

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Ella Sever

PROCJENA UTJECAJA AEROSOLA DUHANA BEZ IZGARANJA
NA STRUKTURU USNE ŠUPLJINE I NJEGOVA USPOREDBA S
KONVENCIONALNIM DUHANSKIM PROIZVODIMA

Doktorski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Ella Sever

PROCJENA UTJECAJA AEROSOLA DUHANA BEZ IZGARANJA
NA STRUKTURU USNE ŠUPLJINE I NJEGOVA USPOREDBA S
KONVENCIONALNIM DUHANSKIM PROIZVODIMA

Doktorski rad

Mentorica: Prof.prim.dr.sc. Daniela Kovačević Pavičić, dr.med.dent.

Komentorica: Prof.dr.sc. Irena Glažar, dr.med.dent.

Rijeka, 2024.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Ella Sever

EVALUATION OF EFFECTS OF SMOKELESS TOBACCO
AEROSOL ON ORAL CAVITY STRUCTURE AND
COMPARISON WITH CONVENTIONAL TOBACCO PRODUCTS

Doctoral thesis

Rijeka, 2024

Mentorica: Prof.prim.dr.sc. Daniela Kovačević Pavičić, dr.med.dent.

Komentorica: Prof.dr.sc. Irena Glažar, dr.med.dent.

Doktorska disertacija obranjena je dana _____ 2025. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____ (titula, ime i prezime)
2. _____ (titula, ime i prezime)
3. _____ (titula, ime i prezime)
4. _____ (titula, ime i prezime)
5. _____ (titula, ime i prezime)

Rad ima _____ listova. UDK: _____

PREDGOVOR

Ovo istraživanje je provedeno na Odjelu za oralnu medicinu Klinike za dentalnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Katedri za Oralnu medicinu Fakulteta dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci. Istraživanje je provedeno uz potporu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Okolišni čimbenici i mikrobiološke interakcije u strukturi dentalnog biofilma“ (IP-2020-02-4027) voditelja prof.dr.sc. Stjepana Špalja.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof.dr.sc. Danieli Kovačević Pavičić, i komentorici, prof.dr.sc. Ireni Glažar, na pomoći tijekom provedbe i izrade ovog doktorskog rada.

Od srca se zahvaljujem svojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, potpori i strpljenju.

SAŽETAK

Ciljevi: Procijeniti i usporediti morfološki izgled oralne sluznice, prevalenciju kandidijaze, prisutnost neugodnog zadaha, olfaktornu i gustatornu funkciju, specifične karakteristike sline (količina, biomarkeri upale i oksidativnog stresa - IL-1 β , IL-6, IL-2, TNF- α , 8-OHdG) i psihološke simptome depresivnosti, stresa i anksioznosti u skupinama pušača novih duhanskih preparata bez izgaranja (*Tobacco Heating System*, THS), pušača konvencionalnih cigareta i nepušača.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 30 pušača THS-a, 30 pušača konvencionalnih cigareta i 30 nepušača. Ispunili su anamnestički upitnik, upitnik o pušenju i psihološke upitnike za procjenu stresa, depresivnosti i anksioznosti. Napravljeni su klinički oralni pregled i testovi (test lučenja sline, obrisak oralne sluznice, organoleptička procjena halitoze, testiranje okusne i mirisne funkcije). Sakupljeni uzorci sline su korišteni za imunoenzimsku analizu koncentracija salivarnih biomarkera upale i biomarkera oksidativnog stresa.

Rezultati: U obje skupine pušača zabilježena je viša prevalencija morfoloških promjena sluznice ($P < 0,001$), smanjena količina nestimulirane sline ($P < 0,001$) i prisutnost neugodnog zadaha ($P < 0,001$) u odnosu na nepušače. Nije pronađena značajna razlika u prevalenciji kandidijaze. Pušači konvencionalnih cigareta pokazali su smanjenu mirisnu funkciju u usporedbi s nepušačima ($P = 0,001$), dok se pušači THS-a nisu razlikovali od pušača konvencionalnih cigareta niti nepušača. U obje skupine pušača smanjena je sveukupna okusna funkcija, te identifikacija gorkog, kiselog i slanog okusa ($P < 0,001$). Koncentracija 8-OHdG-a je značajno viša u skupini nepušača u odnosu na obje skupine pušača ($P < 0,001$). Nije zabilježena razlika u koncentraciji salivarnih citokina. Pušači konvencionalnih cigareta niže percipiraju stres u usporedbi s nepušačima i pušačima THS-a ($P = 0,012$). Nije bilo linearne povezanosti između biomarkera oksidativnog stresa i promatranih psiholoških simptoma.

Zaključak: Pušenje ima negativan učinak na morfološki izgled sluznice, količinu sline, prisutnost neugodnog zadaha, mirisnu i okusnu funkciju, pri čemu je osjet mirisa značajno više narušen u skupini pušača konvencionalnih cigareta.

Ključne riječi: citokini; oksidativni stres; pušenje; slina

SUMMARY

Objective: To assess and compare the morphological appearance of the mucosa, prevalence of candidiasis, presence of halitosis, olfactory and gustatory function, specific saliva attributes (amount, biomarkers of inflammation and oxidative stress - IL-1 β , IL-6, IL-2, TNF- α , 8-OHdG) and psychological symptoms of depression, stress and anxiety in groups of smokers of new tobacco products without combustion (Tobacco Heating System, THS), conventional cigarette smokers and non-smokers.

Patients and methods: 30 THS smokers, 30 conventional cigarette smokers, and 30 non-smokers were included in the study. All subjects completed the anamnestic and smoking questionnaire, and psychological questionnaires to assess stress, depression and anxiety. Oral examination and tests were performed (saliva secretion test, swab test, organoleptic assessment of halitosis, olfactory and gustatory testing). The saliva samples were used for immunoenzyme analysis of the concentrations of biomarkers of inflammation and oxidative stress.

Results: In both groups of smokers, a higher prevalence of morphological changes ($P < 0.001$), a reduction of unstimulated saliva ($P < 0.001$), and the presence of halitosis ($P < 0.001$) were observed. No difference was found in the prevalence of candidiasis. Conventional cigarette smokers showed reduced olfactory function when compared to non-smokers ($P = 0.001$), while THS smokers did not differ from conventional cigarette smokers or non-smokers. Gustatory function and identification of bitter, sour and salty tastes were reduced in both smokers groups ($P < 0.001$). The concentration of 8-OHdG was higher in non-smokers ($P < 0.001$). No differences were observed in the concentration of cytokines. Conventional cigarette smokers reported lower levels of perceived stress compared to non-smokers and THS smokers ($P = 0.012$). No association was observed between oxidative stress biomarker and psychological symptoms.

Conclusion: Smoking adversely affects the morphological appearance of the mucosa, saliva production, the presence of halitosis, olfactory and gustatory function, with the olfactory function being more impaired in conventional cigarette smokers.

Keywords: cytokines; oxidative stress; saliva; smoking

Sadržaj

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Morfološke promjene oralne sluznice uzrokovane duhanskim preparatima	3
1.2. Utjecaj duhanskih preparata na količina i kemijski sastav sline	8
1.3. Utjecaj duhanskih preparata na gljive roda <i>Candida</i>	9
1.4. Utjecaj duhanskih preparata na razvoj halitoze.....	11
1.5. Utjecaj duhanskih preparata na olfaktornu i gustatornu funkciju	12
1.6. Utjecaj duhanskih preparata na salivarne citokine	15
1.7. Utjecaj duhanskih preparata na biomarker oksidativnog stresa – 8-OHdG	18
1.8. Psihološki simptomi povezani s pušenjem.....	19
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	21
3. ISPITANICI I METODE	22
3.1. Ispitanici	22
3.2. Materijali i metode.....	23
3.2.1. Prikupljanje podataka o općem zdravstvenom stanju, općim obilježjima ispitanika i navici pušenja.....	23
3.2.2. Klinički pregled	24
3.2.3. Test lučenja sline.....	25
3.2.4. Obrisak oralne sluznice.....	25
3.2.5. Halitoza	26
3.2.6. Evaluacije olfaktorne i gustatorne funkcije	26
3.2.7. Prikupljanje uzoraka sline za Enzimski povezani imunosorbentni test (ELISA test)	27
3.2.8. Analiza uzoraka imunoenzimskim ELISA testom.....	28
3.2.9. Psihološki upitnici.....	31
3.2. Statistička analiza	33
4. REZULTATI.....	35
4.1. Opća obilježja ispitanika	35
4.2. Karakteristike skupine pušača	36
4.3. Prevalencija samoreportiranih simptoma povezanih s pušenjem	39
4.4. Utjecaj duhanskih preparata na morfološke promjene oralne sluznice	44

