния разтвор.

Обсъждане по задача 4 и подзадача 4.1. *Определяне на микробните числа на кариеcогенните *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus* в смесената слюнка на двете изследвани групи*

Голямото количество бактерии *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus* е индикатор за висок риск от кариеc. Съществува

съответствие между наличието на *Str. mutans* в слюнката и в зъбната плака. Ако в плаката се наблюдава голямо количество бактерии, такова е количеството им и в слюнката.

В настоящото изследване са използвани микробиологичните тестове CRT[®] bacteria (Ivoclar Vivadent, Liechtenstein), представител на т.нар. dip-slide тестове или познати още като „тестове до стола на пациента“ („chair-side tests“), с които сравнително бързо и лесно едновременно се установява броят на лактобацилите и *Str. mutans* в слюнката. Установяването на повече от 10^5 CFU/ml от *mutans streptococci* и/или лактобацили върху избирателните агари е индикатор за висок риск от зъбен кариес, т.е съществува латентен риск от развиване на клинично изявиени лезии.

Кариесът не е специфична инфекция. Съществуват изследвания, включително молекулярно-базирани, които показват, че кариес може да се развие при ниски микробни числа и дори в отсъствие на *Str. mutans* за сметка на други бактериални родове, като *Lactobacilli*, *Actinomyces*, *Bifidobacteria*, *Veillonella*, *Propionibacteria* и *Atopobia*. Разбира се, наличието на *Str. mutans* е индикация за съществуването на рисков фактор, тъй като тези стрептококи са едни от най-силно кариесогенните микроорганизми. Добре известно е, че етиологията на зъбния кариес е многофакторна. При такива полиетиологични заболявания за всеки човек съществува различна комбинация от фактори, които при определени условия изместват равновесието (реминерализация ↔ деминерализация) на емайловата повърхност към деминерализацията, и в крайна сметка до една и съща клинична изява – нови кариозни лезии.

Резултатите от инкубирането на проби от слюнка в настоящото изследване потвърждават наличието на *mutans streptococci* и *Lactobacillus* при всички участници в условията на много добре поддържана орална хигиена. Стойности на микробните числа $\geq 10^7$ CFU/ml за *Streptococcus mutans* и

Lactobacillus и съответно висок риск за развитие на зъбен кариес не се установява при кариес-резистентните участници и в двата изследвани периода (табл. 18). Разпределението по категории според степента на микробното число както за стрептококите в хигиенен и ахигиенен период, така и за лактобацилите в ахигиенен период, между кариес-активните и кариес-резистентните участници показва статистически значими разлики (табл. 18, $p < 0.05$). При кариес-активните участници в хигиенен период има по-висок относителен дял на регистрираните случаи с микробно число на стрептококи и лактобацили – 10^7 CFU/ml, в сравнение с групата на кариес-резистентните, при които дори не се регистрират случаи със стойност на микробното число над 10^5 CFU/ml. В ахигиенен период при кариес-активните студенти нараства значимо относителният дял на тези с микробно число над 10^5 CFU/ml и за *Str. mutans* и *Lactobacillus* в сравнение с кариес-резистентните, при които не са регистрирани случаи с микробно число 10^9 CFU/ml. През ахигиенния период на изследване и при двата вида бактерии микробните числа със стойност 10^9 CFU/ml са със статистически значим по-висок относителен дял при кариес-активната група, като при *Lactobacillus* процентът на микробното число 10^2 CFU/ml е сигнификантно по-висок при резистентните на кариес участници в проучването. Откриването на повече от 10^5 CFU/ml (колония-формиращи единици на милилитър слюнка) от *mutans streptococci* и/или лактобацили е индикатор за висок риск от кариес, т.е. изложени на риск от развиване на нови кариеси, са кариес-активните студенти.

Според Edgar, Dawes и O'Mullane стойности на микробните числа за слюнчените лактобацили над 10^6 CFU/ml (salivary *lactobacilli* $>10^6$ CFU/ml) са индикатор за повишена консумация на въглехидрати и следователно за висок риск за развиване на заболяването. Други автори, като Holbrook, de Soet и de Graaff, а също и Nishikawara и кол. твърдят, че броят на

лактобацилите в слюнката отразява консумацията на прости въглехидрати, като лактобацилите са силно ацидогенни в присъствието на въглехидрати.

Резултатите от това проучване показват, че съществува корелация между микробните числа на слюнчените *Str. mutans* и *Lactobacillus*, определени с тестовете CRT[®]bacteria, и стойностите за DMFT на участниците (табл. 18), което съответства на получените резултати от Nishikawara и кол.

В специализираната литература се откриват малко автори, използвали „chair-side” тестовете – „CRT[®] bacteria” (Ivoclar Vivadent, Liechtenstein) за определяне на качествата на слюнката и на количеството на *Str. mutans* и *Lactobacillus* в техните проучвания. Превалират изследванията на автори, използвали микробиологичните тестове Dentocult[®] (Orion Diagnostica Co. Ltd, Espoo, Finland), а в българските проучвания – „Saliva Check” (GC, Japan). Времето за инкубиране на Dentocult SM (за мутанс стрептококите –*Str. mutans* и *Str. sobrinus*) е 48 часа, а на Dentocult LB (за лактобацилите) е 96 часа. Времето за инкубиране на бактериите върху избирателните агари при тестовете CRT[®] bacteria е 48 часа и за двата вида. Това е едно предимство при използването на тези тестове.

Ранното овладяване на нарастването на броя на бактериите чрез прилагането на съответните мерки може да доведе до забавяне на развиването на нови лезии в по-дългосрочен план. Не е задължително да се развие кариес, ако ефектът на защитните механизми е достатъчно силен.

Обсъждане по подзадача 4.2. Определяне на концентрациите на неорганичен калций и фосфор в смесена, нестимулирана слюнка на изследваните лица

Получените в това проучване резултати за изследваните електролити са анализирани и сравнени съобразно граничните стойности, представени от Edgar и кол. (2004 г.) за общата слюнка и плаковата течност (табл. 20). Проведеното от нас

изследване на електролити в смесена, нестимулирана слюнка показва, че при жените концентрациите на калция (Ca) и неорганичния фосфор (P_i) са в границите на нормалните референтни стойности (табл. 20) с повишаване на концентрациите на калция и фосфора в ахигиенния период. Изключение са кариес-активните жени, при които се отбелязва незначително понижаване в концентрацията на фосфора в ахигиенен период (табл. 20). Следователно слюнката при жените е достатъчно наситена с калциеви и фосфатни йони, за да подпомогне реминерализационните процеси на зъбния емайл при киселинен спад в ахигиенен период. Това може да е една от причините измереното рН на слюнката в ахигиенен период (табл. 15 и 16) да не достига „критичната стойност”, но тогава няма логично обяснение за стойността на регистрирания индекс – DMFT, при кариес-активните жени, освен демонстрираният нисък буферен капацитет и в двата изследвани периода и честият прием на закуски между основните хранения (табл. 7, 8, 17 и 17-а). Подобно на други автори, проучвали електролитите в слюнката на кариес-активни и кариес-резистентни пациенти, и в това проучване не се установяват сигнификантни разлики в средните стойности на калция и фосфора между двете изследвани групи пациенти, измерени в хигиенен или ахигиенен период (табл. 20-а, $p>0.05$). Съпоставянето на резултатите от настоящото проучване с други изследвания показва, че тенденциите са еднакви за измерените концентрации на калция, които са по-високи в групите на кариес-активните лица. Не се установяват сигнификантни разлики в средните стойности на калций и фосфор между хигиенен и ахигиенен период в двете групи студенти (табл. 20-а, $p>0.05$).

Калцият и фосфорът са важни за поддържането на среда, свръх наситена с минерали/йони на емайла, когато рН на плаката и слюнката спада. В съответствие с това твърдение са получените от нас резултати за Ca, чиито стойности се

повишават в ахигиенния период и при кариес-активните, и при резистентните, макар и недостоверно (табл. 20, 20-а; $p>0.05$).