4.5. Utjecaj duhanskih preparata na količinu sline	47
4.6. Identifikacija gljiva roda <i>Candida</i>	48
4.7. Usporedba prisutnosti halitoze između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a	50
4.8. Usporedba olfaktorne i gustatorne funkcije između skupina pušača konvencionalnih cigareta, pušača THS-a i nepušača	51
4.9. Usporedba koncentracija salivarnih biomarkera upale (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2) i salivarnih biomarkera oksidativnog stresa (8-OHdG) između skupina pušača konvencionalnih cigareta, pušača THS-a i nepušača.....	58
4.10. Procjena razine psiholoških simptoma	59
4.10.1. Ljestvica percipiranog stresa.....	59
4.10.2. Skala depresivnosti, anksioznosti i stresa	60
4.11. Povezanost razine salivarnih citokina i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa sa psihološkim statusom ispitanika	62
5. RASPRAVA.....	64
5.1. Opća obilježja ispitanika i karakteristike skupina pušača	64
5.2. Utjecaj duhanskih sustava na samoreportirane oralne simptome i promjene oralne sluznice	65
5.3. Utjecaj duhanskih sustava na morfološke promjene oralne sluznice	66
5.4. Utjecaj duhanskih preparata na količinu sline.....	68
5.5. Utjecaj duhanskih preparata na gljive roda <i>Candida</i>	69
5.6. Utjecaj duhanskih preparata na razvoj halitoze	70
5.7. Utjecaj duhanskih preparata na olfaktornu i gustatornu funkciju.....	72
5.8. Utjecaj duhanskih preparata na salivarne citokine i biomarker oksidativnog stresa	74
5.9. Utjecaj pušenja na psihološke simptome i njihova povezanost sa salivarnim biomarkerima upale i oksidativnog stresa	77
6. ZAKLJUČCI.....	80
7. LITERATURA	81
Popis slika	96
Popis tablica	97
Popis pokrata	100
Životopis.....	109

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Pušenje predstavlja veliki globalni javnozdravstveni problem i ima utjecaj na patogenezu velikog broja sustavnih i oralnih bolesti [1]. Iako je prevalencija pušača u svijetu u padu, pušenje i upotreba duhanskih proizvoda i dalje se smatra jednim od uzročnih čimbenika u šest od osam vodećih uzroka smrti koji uključuju cerebrovaskularne inzulte, ishemijske bolesti srca, respiratorne infekcije, opstruktivne bolesti pluća, tuberkulozu i karcinome [2]. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), 22 % odrasle populacije koristi neki od oblika duhanskih proizvoda, pri čemu konzumacija ili pušenje konvencionalnih cigareta zauzima prvo mjesto (91 %). Unutar zemalja Europske Unije udio pušača je visok, a Republika Hrvatska se nalazi na trećem mjestu po udjelu pušača, odmah nakon Grčke i Bugarske. Prema Europskoj zdravstvenoj anketi, pušači konvencionalnih cigareta su najčešće muškarci u dobi između 25 i 54 godine [3, 4]. Iako je udio pušača u Republici Hrvatskoj u padu, prevalencija mladih i adolescenata koji puše je i dalje visoka u usporedbi s drugim europskim državama [3].

Pušenjem konvencionalnih cigareta dolazi do sagorijevanja duhana, pirolize te oslobađanja duhanskog dima unutar kojeg se nalaze opasni i potencijalno opasni sastojci. Duhanski dim ima preko 5000 različitih sastojaka, a najzastupljeniji su nikotin, katran, dušik, ugljični dioksid, ugljični monoksid, kisik, policiklički aromatski ugljikovodici, specifični nitrozamini, cijanovodik i metali (arsen, kadmij, olovo) [5]. Pojedinačno i zajedničko djelovanje ovih sastojaka uzrokuje promjene na staničnoj i molekularnoj razini koje se očituju pojačanom reprodukcijom stanica, mutacijama deoksiribonukleinske kiseline (DNK), apoptozom, upalom i oksidativnim stresom [1, 5]. Međudjelovanje opasnih i potencijalno opasnih sastojaka može se objasniti na dišnom sustavu gdje se sagorijevanjem duhana oslobađaju slobodni kisikovi ili dušikovi radikali, policiklički aromatski ugljikovodici i nitrozamini koji posljedično iritiraju plućno tkivo te oslobađaju molekule oksidativnog stresa. Oslobođene molekule uzrokuju peroksidaciju specifičnih strukturalnih komponenti i upalnu reakciju koja uzrokuje remodeliranje respiratornog traka i pospješuje razvoj kroničnih plućnih bolesti kao što su emfizem ili kronična opstruktivna plućna bolest [6, 7].

Upravo zbog tih mnogobrojnih štetnih učinaka, a kao i određena preventivna mjera razvili su se novi alternativni uređaji grijanja duhana bez izgaranja (engl. *Tobacco Heating System*, THS) koji prema navodima proizvođača imaju manje opasnih i potencijalno opasnih sastojaka. Ovi alternativni sustavi grijanja duhana bez izgaranja proizvedeni su 2014. godine i komercijalizirani su pod nazivom IQOS (engl. *I quit ordinary smoking*), a danas su rasprostranjeni u gotovo svim zemljama Europske unije s najvećom popularnosti u Slovačkoj, Italiji, Estoniji i Grčkoj [2, 8]. Predstavljaju hibridni uređaj između konvencionalnih i električnih cigareta, a sastoje se od prijenosnog punjača i držača u koji se postavljaju duhanski umetci (engl. *Heets*) [8]. Smanjenje udjela opasnih i potencijalno opasnih sastojaka objašnjava se drugačijim mehanizmom funkcioniranja kod kojeg THS sustavi zagrijevaju duhan na nižoj temperaturi i posljedično izbjegavaju njegovo sagorijevanje i proces pirolize. Temperatura zagrijavanja duhana kod THS-a iznosi 330-349 °C za razliku od temperature sagorijevanja od 700-900 °C kod konvencionalnih cigareta [9]. Obzirom na niže temperature zagrijavanja i izostanak sagorijevanja duhana, u aerosolu zagrijanog duhana pronalazi se manji udio opasnih i potencijalno opasnih molekula. Usporedba kemijskog sastava duhanskog dima i aerosola zagrijanog duhana bez izgaranja pokazala je da THS proizvodi emitiraju sličnu količinu nikotina uz smanjenje koncentracije katrana (50 %), ugljičnog monoksida (99 %), formaldehida, acetaldehida, akroleina, propionaldehida, specifičnih nitrozamina i amonijaka [8-11]. Nadalje, kao prednost ovih električnih sustava navodi se i ograničavajući ciklus pušenja koji traje maksimalno 6 minuta ili 14 udisaja nakon kojih je potrebno ponovno napuniti uređaj za ponovno korištenje [8].

Iako su opasni i potencijalno opasni sastojci aerosola prisutni u nižim koncentracijama, oni su i dalje prisutni te mogu doprinijeti razvoju bolesti povezanih s upotrebom duhanskih proizvoda [12, 13]. Prema epidemiološkim istraživanjima, prevalencija THS pušača u svijetu je još uvijek niska, ali za razliku od prevalencije pušača konvencionalnih cigareta je u povećanju. THS sustavi popularni su među mlađom populacijom (20-39 godina), muškarcima, prethodnim nepušačima te pušačima konvencionalnih cigareta (dualna upotreba) [3, 14, 15]. Zabrinjavajući je podatak da pušači THS-a koji su prethodno bili nepušači, ove duhanske proizvode su

percipirali bezopasnima za ljudsko zdravlje, a dualni pušači kao potencijalnu pomoć pri prestanku pušenja [14].

Istraživanja o ovim alternativnim sustavima grijanja duhana bez izgaranja do sada su temeljena na proučavanju kemijskog sastava aerosola i citotoksičnom učinku na respiratorni sustav [8-13]. Za razliku od konvencionalnih cigareta i duhanskog dima čiji je utjecaj ekstenzivno proučavan na oralna tkiva i lokalni upalni odgovor, utjecaj THS-a na oralno zdravlje je do sada promatran u malom broju istraživanja gdje su zamijećene manje, ali i dalje slične promjene uzrokovane konvencionalnim cigaretama [16-19].

Stoga, manjak kliničkih istraživanja ovih novih duhanskih sustava na oralno zdravlje, kao i rastuća popularnost među mlađom populacijom zahtjeva daljnja istraživanja o opasnim i potencijalno opasnim učincima sustava grijanja duhana bez izgaranja.

1.1. Morfološke promjene oralne sluznice uzrokovane duhanskim preparatima

Sagorijevanjem duhana oslobađaju se opasni i potencijalno opasni sastojci duhanskog dima koji prvo dolaze u kontakt s oralnom sluznicom te uzrokuju morfološke promjene [17]. U literaturi prevalencija oralnih bolesti povezanih s pušenjem iznosi između 9,5 do 58,9 % [20]. Oralna sluznica se morfološkim promjenama nastoji obraniti od mehaničkih, kemijskih i termičkih podražaja inducirajući epitelno-mezenhimalne promjene koje se mogu manifestirati zadebljanjem (keratinizacijom) ili ljuštenjem (deskvamacijom) epitela [16, 17]. Najčešće prisutne promjene oralne sluznice u pušača patohistološki se opisuju kao atrofija, hiperkeratoza, displazija, metaplazija, hiperpigmentacija, erozija, ulceracija ili upala [21-23].