Всяко регистрирано намаление на калция и фосфора в биологичните течности, дори и без статистическа достоверност, е от огромно значение, защото стабилността на калциево-фосфорната обмяна и регулация в човешкия организъм е добре известна.

Обсъждане по подзадача 4.3. Количествено определяне на ензимите: алфа-амилаза, кисела и алкална фосфатаза в смесената, нестимулирана слюнка на изследваните лица

Една от целите в това изследване е да се установи дали съществуват разлики в активността на три ензима, които по своята химическа същност представляват протеини в общата, нестимулирана слюнка на две групи доброволци: кариес-активни и кариес-резистентни. Влиянието на промените на слюнката в рамките на денонощието е сведено до минимум, като пробите от слюнка са събирани по едно и също време на денонощието. Всички слюнчени проби са събрани в рамките на 2 месеца. Следователно вероятни годишни вариации на данните за слюнката са несъществени. Всички участници са от една възрастова група, което изключва влиянието на възрастта върху получените резултати. Всички участници са физически здрави според критериите, по които са избрани – липса на общи и хронични заболявания; на лигавични и пародонтални заболявания; на протетични възстановявания в устата. Така влиянието на общото здравословно състояние е сведено до минимум.

От трите изследвани ензима алфа-амилазата демонстрира най-големи промени в активността (табл. 19 и 19-а), което съвпада с литературните данни. Тенденцията за намаляване на активността ѝ в ахигиенния период е една и съща при всички изследвани групи, като получените резултати са статистически достоверни (табл. 19-а, $p<0.001$) и полът не оказва влияние. При кариес-активните мъже се наблюдава най-голямото понижение в

активността на амилазата (табл. 19), което може да е свързано с определения при тях нисък буферен капацитет на слюнката – 60% от изследваните кариес-активни мъже демонстрират нисък буферен капацитет и в двата изследвани периода (табл. 17). От друга страна, киселинността на слюнката, определена екстраорално с рН-метър, на кариес-активните мъже в ахигиенен период е на стойност от 6,91, което е над критичната стойност, при която настъпва деминерализация (табл. 16). Останалите изследвани показатели при тези доброволци, като ниво на слюнчения поток и рН на смесената слюнка в два периода (хигиенен и ахигиенен), също са в норма (табл. 13, 14, 15, 16). Анализът на анкетните карти по отношение на храненето, хранителните и хигиенните навици на участниците също не разкрива връзка с демонстрирания резултат (табл. 6, 7 и 10).

Известно е, че активността на α -амилазата се влияе от рН. Оптималното рН на средата за действието на този ензим е около 6,8. Под рН=6,0 активността ѝ силно намалява, като се инактивира при рН=4,0. Вероятно при кариес-активната група в това изследване активността се повлиява при спад на рН със стойност под 6,5–6,4.

Valekjian и кол. установяват, че при кариес-активни лица се наблюдава значително намаляване на дяла на протеините, които участват в мигрирането на катионите (основни протеини), както и значително повишаване на концентрацията на амилазата в сравнение с групата на кариес-резистентните участници. Аналогичен резултат при изследване на амилаза в паротидна слюнка получават Dodds и сътр. Получените от нас резултати за амилазата в смесена слюнка противоречат на получените от Dodds и сътр., които установяват по-високи ензимни концентрации в групата на кариес-активните пациенти. Описано е обаче вторично изчерпване на слюнчените нива на алфа-амилазата при протрахиран от детството, регулярен, ексцесивен въглехидратен прием. В нашето изследване не се установява по-висока активност на амилазата при кариес-активните лица в

сравнение с кариес-резистентните (табл. 19). Най-висока активност на амилазата се установява в групата на кариес-резистентните мъже в хигиенен период – 129,06 U/l (табл. 19). В ахигиенния период на изследването алфа-амилазата отново демонстрира най-висока стойност при кариес-резистентните мъже – 84,42 U/l (табл. 19). При кариес-активните лица жените демонстрират по-високи стойности за амилазата в сравнение с мъжете и в двата изследвани периода, което съответства на наблюдаваното от Dodds и съавт. Те правят първото проучване, което детайлно анализира различия в спектъра на протеиновите слюнчени компоненти, свързани с пола. Авторите отдават наблюдаваната от тях по-висока обща концентрация на протеини в слюнката на жените в сравнение с тази на мъжете, на хормоналните различия между половете и по-точно с естрогеновата регулация. Установено е, че при лечението с естроген се повишава нивото на слюнчения поток и на буферния капацитет при жени след менопауза.

В противоречие с тези данни Kalipatnaru и кол. установяват, че при мъжете концентрацията на общ протеин и амилаза в смесената нестимулирана слюнка е по-висока, отколкото при жените.

Следствие от намалените нива на алфа-амилазата е непълното разграждане на въглехидратите в устната кухина. Продължителната непълна въглеродна хидролиза води до хроничен витамин В₁ дефицит, а той, от своя страна, до метаболитна, ендогенна ацидоза. Това ендогенно разстройство се отразява и на буферните системи на слюнката. Еднократното неизмиване на зъбите (24-часов ахигиенен период) рязко се отразява на вече ендогенно разстроените буферни системи на слюнката поради повишената въглехидратна консумация от изследваните лица и много бързо се получава размножаване на кариесогенните микроорганизми – *Str. mutans* и *Lactobacillus*. Фосфатазните ензими са извънредно чувствителни към рН на средата и в зависимост от нивото на йонната концентрация (H⁺)

проявяват синтезиращо (при алкално рН) или деминерализиращо действие (при кисело рН). Фосфатазите играят важна роля в регулацията на фосфорната обмяна. Алкалната фосфатаза катализира откъсването на неорганичен фосфат от редица органични съединения на фосфорната киселина, способствайки минерализацията на костите и зъбите.

В настоящото изследване по-високите средни стойности на киселата и алкалната фосфатаза в слюнката на всички изследвани лица след спазване на 24-часов ахигиенен период не са изненадващи. Те се свързват с понижението на рН на средата, т.е. увеличаването на киселинността на слюнката на участниците с най-ниска отчетена стойност (с рН-метър) при кариес-активните жени (рН=6,54) в ахигиенен период (табл. 16). В средните стойности на изследваните ензими – α -амилаза, кисела и алкална фосфатаза, не се установяват сигнификантни разлики между двете групи изследвани студенти, независимо дали са отчетени в хигиенен или в ахигиенен период – това се вижда, като се разгледа таблица 19-а, т.е. не може да се твърди, че нивото на алкалната фосфатаза, киселата фосфатаза и алфа-амилазата влияят на резистентността на съзъбието (табл. 19-а). Липсата на 24-часова хигиена води до значимо повишение на киселата фосфатаза. Установяват се достоверно по-високи средни стойности на киселата фосфатаза при измерване след ахигиенен период в сравнение с хигиенния и при двете групи лица (табл. 19-а, $p < 0,001$). Установяват се сигнификантно по-ниски средни стойности на слюнчената амилаза в ахигиенен период в сравнение с хигиенния и в двете групи изследвани лица (табл. 19-а, $p < 0,001$).

Saito и Kizu, а по-късно Куликова и съавт. и Ковалюк и Смоляр отбелязват понижаване в активността на киселата и алкалната фосфатаза в слюнката на пациенти със зъбен кариес и не потвърждават изводите на Потийко за повишаване на активността на алкалната фосфатаза в слюнката при кариес, както и тези на Котомин за повишаване на активността на

киселата фосфатаза. Получените от нас резултати за алкалната фосфатаза в хигиенен период се различават от тези на Vijayarasad и съавт., които наблюдават значимо по-висока активност в групата на кариес-активните лица, като правят заключението, че проучването им показва силна корелация между активността на алкалната фосфатаза и зъбния кариес.