Kod pušača konvencionalnih cigareta se češće javljaju određena patološka stanja koja se mogu podijeliti u benigne, oralno potencijalne zloćudne poremećaje (engl. *Oral Potentially Malignant Disorders*, OPMD) i zloćudne poremećaje. U najčešće benigne poremećaje pušača ubrajaju se leukoedem, nikotinski stomatitis, nepčani eritem ili opekline, centralna atrofija dorzalne površine jezika - superficijalni glositis, pušačka melanoza i crni dlakavi jezik [22, 24].

Leukoedem je anatomske oblike sluznice koji nastaje zbog zadebljanja epitela i unutarstaničnog edema. Najčešće je prisutan na obraznoj sluznici u obliku sivo bijelih nabora ili zamućenja. Iako pušenje konvencionalnih cigareta nije uzročni čimbenik leukoedema, kod pušača je zabilježena povećana prevalencija i veći stupanj zamućenja sluznice. Također, dugogodišnji pušači s većim intenzitetom pušenja imaju naglašeniju kliničku sliku leukoedema.

Nikotinski stomatitis se češće javlja kod dugogodišnjih pušača cigara i lula, nego kod pušača konvencionalnih cigareta. Promjene su rezultat toplinskih iritacija i lokalizirane su na nepcu u obliku hiperkeratotičnih promjena praćenih upalom i oticanjem malih nepčanih žlijezda slinovnica. Promjene su benigne i reverzibilne, te prestankom pušenja dolazi do njihove regresije [25].

Opekline, eritem ili erozija, oralne sluznice najčešće su rezultat mehaničkih i toplinskih iritacija. Najčešće se javljaju na mjestu držanja cigarete (usnicama) ili na mjestu udara najjačeg mlaza dima cigarete (nepcu). Kliničkim izgledom lezije mogu varirati od erozija do eritema, a mogu biti i okružene ili prošarane bijelim lezijama [26].

Superficialni glositis ili romboidni središnji glositis je centralna atrofija dorzalne površine jezika najčešće praćena kandidijalnom infekcijom. Promjena je najčešće bezbolna, ali može biti praćena boli ili peckanjem. Pušenje, uz kandidijalnu infekciju, šećernu bolest i protetske nadomjestke se smatra predisponirajućim čimbenikom za razvoj upale.

Pušačka melanoza je benigna hiperpigmentacija oralnih tkiva koja je rezultat iritacije i djelovanja nikotina na melanocyte u bazalnom sloju epitela. Hiperpigmentacije su multiple i najčešće lokalizirane na prednjoj maksilarnoj i mandibularnoj gingivi u obliku smeđih makula. Intenzitet i naglašenost ovih smeđih promjena proporcionalan je intenzitetu pušenja, a prestankom pušenja dolazi do regresije [22].

Crni dlakavi jezik je benigno stanje koje je rezultat hipertrofije i elongacije filiformnih papila na dorzalnoj površini jezika. Najčešće je uzrokovano lošom oralnom higijenom, nedostatkom sline, lokalnim ili sustavnim bolestima, te lijekovima koji dovode do ubrzanе proliferacije ili nedostatne deskvamacije keratinskih izdanaka filiformnih papila. Hiperkeratotične promjene

prvotno su bijele boje, a djelovanjem pigmenata iz duhana postaju crne, smeđe ili žute. Češće se promjene javljaju kod teških pušača i proporcionalne su intenzitetu pušenja. Ako je pušenje uzrok, stanje je reverzibilno, a podrazumijeva oralnu higijenu jezika i izostanak pušenja [22, 25].

OPMD su poremećaji ili abnormalna promjena oralne sluznice koja je povezana s povećanim rizikom od razvoja raka usne šupljine [27]. U OPMD koji navode pušenje konvencionalnih cigareta u svojim rizičnim ili etiološkim čimbenicima ubrajaju se leukoplakija, eritroplakija, aktinička keratoza, lihen planus i diskoidni lupus eritematosus. Od ostalih stanja OPMD-a s pušenjem su još povezani i oralna submukozna fibroza i nepčane lezije kod obrnutog pušenja, ali su oni uzrokovani alternativnim načinom konzumacije duhanskih proizvoda i karakteristični su za pojedine kulture.

Leukoplakija predstavlja klinički entitet bijele boje koji se ne može sastrugati, ne nestaje povlačenjem i čija dijagnoza se postavlja isključivanjem drugih bijelih lezija. Najčešći je OPMD poremećaj s prevalencijom od 2 % u svijetu [27, 28]. Nepoznate je etiologije, ali jedan od važnijih rizičnih čimbenika je upotreba duhana, te sinergistički učinak upotrebe duhana i alkohola. Prema rezultatima istraživanja pušači imaju i do šest puta veći rizik od nepušača za razvoj leukoplakije, a važnost pušenja u razvoju leukoplakije opisuje i činjenica da smanjenje intenziteta pušenja dovodi do smanjenja lezije, a prestanak često i do potpunog nestanka [28]. Leukoplakiju na temelju boje, površine i teksture sluznice možemo podijeliti na homogenu i nehomogenu. Homogena leukoplakija je oštro ograničena, asimptomatska bijela mrlja ili plak čija površina može biti glatka, namreškana ili naborana. Nehomogena leukoplakija ima tri klinička podtipa, te se može manifestirati u nodularnom, verukoznom i mrljastom obliku (lezija karakterizirane crvenom i bijelom bojom) [29]. Nakon eliminiranja potencijalnih etioloških čimbenika i diferencijalne dijagnostike za definitivno postavljanje dijagnoze leukoplakije potrebno je učiniti biopsiju i patohistološku analizu čiji nalaz može varirati od jednostavne epitelne hiperplazije s hiperkeratozom ili hiper(orto)keratozom i prisutnosti ili odsutnosti epitelne displazije. Nehomogene leukoplakije, prisutnost te veći stupanj epitelne displazije praćene su većom stopom maligne transformacije [30, 31].

Oralna eritroplakija predstavlja crvenu leziju ili mrlju koja se klinički i histopatološki ne može okarakterizirati kao bilo koje drugo prepoznatljivo stanje. Također, najznačajniji uzročni čimbenik je upotreba duhanskih proizvoda i konzumacija alkoholnih pića. U usnoj šupljini najčešće je prisutna na dnu usne šupljine, ventralnoj strani jezika, mekom nepcu i tonzilarnoj loži u obliku asimptomatske crvene mrlje nepravilnih rubova [30]. Za postavljanje dijagnoze također je potrebno isključiti druge crvene lezije i histološki analizirati promijenjeno tkivo koje u 60 do 90 % slučajeva pokazuje znakove displazije, karcinoma in situ ili karcinoma pločastih stanica. Općenito, eritroplakija ima najnižu stopu prevalencije u skupini OPMD, ali i najviši stupanj zloćudne preobrazbe [27, 30].

Oralni lihen planus je kronična imunosna bolest nepoznate etiologije karakterizirana bijelim retikularnim, erozivnim/ulcerativnim i atrofičnim promjenama. Karakteristična klinička manifestacija oralnog lihena započinje simetričnim bijelim papulama koje se spajaju i tvore retikularni, prstenasti ili plakozni oblik. Uz bijele oblike, oralni lihen se može manifestirati i u eritematoznom obliku koji je praćen erozijama, ulceracijama ili deskvamativnim gingivitisom. Uz eritematozne oblike (osobito erozivno-ulcerozne oblike) se veže viši stupanj zloćudne preobrazbe, a prema istraživanjima pušenje se smatra čimbenikom rizika za zloćudnu preobrazbu te postoji pozitivna korelacija pušenja, konzumacije duhanskih cigareta i zloćudne preobrazbe oralnog lihena planusa [27, 30, 31].

Aktinička keratoza je potencijalni zloćudni poremećaj koji se povezuje s pojačanim izlaganjem Sunčevoj svjetlosti i ultraljubičastom zračenju. Bolest se češće javlja u muškaraca srednje dobi, radnika na otvorenom i osoba svjetlije tipa kože, a u ostale čimbenike rizika uključena je i upotreba duhanskih proizvoda. Najčešće zahvaća donju usnicu i karakterizirana je hiperkeratozama, gubitkom elastičnosti i gubitkom vermilion. Većina patohistoloških analiza u trenutku postavljanja dijagnoze pokazuje znakove epitelne displazije ili karcinoma in situ što ukazuje na važnost rane dijagnostike i terapije [27].