Обсъждане по подзадача 4.4. *Анализиране на единични нуклеотидни полиморфизми (SNP), разположени в два гена на матриксни металопроотеинази (MMP) – MMP2 и MMP3*

Съвременният генетичен подход при търсене на връзка между различни кандидат-гени и конкретно заболяване обикновено включва провеждане на асоциативни проучвания. Тези проучвания се провеждат най-често върху единични полиморфизми от единични гени или върху голям брой кандидат-гени едновременно (Разширени геномни асоциативни проучвания, GWAS). По данни на последните проведени GWAS проучвания в етиологията на зъбния кариес участват гени, свързани с имунния отговор, *металопроотеинази*, както и гени, определящи типа метаболизъм и хранителните навици. Сред металопроотеиназите се открояват 1, 2, 3 и 9.

Броят на *разширените асоциативни проучвания на генома* (GWAS), свързани с риска от кариес, е ограничен в литературата. В изследване на Wang и кол. от 2013 г. са идентифицирани 53 потенциални гена, отговорни за предразположеността към зъбен кариес и техните протеин-протеинови взаимодействия. Функционалните анализи на тези 53 гена показват три основни клъстера: гени, свързани с цитокиновата мрежа, семейството на матриксните металопроотеинази (MMPs) и семейството на трансформиращия растежен фактор бета (TGF- β).

Може да се допусне, че генетичните вариации на MMP могат да бъдат един от няколко фактори, допринасящи за предразположеността към зъбен кариес. През 2006 г. гените MMP2 и MMP3 са били описани като отговорни за генетичната

предразположеност на твърдите зъбни тъкани към развиването на зъбен кариес и прогресирането на заболяването.

MMP2, известен също като желатиназа А, е мембранно-свързан протеин, който е важен за обмена на извънклетъчния матрикс. Той има протеолитична активност срещу компоненти на базалната мембрана.

MMP3, известна също като стромелизин-1, е основната металопротеиназа, която се секретира от фибробласти, синовиални клетки и хондроцити. Тя има протеолитична активност срещу протеогликани, фибронектин, ламинин и колагени тип IV (Kahari & Saarialho-Kere, 1999). MMP3 експресията се регулира в отговор на стимулиране на растежни фактори и цитокини.

Понастоящем генетичните изследвания върху експресиите на промени (полиморфизми) в ензимите матриксни металопротеинази (MMP) са едни от най-съвременните подходи в областта на кариесологията и ендодонтията. Транскрипционното ниво на повечето MMP се регулира от растежни фактори, хормони и цитокини, но единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) на няколко MMP гени са показали, че са транскрипционни регулатори.

MMP нивата на възпаление са свързани с нелекувани и дълбоки кариозни лезии и усложненията, възникнали от това – инфектирани пулпни тъкани и периодонтити. Тяхната основна роля е свързана с костната резорбция. Установена е корелация между предразположеността на тъканите на индивида към развитие на периапикални лезии и полиморфизми в MMP2 и 3. Доказано е, че естрогенът регулира възходящо експресията на MMP2. Няма данни за експресия на гена MMP3 и на естрогена.

Според получените в изследването резултати на по-силна асоциация между резистентността към зъбен кариес в групата на жените доброволци и алела G в гена MMP3 може да се мисли, че има отрицателно регулиране на експресията на MMP3 от естроген в жените, носители на алел G.

Изследваната от нас група от 102-ма доброволци може да бъде описана като отлично стандартизирана и високо хомогенна по отношение на етническа принадлежност, възраст (20–30 г.), социален статус и образование (студенти), образование на родителите, познания по отношение на храненето и хигиената, здравна култура, информираност и мотивация по отношение на грижите за тяхното общо и дентално здраве. Доказателствата, че хора, изложени на едни и същи рискови фактори от околната среда, показват разлики в индекса DMFT, са в подкрепа още по-силно на твърдението за влиянието на генетичните фактори в етиологията на зъбния кариес.