Rak usne šupljine i dalje predstavlja veliki zdravstveni problem i povezan je s visokom stopom smrtnosti koja u većini europskih zemalja iznosi više od 50 %. Najčešći histološki podtip raka

usne šupljine je oralni karcinom pločastih stanica koji se najčešće dijagnosticira kada je bolest već u kasnom i uznapredovanom stadiju. Najčešće se javlja kod muškaraca u dobi od 50 do 70-te godine života, iako je uočen porast kod žena i mlađih populacija. Razvoj oralnog karcinoma povezan je s genetskim i okolišnim čimbenicima gdje bilo kakva upotreba duhanskih proizvoda i konzumacija alkoholnih pića povećava rizik od njegovog razvoja. Prema navodu SZO-a pušači imaju 5 do 7 puta veći rizik razvoja oralnog karcinoma u usporedbi s nepušačima. Određivanje uloge duhana u oralnoj karcinogenezi je složeno zbog djelovanja genetskih i ostalih okolišnih čimbenika koji uključuju sunce, alkohol i viruse [32, 33]. Karcinomi u usnoj šupljini kliničkim izgledom mogu varirati od homogenih i nehomogenih bijelih lezija, eritroplakija, induriranih ulceracija ili egzofitičnih masa koje ispunjavaju sadržaj usne šupljine. U uznapredovanim stadijima mogu biti praćeni boli, peckanjem i nelagodom u ustima, smanjenom pokretljivošću jezika, otežanim govorom i gutanjem. U početnim stadijima najčešće je asimptomatski što u konačnici vodi kasnom postavljanju dijagnoze i lošijoj prognozi bolesti. Rizik od razvoja karcinoma usne šupljine smanjuje se s prestankom pušenja [30].

Uz navedene promjene oralne sluznice, u pušača je veća učestalost pojave karijesa, abrazije zuba, diskoloracije cakline, parodontitisa, periimplantitisa te usporenog procesa cijeljenja [30, 34-36].

Učinak novih, alternativnih sustava grijanja duhana na morfologiju oralne sluznice do sada još nije opisan u in vivo uvjetima. Opisane su histopatološke promjene na organotipičnim epitelnim kulturama stanica gdje nisu uočene značajne promjene u keratinizaciji, deskvamaciji i staničnoj adheziji. Naprotiv, kulture stanica izložene aerosolu THS-a bile su sličnije kontrolnim kulturama koje su bile izložene zraku nego kulturama stanica izloženim dimu konvencionalnih cigareta. Organotipične epitelne kulture izložene dimu cigarete već nakon 72 sata pokazale su znakove koji su i inače opisani na oralnoj sluznici pušača konvencionalnih cigareta, a uključuju keratinizaciju, deskvamaciju i smanjenje stanične adhezije. Navedene promjene izostale su kod THS-a nakon 72 sata izloženosti aerosolu što se može objasniti smanjenim brojem opasnih sastojaka koji mogu utjecati na keratinizaciju i deskvamaciju [16, 17].

1.2. Utjecaj duhanskih preparata na količina i kemijski sastav sline

Slina je važna tjelesna tekućina koju izlučuju tri para velikih žlijezda slinovnica (doušna, podčeljusna i podjezična), te mnogo malih žlijezda slinovnica raspoređenih u sluznici usne šupljine. Dnevno žlijezde slinovnice luče između 0,8 do 1,2 litre sline, a njezin nedostatak uzrokuje ozbiljne zdravstvene probleme. Smanjena količina sline ili hiposalivacija se povezuje s učestalim upalama žlijezda slinovnica, otežanom funkcijom žvakanja, gutanja ili govora, razvojem karijesa, češćim gljivičnim infekcijama i neugodnim zadahom. Hiposalivacija može biti uzrokovana unutarnjim ili vanjskim čimbenicima, a jedan od vanjskih ili okolišnih čimbenika koji utječe na količinu sline je upotreba duhanskih proizvoda [37]. S obzirom na to da duhanski dim prvotno dolazi u kontakt sa slinom, mnogobrojna istraživanja oprečnim rezultatima opisuju utjecaj konvencionalnih cigareta na količinu i kvalitetu sline [38]. Povećanje količine sline rezultat je agonističkog djelovanja nikotina i citozina iz cigaretnog dima te posljedične kemijske stimulacije okusnih receptora. Uz to, nikotin i citozin, potiču i oslobađanje noradrenalina i acetilkolina iz živčanih okrajina autonomnog živčanog sustava te kod novih pušača dovode do kratkotrajnog povećanja salivacije koje je praćeno adaptacijom receptora i posljedičnim smanjenjem ukupne količine sline [39-41]. Povećano lučenje sline, također, se može objasniti i kao odgovor na mehaničku, toplinsku ili kemijsku iritaciju, gdje žlijezde slinovnice pojačano stvaraju i luče slinu kako bi zaštitile oralnu sluznicu, neutralizirale, razrijedile ili isprale opasne molekule koje se oslobađaju tijekom pušenja [38, 39]. Nasuprot kratkotrajnim učincima pušenja, dugotrajna upotreba duhanskih proizvoda značajno smanjuje količinu sline te je smanjenje količine sline proporcionalno duljini i intenzitetu pušenja [42]. Dugotrajna upotreba duhanskih preparata uzrokuje adaptaciju receptora i smanjenu aktivaciju simpatičkog živčanog sustava koja rezultira smanjenom krvnom opskrbom žlijezda slinovnica i promjenom kvalitete sline [43]. Smanjenje količine sline može se objasniti i promjenama u arhitekturi žljezdanog tkiva. U istraživanjima na štakorima opisane su promjene u arhitekturi žlijezda slinovnica izloženih dimu cigarete. Uočene su promjene u doušnim i podčeljusnim žlijezdama koje govore u prilog atrofije i upalne infiltracije acinarnih stanica. U sekretornim stanicama prisutno je povećanje udjela i fibroza izvanstaničnog matriksa koje su rezultat

povećanog broja kolagenih vlakana tip III i tip I. Prisutno je i povećanje broja nezrelih intraacinarne sekretornih granula s malim udjelom glikoproteina. Kod pušača konvencionalnih cigareta pronađene su veće količine guste, mukozne sline koje su rezultat gubitka funkcije doušne žlijezde i posljedične kompenzacije i povećanog lučenja iz podčeljusnih i podjezičnih žlijezda [44]. Upravo povećano lučenje podčeljusnih i podjezičnih žlijezda rezultira povećanim udjelom mukozne, guste sline koja može stvarati osjećaj suhoće, otežanog gutanja ili olakšati razvoj karijesa. Tvari iz duhanskog dima negativno utječu i na zaštitne makromolekule sline, enzime, proteine i salivarne elektrolite narušavajući protektivnu ulogu sline i homeostazu oralnog zdravlja [37, 45]. Kemijski sastav salivarnih elektrolita nije značajno promijenjen u odnosu na nepušače, a prema manjem broju istraživanja smanjene su razine kalcija, magnezija, cinka i fosfora u slini pušača što pogoduje demineralizaciji i razvoju karijesa [44].

Učinak novih duhanskih preparata bez izgaranja na salivaciju proučavan je u jednom istraživanju provedenom na 32 THS pušača, 17 pušača konvencionalnih cigareta, 14 dualnih pušača (konvencionalne cigarete i THS), te 149 nepušača. Rezultati su pokazali da je salivarna sekrecija kod pušača THS-a i pušača konvencionalnih cigareta značajno niža u odnosu na nepušače, a da pri tome ne postoji razlika između različitih duhanskih proizvoda [18].

1.3. Utjecaj duhanskih preparata na gljive roda *Candida*

Gljive i kvasci, osobito vrste *Candida*, su komenzalni mikroorganizmi usne šupljine. U literaturi se navodi da se različite vrste *Candida* mogu izolirati u 17-75 % zdravih odraslih osoba, ne predstavljajući patološki nalaz ili prisustvo bolesti [46]. Najčešća izolirana vrsta u 70-80 % je *Candida albicans*, dok su manje zastupljene izolirane vrste *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*. *Candida* se smatra oportunističkim patogenom koji dovodi do nastajanja infekcije u slučaju da su prisutni čimbenici koji utječu na stanje oralne sluznice i čimbenike virulencije gljive. Predisponirajući čimbenici za nastanak oralne kandidijaze su starija i mlađa dob, oslabljen imunosni mehanizam domaćina, sustavne bolesti (imunosupresijske bolesti, nutritivne deficijencije, maligne bolesti, šećerna bolest), uzimanje