Според наблюдаваните данни може да се заключи, че гените MMP2 и MMP3 могат да бъдат свързани с предразположеността към кариес и неговото прогресиране. Възникването и развитието на зъбния кариес е най-вероятно под прецизен контрол на няколко други гени, които играят роля в патогенезата на болестта, и е разумно да се очаква, че SNPs, дори и тези, доказали своята функционалност като rs679620, потенциално играят значима, но не и единствена роля за заболяването. Приема се, че денталният кариес е полигенно заболяване и на този етап не може да бъдат коментирани гените, свързани с етиологията му, като по-важни или по-незначителни. В този аспект интерес представляват както металопротеиназите 2 и 3, така и 1 и 9. Разширяването на групата от изследвани доброволци също би допринесло за изясняване на връзките генотип–фенотип. Интерпретирането на получените в проучването резултати и тяхното значение изисква по-нататъшни изследвания. Разработените методи за идентификация на полиморфните варианти в MMP2 и MMP3 гените и установените им честоти в българската популация биха могли да бъдат развити по-нататък и приложени в областта на кариесологията.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализът на обобщените анкетни, клинични, биохимични и микробиологични изследвания показва постоянни тенденции и хронични промени на субклинично ниво, водещи до траен дисбаланс на оралната хомеостаза при млади лица с висок DMFT-индекс. Той се изразява в промени в слюнченото рН, промени в буферните и ензимни системи, в слюнчения поток, в микробните числа и електролитите на смесена слюнка. Едно от възможните обяснения е, че това е следствие от трайно персистиращи лоши хранителни навици от детството; свързано е със семейната култура и изградените навици на хранене. Възможна е и генетична предиспозиция.

Придобитите орално-хигиенни навици и здравна култура по всичко личи, че не са в състояние да компенсират хранителните и генетични дадености в кариесната заболеваемост и резистентността на ТЗТ.

VII. ИЗВОДИ

1. Кариесната активност в млада възраст до 30 години зависи от: динамиката на хранене и от хранителните и хигиенните навици. Не зависи от ендемичния прием на флуорни таблетки в детството на фона на много добра орална хигиена при изследваните лица. Значимите разлики в честотата на профилактичните прегледи при денталния лекар и в двете изследвани групи преди и след постъпването в университета е свързано най-вероятно с по-голямата информираност и мотивация по време на следването по дентална медицина.

2. В групата на кариес-активните лица е установено статистически достоверно намаление в количеството на нестимулираната смесена слюнка, измерена в ml/5 min след 24-часов ахигиенен период.

3. В ахигиенния период средните стойности на pH на смесената, нестимулирана слюнка, измерена с pH-индикаторни ленти и екстраорално с pH-метър, и в двете групи намаляват достоверно в сравнение с изходните ($p < 0,05$).

4. Статистически достоверно намалената температура на смесена слюнка при млади лица с висока кариесна активност е свързана с трайни промени в биохимичния и микробиологичен състав. Възможно е това да е резултат от вредни навици и/или от нокси от общ и локален характер, които нарушават равновесието между реминерализационния и деминерализационния потенциал на слюнката.

5. Статистически достоверно по-високи са микробните числа на *Str. mutans* и *Lactobacillus* в слюнката при кариес-активните лица. Тази тенденция се засилва в ахигиенен 24-часов период и ясно говори за микробна етиология на кариеса в отсъствие на матурирана зъбна плака.

6. На фона на трайни, макар и дискретни, промени в рН и в микробиологията на смесена слюнка е установено достоверно намаляване на средните стойности на киселата фосфатаза и достоверно повишаване на стойностите на алфа-амилазата в ахигиенен период и при двете групи изследвани лица.

7. Факт е електролитният дисбаланс в границите на широката норма. Стойностите на електролитите при всички кариес-активни лица са недостоверно по-ниски и в хигиенен, и в ахигиенен период в сравнение с резистентните.

8. Оралният глюкозен клирънс на 5% разтвор на захароза при кариес-активните лица е забавен от 10-та до 20-та минута.

9. Анализът на **MMP2** гена показва статистически значими разлики между алелните и генотипни честоти в свободната от кариес (DMFT=0) и в кариес-резистентната група (DMFT≤5).

10. Съществува статистически значима разлика между алелните и генотипните честоти в групата на кариес-резистентните и кариес-активните лица за **MMP3** гена. Намерената генотипна асоциация за генотипове A/G и G/G в **MMP3** гена показва по-висок риск за развитие на зъбен кариес в кариес-активната група.