lijekova (antibiotici, kortikosteroidi i imunosupresivni lijekovi), te lokalni čimbenici (smanjeno lučenje slina, nošenje protetskih nadomjestaka, loša oralna higijena). Uz spomenute predisponirajuće čimbenike potrebno je napomenuti da je pušenje jedan od najvažnijih okolišnih čimbenika koji može utjecati na nastajanje oralne kandidijaze [47]. U literaturi se mogu pronaći istraživanja koja sugeriraju da pušenje i upotreba nikotinskih proizvoda ima negativni utjecaj na gljive roda *Candida* povećavajući njihov udio u usnoj šupljini [46, 48, 49]. Istraživanje koje je proučavalo učinak različitih duhanskih proizvoda s nikotinom potvrdilo je da pušači imaju značajno veći postotak kandidate u usnoj šupljini. Metodom obriska uspješno je izolirana kandida u 58,3 % pušača u usporedbi s 36,7 % u nepušača. *Candida albicans* je najčešće izolirana vrsta gljive u pušača, dok su ostale vrste podjednako bile izolirane u obje skupine [49]. Ovo istraživanje temeljilo se na različitim duhanskim proizvodima koji u svom sastavu imaju nikotin, a rezultati sugeriraju da dim cigarete sadrži nutritivne čimbenike (nikotin, amini, aromatski ugljikovodici) koji predstavljaju izvor hranjivih tvari i odgovarajući okoliš za proliferaciju gljive [49, 50]. Također, inducibilni enzimatski sustavi gljive mogu pretvoriti aromatske ugljikovodike u kancerogene produkte što objašnjava činjenicu zašto su pušači skloniji kandidijalnoj leukopakiji i imaju veći potencijal maligne preobrazbe u usporedbi s nepušačima [50]. Pušenje i duhanski dim također utječu i na čimbenike virulencije gdje pospešuju prijelaz u hifalni oblik te utječu na ekspresiju određenih gena koji promiču adheziju, stvaranje i rast biofilma [48, 49]. U pušača su češće prisutne i lokalne epitelne promjene koje rezultiraju lakšim prodiranjem hifa kroz mukoznu barijeru [50, 51]. Nadalje, nikotin i sastojci duhanskog dima uzrokuju funkcionalne i strukturne promjene keratinocita smanjujući njihovu antifungalnu aktivnost [48, 49]. Povećana učestalost kolonizacije može se objasniti i sekundarnim učinkom hiposalivacije koja je češće prisutna u pušača. Smanjeno lučenje slina praćeno je smanjenjem pH vrijednosti i kiselim okolišem koji pogoduje povećanju kolonizacije i rastu kandidate [18]. Uz kiseli okoliš, pušenje smanjuje aktivnost oralnih leukocita i smanjuje lučenje gingivne krevikularne tekućine koja je izvor obrambenih molekula i imunoglobulina [47, 50]. U pušača je dokazana smanjena koncentracija imunoglobulina A (IgA) i smanjena funkcija neutrofila koji posljedično pogoduju kolonizaciji [46, 50]. Utjecaj novih sustava

duhana bez izgaranja do sada nije proučavan na gljive roda *Candida*.

1.4. Utjecaj duhanskih preparata na razvoj halitoze

Halitoza ili neugodni zadah se vrlo često povezuje s pušenjem konvencionalnih cigareta. Prethodno provedena istraživanja navode da je pušenje treći po učestalosti uzroka neugodnog zadaha, odmah nakon parodontnih bolesti i loše oralne higijene [52, 53]. U meta analizi navedeni su različiti mehanizmi koji objašnjavaju povezanost halitoze i pušenja konvencionalnih cigareta, dok prema našim saznanjima samo jedno istraživanje objektivnim metodama određuje prisustvo halitoze u pušača THS-a [52]. Neugodni zadah u pušača THS-a je blažeg intenziteta i subjektivno je rjeđe reportiran od strane ispitanika. Potencijalni razlog smanjena intenziteta neugodnog zadaha može se objasniti izostankom sagorijevanja duhana i smanjenim udjelom opasnih i potencijalno opasnih sastojaka [54]. Naime kod pušača konvencionalnih cigareta, sagorijevanjem duhana oslobađaju se tvari koji se apsorbiraju u krvotok, a zatim u plućima prelaze u zrak i uzrokuju neugodni zadah pri izdisaju [55]. Osim ekstraoralnog porijekla, neugodni zadah može potjecati i iz usne šupljine. Pušenje uzrokuje promjene u komezalnoj oralnoj flori i pogoduje povećanju broja patogenih mikroorganizama i stvaranju oralnog biofilma. U meta analizi koja je proučavala oralni mikrobiom pušača pokazalo se da je streptokok dominantni rod u većini istraživanja. U zdravoj populaciji streptokoki su vrlo često prisutni u supragingivnom i subgingivnom plaku, a svojim inhibitornim mehanizmima moduliraju imunosni odgovor te pogoduju daljnjem razvoju biofilma. Druge bakterije koje su bile značajno povišene kod pušača su bile anaerobne vrste koje su uključivale *Prevotella species* (spp.), *Veillonella* spp. i *Actinomyces* spp. Povećan udio anaeroba nastaje zbog deprivacije kisika pušenjem, a rezultira metabolizmom sumporne aminokiseline i stvaranjem hlapljivih spojeva sumpora koji su najčešći uzrok neugodnog zadaha [56]. Drugo istraživanje, također, navodi da pušači konvencionalnih cigareta imaju raznovrsniju mikrobnu kolonizaciju u odnosu na nepušače. Kod skupine pušača najprevalentniji su bili *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus*, *Micrococcus* spp., dok su kod nepušača najprevalentniji *Streptococcus* spp., *Enterococcus* i *Bacillus* spp. [57]. Pušenje se također povezuje s povećanom učestalošću i težim oblicima oralnih bolesti. Najučestalija

patološka stanja u pušača su parodontitis i obloženi jezik. Oba stanja su karakterizirana većom kolonizacijom anaerobnih bakterija koje se smatraju uzročnicima intraoralne halitoze. Također, smanjena količina sline pogoduje nastanku neugodnog zadaha u pušača [52]. U konačnici kod pušača je uočena lošija oralna higijena u odnosu na nepušače koja također dovodi do nastanka neugodnog zadaha [52, 58].

1.5. Utjecaj duhanskih preparata na olfaktornu i gustatornu funkciju

Olfaktorna i gustatorna funkcija omogućuje percepciju mirisa i okusa, te zaštitu organizma od potencijalno štetnih kemikalija, plinova ili hrane. Miris i okus usko su povezane funkcije, a njihova međusobna povezanost može se objasniti prisutnošću olfaktornih receptora u nosnicama i nazofarinksu. Olfaktorni receptori u nazofarinksu aktiviraju se tijekom žvakanja i nadopunjuju informaciju mirisa s okusnom [41]. Poremećaji okusa i mirisa mogu se podijeliti na kongenitalne i stečene, te one koji su uzrokovani unutarnjim ili vanjskim čimbenicima [59]. Od vanjskih čimbenika potrebno je izdvojiti pušenje i duhanski dim koji ima reverzibilni utjecaj i uzrokuje smanjenje ili potpuni gubitak funkcije. Stupanj oštećenja funkcije povezan je s dužinom, izloženosti te koncentracijom i toksičnošću duhana [41, 59].

Smanjenje funkcije mirisa (hiposmija) ili potpuni izostanak funkcije (anosmija) koji se razvijaju kao posljedica pušenja konvencionalnih cigareta vrlo su česti, a smatra se da pušači imaju 60 % veći rizik od razvoja olfaktorne disfunkcije [59, 60]. Razvoj mirisne disfunkcije u pušača može se objasniti morfološkim promjenama sluznice koje su praćene smanjenjem broja i veličine krvnih žila, cilija i receptorskih stanica [61]. Istraživanja na miševima pokazala su da već nakon kratkotrajnog izlaganja (6-9 dana) olfaktorne sluznice dimu cigarete dolazi do smanjenja broja krvnih žila, receptora i cilija [62]. Također, u lokalne promjene olfaktorne sluznice koje su rezultat iritacije duhanskim dimom ubraja se i pločasta metaplazija kod koje se olfaktorni cilindrični epitel reverzibilno zamjenjuje s pločastim. Slične promjene zamijećene su i na respiratornom epitelu pušača gdje prestankom pušenja u periodu od 6 mjeseci dolazi do značajnog smanjenja metaplastičnih promjena [59]. Izloženost duhanskom dimu povezuje se i

s povećanom stopom apoptoze u olfaktornim neuronima. Mehanizam apoptoze dominantan je u senzornim olfaktornim neuronima gdje mitozom i maturacijom progenitornih epitelnih stanica dolazi do zamjene nefunkcionalnih stanica novim funkcionalnim. Ove promjene u olfaktornom sustavu opisane su kod fiziološkog procesa starenja, upalnih stanja i animalnih modela izloženih dimu cigareta. U animalnim modelima apoptoza je posredovana enzimom kaspaze-3 koji pokazuju povećanu aktivnost u olfaktornom epitelu miševa izloženih dimu cigarete [63]. Nadalje, potencijalni mehanizam olfaktorne disfunkcije u pušača može se objasniti i češćom upalom sinusne i/ili nazalne sluznice ili indirektnim djelovanjem duhanskog dima na njušni epitel čineći ga osjetljivijim na druge iritanse (npr. zagađivači zraka, teški metali) [59]. Utjecaj pušenja na lokalnoj razini dovodi do reverzibilnih promjena, a prestanak pušenja vodi oporavku funkcije mirisa. Biološke promjene u olfaktornom sustavu rezultat su iritacije duhanskim dimom ili trigeminalne stimulacije koja posljedično inhibira aktivaciju njušnog živca i percepciju mirisa [64]. Iako nisu pronađene razlike u olfaktornoj funkciji, pušači imaju manji volumen olfaktornog bulbusa i sive tvari u olfaktornom girusu, tkivu povezanom s primarnim olfaktornim korteksom, u usporedbi s nepušačima [59, 65].

Smanjenje funkcije okusa (hipogeuzija) i potpuni nedostatak funkcije (ageuzije) vrlo često prati olfaktornu disfunkciju, a patofiziološki mehanizmi nastanka se također mogu opisati na lokalnoj i centralnoj razini. Na lokalnoj razini okusna disfunkcija se može objasniti morfološkim promjenama gljivastih papila i smanjenim brojem okusnih stanica. Kontaktnom endoskopijom se pokazalo da pušenje utječe na broj, veličinu i morfologiju gljivastih papila. U pušača je broj gljivastih papila manji, prisutna je značajna distorzija ili malformacija papile te je veća količina keratina na samom vrhu papile. Uz morfološke promjene, oslabljena je i mikrocirkulacija gljivastih papila karakterizirana slabo vidljivim kapilarnim strukturama s nejasnim ili elongiranim petljama [66, 67]. Istraživanja na štakorima govore o sličnim anatomskim promjenama, ali također sugeriraju da je smanjenje veličine okusnog organa praćeno i smanjenim brojem receptorskih stanica po okusnom pupoljku. Nadalje, kronična izloženost nikotinu uzrokuje povećanje gustoće stanica koje izražavaju gustducin, G protein, koji ima veliku ulogu u prijenosu gorkih i slatkih podražaja [68]. Slina ima važnu ulogu u osjetu okusa

i njezin nedostatak smatra se jednim od glavnih uzroka smanjenog osjeta okusa. U inicijalnoj fazi, slina otapa okusne sastojke i prenosi ih do okusnih receptora. Tijekom otapanja dolazi do interakcije između sastojaka sline i okusnih tvari. Drugi učinak sline je transdukcija okusa gdje sastojci sline kontinuirano podražuju receptore okusa. I treći učinak sline je zaštita receptora okusa od potencijalnih oštećenja, infekcija i atrofije [69]. Duhan i duhanski proizvodi utječu na sastav vitamina i mikronutrijenata, osobito vitamina B, D, E, i cinka. Od vitamina B kompleksa potrebno je izdvojiti vitamin B12 i folnu kiselinu. Nedostatak folne kiseline i vitamina B12 kod pušača je učestalija pojava čak i uz redoviti unos hranom, a njihov nedostatak pogoduje razvoju anemije koja se u usnoj šupljini manifestira glositisom ili upalom jezične sluznice. Upala jezične sluznice praćena je karakterističnim izgledom glatkog, crvenog i atrofičnog jezika te depapilacijom što rezultira smanjenjem ili gubitkom osjeta okusa. Također, osim okusa nedostatak vitamina B12 utječe i na osjet mirisa gdje smanjene razine homocisteina i neučinkovita metilacija homocisteina vode olfaktornoj neuronskoj toksičnosti [70]. Nadalje, dokazano je da pušenje i duhanski dim mogu utjecati na serumsku razinu vitamina D, a osobe s razvijenom deficijencijom imaju 96 % veću učestalost poremećaja osjeta okusa [71]. Provedena klinička istraživanja također navode da manjak vitamina D može biti povezan s razvojem olfaktornih i gustatornih disfunkcija te da ima značajan utjecaj na određene neurone u okusnom putu [70]. Manjak vitamina E se povezuje s razvojem gustatorne i olfaktorne disfunkcije. Uz antioksidativni učinak vitamina E, navodi se također, kao važan čimbenik u apoptozi, prijenosu staničnih signala i rasta različitih staničnih linija. Iako mehanizam na koji manjak vitamina E uzrokuje olfaktornu i gustatornu disfunkciju još nije u potpunosti jasan, smatra se da vitamin E ima važnu ulogu u rastu i razvoju matičnih stanica u okusnim pupoljcima i olfaktornom epitelu [72]. Cink ima važnu ulogu u osjetu okusa te sudjeluje u njegovoj regulaciji na razini okusnih pupoljaka, prijenosnih puteva i mozga. Ovaj mikronutrijent ima važnu ulogu u arhitekturi stanica, održavanju integriteta stanične membrane i kontroli aktivnosti nekoliko citoplazmatskih i membranskih enzima. U istraživanjima se opisuje da ispitanici koji uzimaju lijekove ili boluju od kroničnih bolesti povezanih s metabolizmom cinka često navode smanjenje osjeta okusa [70, 72]. Pušenje i nikotin mogu utjecati i modulirati

prijenos signala osjeta okusa u središnjem živčanom sustavu. Rezultati istraživanja sugeriraju da aplikacija nikotina na jezik štakora modificira odgovor neurona u jezgri solitarnog trakta koji je glavni put prijenosa okusnog podražaja [73].

1.6. Utjecaj duhanskih preparata na salivarne citokine

Potencijalno opasni i opasni sastojci duhanskog dima utječu na humoralni i stanični imunosni odgovor [74]. Lokalne iritacije duhanskim dimom, nikotin i njegovi metaboliti mogu utjecati na lokalni humoralni odgovor mijenjajući reakciju domaćina na antigene bakterijskog plaka, te smanjujući kemotaksiju, fagocitozu i neutralizaciju bakterijskih enzima. Dugotrajna ili kronična izloženost nikotinu suprimira stanični imunosni odgovor kroz smanjenu proizvodnju protutijela, te narušenu antigensku signalizaciju u limfocitima T [19]. Pušenje utječe na funkciju makrofaga, dendritičkih stanica, NK stanica, T i B limfocita. Utjecaj duhana na ove stanice može se objasniti genetskim/epigenetskim modifikacijama ili djelovanjem molekula oksidativnog stresa koje pojačavaju ili smanjuju upalnu reakciju koja je posredovana citokinima [74].

Citokini su niskomolekularni glikoproteini koji imaju važnu ulogu u signalizaciji stanica. Reakcije posredovane citokinima događaju se kada se oni aktiviraju, to jest kada se vežu na ciljane receptore. Na njihovu ekspresiju mogu utjecati različiti čimbenici kao što su kompleksi protutijela, DNK, komponentne izvanstaničnog matriksa, mikroorganizmi i njihovi patogeni, te reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi koje se oslobađaju i tijekom pušenja. Nakon aktivacije, citokini imaju mnogobrojne uloge koje uključuju proliferaciju i diferencijaciju stanica imunosnog odgovora, imunoregulaciju, indukciju drugih citokina i posljedičnu kaskadu signala. Citokine proizvodi širok spektar stanica koje uključuju makrofage, B limfocite, T limfocite, mastocite, endotelne stanice, fibroblaste i razne stromalne stanice. Biološka aktivnost citokina, danas služi kao biomarker za praćenje aktivnosti pojedinih bolesti ili životnih navika (pušenje). Najčešće se kao medij izolacije koristi krvna plazma ili serum. Međutim, slina kao potencijalni medij izolacije predstavlja jednostavnu, alternativnu i manje invazivnu tehniku.

Postupak uzorkovanja sline je jednostavan, bezbolan, neinvazivan, jeftin i ne zahtijeva stručno osoblje. U slini najčešće proučavani proupalni citokini su interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 β (IL-1 β), i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- α), dok je interleukin 2 (IL-2) do sada proučavan u izrazito malom broju istraživanja [1].

IL-6 je pleiotropni citokin koji je uključen u brojne biološke procese koji uključujući upalu, starenje, rast stanica i apoptozu. IL-6 inicira i pojačava upalu, pokreće oslobađanje proteina akutne faze, regulira upalni odgovor, privlači imunosne stanice na mjesto ozljede ili infekcije te potiče koagulaciju [75]. U usnoj šupljini može se izolirati iz sline ili gingivalne krevikularne tekućine, a sintetizira ga mnoštvo stanica koje uključuju makrofage, T i B limfocite, neutrofile, endotelne stanice, keratinocite, fibroblaste i žljezdane stanice. Istraživanja na miševima navode da zdrave acinarne stanice u doušnoj žlijezdi mogu sintetizirati IL-6, pohraniti ga u sekretorne granule i potom izlučiti nakon adrenergične stimulacije. Prema istraživanjima razine salivarnog IL-6 različito koreliraju s razinama u plazmi ili serumu, a kod zdravih pojedinaca koncentracije u pg/ml su obično niske ili ispod razine detekcije [76, 77]. Na lučenje salivarnog IL-6 mogu utjecati psihosocijalni čimbenici, dob, cirkadijalni ritam i okolišni čimbenici kao što je pušenje pri čemu oralni keratinociti luče povišene vrijednosti IL-6 kao odgovor na duhanski dim [75]. Jedan je od najproučavanijih citokina u slini i njegove povišene vrijednosti do sada su opisane kod parodontnih bolesti, endodontskih infekcija, oralnog lihen planusa, Sjögrenovog sindroma, oralnih premalighnih poremećaja i oralnog karcinoma [75, 77].