11. **MMP2** и **MMP3** гените вероятно са включени в етиологията и в патогенезата на зъбния кариес. Известно е, че зъбният кариес е многофакторно заболяване и се очаква ролята на полиморфизмите, дори и на тези с доказан функционален ефект като rs679620, да бъде значима, но не и единствена.

VIII. ПРИНОСИ

Приноси с потвърдителен характер

1. Доказана е пострезорбтивната роля на храненето в етиологията и в патогенезата на зъбния кариес.

2. Дефинирани и доказани са основните рискови фактори на слюнката за появата и развитието на зъбен кариес на твърдите зъбни тъкани в постоянно съзъбие при здрави лица, в млада възраст – до 30 години.

3. Доказано е високото микробно число на двата основни и най-често изследвани вида кариесогенни микроорганизми (*Streptococcus mutans* и *Lactobacillus*) в смесена, нестимулирана слюнка в хигиенен и 24-часов ахигиенен период на изследване при млади и здрави лица.

Приноси с оригинален характер

4. Въведено е интраорално и екстраорално определяне на рН на смесена, нестимулирана слюнка с рН-ленти и рН-метър, както и количествено определяне на слюнчен поток и буферен капацитет на смесена, нестимулирана слюнка в два периода на изследване – хигиенен и 24-часов ахигиенен.

5. За първи път в България в научно изследване са приложени „тестове до стола на пациента” („chair-side tests”) за полуколичествено определяне на микробните числа на *Str. mutans* и *Lactobacillus* в слюнка на млади лица – още през 2005 година.

6. За първи път в България е извършен сравнителен анализ на кариес-активни и кариес-резистентни млади лица, на активностите на три ензима в смесена, обща слюнка – α -амилаза, алкална и кисела фосфатаза, и концентрациите на електролитите – калций и неорганичен фосфор, в два периода на изследване.

7. Проведен е сравнителен анализ на оралния въглехидратен клирънс на слюнката с 5% разтвор на захароза на кариес-активни и кариес-резистентни лица.

8. За първи път в България е направено генетично изследване на ДНК от слюнка и от букална лигавица на: кариес-активни, кариес-резистентни и кариес-свободни лица в млада възраст, във връзка с етиологията и патогенезата на зъбния кариес.

IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. **Караяшева, Д.** Тестове за определяне на риска за заболяване от зъбен кариес. – Проблеми на стоматологията, том XXXI/ 2005, част I, 59–66.

2. **Караяшева, Д., М. Маринова, В. Доганджийска, Е. Ботева.** Проучване на хранителните, хигиенните и поведенческите навици и измерване на рН на слюнката при кариес-активни и кариес-резистентни лица. – Зъболекарски преглед, 2007, 3, 175–182.

3. **Караяшева, Д., М. Маринова, Е. Ботева.** Орален клирънс на кариес-активни и кариес-резистентни лица в млада възраст. – Наука Диететика, 2011, 2, 22–24.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Karayasheva, D., M. Marinova.** Caries prevalence among Dental students of the Faculty of Dentistry in Sofia, Bulgaria. – 9-th Congress of the Balkan Stomatological Society, 13–16 May 2004, Ohrid, oral presentation.

2. **Караяшева, Д., М. Маринова, В. Доганджийска.** Интраорално измерване на рН на слюнка на кариес-активни и кариес-резистентни студенти по стоматология. – 15-та Асамблея на ИМАБ, 26–29 май 2005, Варна, доклад.

3. **Karayasheva, D., M. Marinova, E. Boteva.** Salivary flow rate, buffer capacity, microbial counts and caries activity of young healthy subjects. 57-th Annual ORCA Congress, July 7–10 2010, Montpellier, France, poster.

4. Димитрова, С., **Д. Караяшева, Е. Ботева.** Кариесна активност, хранене и биохимия на слюнка – 20-годишно сравнително изследване. IX Национален конгрес по хранене с международно участие, Варна, 19–22 май, 2011, постер.