TNF- α je snažan pluripotentni citokin koji ima važnu ulogu u urođenim upalnim odgovorima. TNF- α sudjeluje u infektivnim procesima gdje aktivira kemokine i citokine koji privlače i aktiviraju limfocite na mjestu infekcije, te sudjeluje u razvoju stečenog imunosnog odgovora na infekciju, remodeliranju tkiva i apoptozi tumorskih stanica. TNF- α uglavnom proizvode aktivirani makrofazi, ali ga također luči i veliki broj drugih stanica kao što su mastociti, neutrofil, T limfociti, NK stanice, astrociti, miociti i fibroblasti [1]. Kronična disregulacija TNF- α povezuje se s kroničnim upalnim bolestima kao što je reumatoidni artritis, upalna bolest crijeva, psorijaza i astma. U usnoj šupljini može se detektirati u slini i gingivalnoj krevikularnoj tekućini, a mali broj istraživanja sugerira koleraciju salivarnih i serumskih razina [78]. U

zdravih osoba bez znakova upalnih procesa, razine salivarnog TNF- α su u niskom do nemjerljivom pg/ml rasponu. Povišene razine salivarnog TNF- α dokazane su u gingivitisu, parodontitisu, oralnom karcinomu i oralnom lihen planusu [1, 79].

IL-1 β je ključni proupalni citokin koji se oslobađa nakon prezentacije antigena, infekcije ili ozljede tkiva. Samostalno ili u kombinaciji s drugim citokinima djeluje kao multifunkcionalna signalna molekula na skoro sve stanične tipove zbog čega je intenzivno proučavan u literaturi [80]. U usnoj šupljini IL-1 β je prisutan u slini i gingivalnoj krevikularnoj tekućini, a stanice koje su izvor IL-1 β u usnoj šupljini su makrofazi, monociti, fibroblasti i epitelne stanice. Također, dokazano je da se ovaj citokin sintetizira i oslobađa iz acinarnih i duktalnih stanica žlijezda slinovnica [78, 81, 82]. U slini IL-1 β je prisutan kod zdravih i bolesnih osoba, a njegove razine općenito su više u slini nego u plazmi ili serumu gdje su često ispod granice detekcije [80]. Korelacija salivarnih razina IL-1 β s krvnim razinama nije zabilježena kod ljudi. Također, razine IL-1 β u slini mijenjaju se kao odgovor na razne fizičke i psihičke stresore, te su ovisne o dobi i cirkadijalnom ritmu. Disregulacija IL-1 β uključena je u brojne sustavne bolesti, osobito one koje su praćene konstantnim niskim stupnjem upale zbog čega se često ovaj citokin koristi kao biomarker upale [83]. Salivarne razine IL-1 β do sada su proučavane u gingivitisu, parodontitisu, Sjögrenovom sindromu i oralnom karcinomu [82, 84].

IL-2 ima nekoliko uloga u imunosnom sustavu i prvenstveno djeluje na T limfocite. Luče ga aktivirani pomagački limfociti i smatra se hormonom rasta limfocita T. Njegove glavne uloge uključuju diferencijaciju nezrelih T limfocita u regulatorne T stanice koje predstavljaju zaštitu od autoimunih procesa. U prisutnosti stimuliranog antigena, IL-2 pokreće diferencijaciju T limfocita u efektorske T limfocite i kasnije u memorijske T limfocite koje funkcioniraju u borbi protiv infekcija. Također, IL-2 potiče diferencijaciju T limfocita u Th1 i Th2 limfocite dok inhibira diferencijaciju Th17. Na njegovo lučenje mogu utjecati različiti psihološki stresori [83]. Povišene razine salivarnog IL-2 do sada su opisane kod sindromoma pekućih usta i rekurentnog aftoznog stomatitisa [85, 86].

Veliki broj istraživanja proučava učinak pušenja konvencionalnih cigareta na razine salivarnih citokina [87-89]. Pušači konvencionalnih cigareta imaju povećano lučenje TNF- α , IL-1, IL-6 i IL-2. Glavni izvor upalnih molekula u usnoj šupljini su makrofazi koji doprinose eliminaciji bakterija i virusa. Njihova povećana aktivnost rezultira povećanom proizvodnjom citokina i slobodnih radikala kisika. Opasni sastojci cigaretnog dima također mijenjaju i omjer T pomoćničkih limfociti, te povećavaju lučenje njihovih citokina (IL-2) [88]. Osim povišenih salivarnih vrijednosti citokina u slini pušača, IL-1 β smatra se biomarkerom aktivnog pušenja, dok su povišene vrijednosti TNF- α proporcionalne intenzitetu pušenja (broju popušenih cigareta u danu) [19, 90]. Efekt pušenja na salivarne citokine ovisan je o dobi i karakteristikama imunskog sustava domaćina, a ekstenzivno je ovaj odnos proučavan kod ispitanika s parodontitisom, leukoplakijom i oralnim karcinomom [91-95].

In vitro istraživanja na staničnim kulturama humanih bronhijalnih epitelnih stanica pokazala su snižene razine IL-1 β i IL-6 u usporedbi s kulturama izloženim konvencionalnim cigaretama, a povišene vrijednosti u usporedbi s kontrolnim kulturama [6, 12]. Također, slični rezultati dobiveni su i u istraživanju provedenom na bukalnim i gingivnim kulturama [16, 17]. Učinak novih duhanskih sustava grijanja duhana bez izgaranja na razine salivarnih citokina do sada je opisan u jednom istraživanju koje je proučavalo učinak konvencionalnih cigareta, električnih cigareta i THS-a na salivarne citokine, kemokine i čimbenike rasta. Na temelju provedenog istraživanja potvrdilo se da električne cigarete i THS sustavi na sličan način kao i konvencionalne cigarete djeluju na imunosni odgovor [19].

1.7. Utjecaj duhanskih preparata na biomarker oksidativnog stresa – 8-OHdG

U duhanskom dimu nalaze se slobodni radikali koji uzrokuju oksidativna oštećenja DNK i koji oslobađaju molekule oksidativnog stresa. Benzen, kadmij, benzopiren i ostali toksični spojevi pospješuju stvaranje slobodnih kisikovih i dušikovih radikala koji lako oksidiraju stanične biomolekule (lipide, proteine, nukleinske kiseline). U stanju kada antioksidativni mehanizmi ne mogu neutralizirati slobodne kisikove i dušikove radikale nastaje oksidativni stres koji

narušava metabolizam stanice i uzrokuje staničnu smrt [19]. Poremećaj oksidacijsko-redukcijskih procesa i prekomjerno stvaranje slobodnih kisikovih i dušikovih radikala koji uzrokuju oštećenje DNK i njegovih prekursora rezultiraju oslobađanjem 8-hidroksideoksiganozina (8-OHdG) kao biomarkera endogenog oštećenja DNK (baze gvanina ili nukleozida gvanozina). Razine 8-OHdG-a do sada su ispitivane u različitim biološkim tekućinama i tkivima, a na njihove vrijednosti mogu utjecati alkohol, tjelovježba, unos drugih antioksidansa, diurnalni ritam lučenja i psihosocijalni čimbenici. Povišene serumske razine 8-OHdG-a povezuju se sa starenjem i sustavnim bolestima koje uključuju šećernu bolest, respiratorne bolesti, aterosklerozu, tumore, reumatoidni artritis, parodontitis, upalne bolesti crijeva i neurodegenerativne bolesti [96, 97]. Slina je prva tekućina čiji se antioksidativni sustavi suprotstavljaju slobodnim radikalima proizvedenim tijekom pušenja, a povišene vrijednosti 8-OHdG-a pronađene su kod pušača, trudnica, osoba oboljelih od parodontitisa i oralnog karcinoma [98, 99]. Utjecaj novih duhanskih sustava na biomarkere endogenog oštećenja DNK koji su izolirani iz sline do sada nije proučavan u literaturi.

1.8. Psihološki simptomi povezani s pušenjem

Veliki broj istraživanja sugerira povezanost između pušenja i psiholoških simptoma depresivnosti, tjeskobe i stresa [100]. Kvantitativne i kvalitativne analize pokazuju da pušači često konzumiraju cigarete kako bi ublažili emocionalni disbalans, suzbili depresivne i anksiozne osjećaje, smanjili razinu stresa te u konačnici postigli stabilizaciju raspoloženja [101]. Opisani simptomi često se javljaju kod psiholoških i psihijatrijskih poremećaja, a upravo veliki broj tih osoba su pušači koji puše više i duže u usporedbi s psihološki zdravim pušačima. Iako je postotak pušača u svjetskoj populaciji u padu, konzumacija među pušačima s mentalnim bolestima ostala je relativno visoka (57-66 % osoba oboljelih od mentalnih poremećaja su pušači) [100]. Utjecaj pušenja i psiholoških simptoma se može objasniti različitim hipotezama temeljnim na pretpostavkama da pušenje i psihološki simptomi imaju zajednički uzrok, da pušenje predstavlja način kompenzacije psiholoških simptoma i svojevrsnu pomoć u olakšanju

simptoma, te da pušenje uzrokuje pogoršanje psiholoških simptoma [100, 102]. Uvriježeno mišljenje među pušačima je da pušenje uzrokuje olakšavanje njihovih simptoma, iako ih zapravo ono uzrokuje. Nikotin je psihoaktivni alkaloid koji izaziva ovisnost, a prestankom pušenja i njegovim nedostatkom dolazi do razvijanja simptoma ustezanja koji su praćeni s uznemirenosti, anksioznosti i depresivnosti. Konzumacija nove cigarete i unos nikotina uzrokuje olakšanje tih simptoma i stvara lažnu percepciju olakšavanja psiholoških smetnji iako ih je prvotno ono i uzrokovalo [101]. Pušenje u početnim stadijima može olakšavati psihološke simptome, ali razvojem ovisnosti i kroničnom upotrebom dolazi do pogoršanja psihološkog stanja. Ova hipoteza temeljena je na činjenici da se nikotin veže na kolinergične receptore u mozgu i uzrokuje oslobađanje dopamina koji stvara osjećaj zadovoljstva, smanjuje stres, tjeskobu i poboljšava koncentraciju. U kasnijim stadijima pušenja upravo ta kronična izloženost nikotinu izaziva smanjenu osjetljivost acetilkolinških receptora na nikotin te rezultira smanjenim lučenjem dopamina, potrebom za učestalijom konzumacijom cigareta ili pušenjem, te u konačnici pogoršanjem psiholoških simptoma [102]. U usnoj šupljini se također mogu pojaviti fizičke manifestacije psiholoških simptoma. Najčešći nespecifični somatoformni simptomi koji se javljaju u usnoj šupljini su simptomi oralnih disestezija (peckanje, promjene osjeta okusa, atipična facijalna bol). Uz njih moguće su i pojave aftoznih promjena, palatalnih erozija ili grickanja usnica [103]. Oralne disestezije, ali i ostale oralne manifestacije psiholoških bolesti se često manifestiraju u pušača konvencionalnih cigareta, pri čemu je zbog prethodno opisane povezanosti teško odrediti što je uzrok navedenih promjena. Također, prema kliničkim i epidemiološkim istraživanjima, dugotrajna uporaba nikotinskih proizvoda povezuje se s povećanom razinom salivarnih biomarkera oksidativnog stresa i egzacerbacijom emocionalnog distresa [98]. Povišene vrijednosti oksidativnog stresa i sniženje antioksidativnog kapaciteta prisutne su kod pušača s depresivnim poremećajima [104]. Povišene vrijednosti 8-OHdG-a pronađene su u urinu, cerebrospinalnoj tekućini, serumu i plazmi osoba s povišenim razinama psihološkog stresa, te simptomima depresivnosti i anksioznosti. Prema dostupnoj literaturi, ne postoji istraživanje koje proučava povezanost salivarnog 8-OHdG-a, pušenja i psiholoških simptoma stresa, depresivnosti i anksioznosti [105].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj:

Utvrditi utjecaj aerosola duhana bez izgaranja na strukture usne šupljine i usporediti učinak aerosola s učincima konvencionalnih cigareta.

Specifični ciljevi:

- Utvrditi morfološke karakteristike sluznice i prevalenciju gljivične infekcije (kandidijaze) u osoba neekspoziranih duhanu, osoba ekspoziranih dimu sagorenog duhana te onih ekspoziranih aerosolu zagrijanog duhana bez izgaranja.
- Usporediti olfaktorne i gustatorne sposobnosti osoba neekspoziranih duhanu, osoba ekspoziranih dimu sagorenog duhana te onih ekspoziranih aerosol zagrijanog duhana bez izgaranja.
- Utvrditi specifične karakteristike sline (količina, biomarkeri upale i oksidativnog stresa- IL-6, IL-1 β , IL-2, TNF- α , 8-OHdG) osoba neekspoziranih duhanu, osoba ekspoziranih dimu sagorenog duhana te onih ekspoziranih aerosolu zagrijanog duhana bez izgaranja.
- Utvrditi povezanost razine biomarkera oksidativnog stresa i psihološkog statusa ispitanika.

Hipoteze istraživanja

1. Najviše izražene promjene u izgledu sluznice, količini sline te prevalenciji gljivične infekcije očekuju se kod pušača konvencionalnih cigareta. U pušača THS-a očekuju se blaže promjene u odnosu na pušače konvencionalnih cigareta, ali veće u odnosu na nepušače.
2. Najznačajnije razlike u razinama upalnih biomarkera i biomarkera oksidativnog stresa u slini između ispitivanih skupina očekuju se kod pušača. U pušača THS-a prisutne su manje značajne promjene u razinama salivarnih citokina u odnosu na pušače konvencionalnih cigareta, ali veće promjene u odnosu na nepušače.
3. Dim cigareta uzrokuje neugodan zadah, njušnu i mirisnu disfunkciju, pri čemu se kod pušača THS-a očekuju manje promjene u odnosu na pušače konvencionalnih cigareta.
4. Pušači konvencionalnih cigareta i pušači duhanskih preparata bez izgaranja postižu veće vrijednosti na skalama anksioznosti, depresivnosti i stresa.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na Klinici za dentalnu medicinu Kliničkog bolničkog centra u Rijeci i Fakultetu dentalne medicine u Rijeci. Svi ispitanici prije početka istraživanja bili su upoznati sa svrhom istraživanja te su potpisivanjem Informiranog pristanka dali svoje odobrenje za sudjelovanje. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške Deklaracije i odobreno od Etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka (Klasa:003-05/22-1/32; Ur.broj: 2170-29-02/1-22-2), Etičkog povjerenstva Fakulteta dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci (Klasa:602-03/22.01/75; Ur.broj:2170-57-006-01-22-1) i Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (Klasa:007-08/22-01/61; Ur.broj:2170-24-04-3/1-22-6).

U ovom presječnom istraživanju sa stratificiranim uzorkom sudjelovalo je 90 ispitanika podijeljenih u 3 skupine. Prvu skupinu od 30 ispitanika činili su nepušači (kontrolna skupina), drugu skupinu pušači konvencionalnih cigareta, i treću skupinu pušači duhana bez izgaranja (THS). U svim skupinama ispitanici su bili upareni prema dobi i spolu kako bi se smanjio utjecaj zbunjujućih varijabli i postigla veća homogenost između skupina.

Uključujući čimbenici za testne skupine (pušači konvencionalnih cigareta i pušači THS-a) bili su punoljetnost, pozitivna anamneza konzumacije duhanskih proizvoda (tvornički proizvedene cigarete ili *HEETS*) te negativna anamneza sustavnih bolesti i konzumacije lijekova koji bi mogli utjecati na imunosni odgovor, salivaciju ili olfaktornu i gustatornu funkciju. Ispitanici su bili identificirani kao pušači ako su u upitniku o pušenju označili da su pušači konvencionalnih cigareta ili pušači THS-a te su potvrdno odgovorili na pitanja „Jeste li tijekom svog života konzumirali najmanje 100 cigareta?“ [106]. Nadalje, pušači THS su se smatrale osobe koje su konzumirale isključivo duhanske preparate bez izgaranja unazad 6 mjeseci.

Iz istraživanja su se isključile trudnice, ispitanici koji su koristili terapiju antibiotika, protugljivičnih lijekova i antiseptika u zadnjih 30 dana, osobe oboljele od lokalnih stanja (parodontitis, akutni nekrotizirajući ulcerozni gingivitis, bolesti žlijezda slinovnica, upale usta

– *erythema multiforme*, pemfigus, lihen planus), osobe oboljele od sustavnih bolesti (šećerna bolest, maligne bolesti, arterijska hipertenzija, GERB, bolesti jetre, srca i bubrega, akutne infektivne bolesti i bolesti štitnjače, neurodegenerativne bolesti, autoimune bolesti), osobe koje konzumiraju lijekove iz skupina antikolinergika, antiparkinsonika, antiepileptika, antihistaminika, antidepresiva, diuretika, antihipertenziva, hipnotika, mišićnih relaksatora, narkotika, simpatomimetika, spazmolitika, anksiolitika, bronhodilatatora, hipoglikemika, statina, retinoida, analgetika i protuupalnih lijekova, osobe na kemoterapiji, radioterapiji i biološkoj terapiji, imunokompromitirani i transplantirani pacijenti, osobe s olfaktornom i gustatornom disfunkcijom.

Kriterij uključena kontrolnih ispitanika bio je punoljetnost, negativna anamneza konzumacije duhanskih preparata te negativna anamneza sustavnih/lokalnih bolesti i konzumacije lijekova koji bi mogli utjecati na imunosni odgovor, salivaciju, osjet mirisa i okusa. Kriteriji isključena za kontrolnu skupinu bili su isti kao i za testne skupine.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Prikupljanje podataka o općem zdravstvenom stanju, općim obilježjima ispitanika i navici pušenja

Podaci o općem zdravstvenom stanju i općim obilježjima ispitanika su uključivali dob, spol i stupanj obrazovanja, a prikupljeni su pomoću kratkog anamnestičkog upitnika (Privitak 1) konstruiranog za potrebe ovog istraživanja. Također, prikupljeni su podaci o sustavnim bolestima ispitanika, upotrebi lijekova u kroničnoj terapiji te upotrebi antibiotika, protugljivičnih lijekova i tekućina za ispiranje usne šupljine u prethodnih 30 dana. Podaci o navici pušenja prikupljeni su pomoću upitnika o pušenju (Privitak 1). Upitnik o pušenju je strukturirani upitnik sastavljen za potrebe ovog istraživanja, a prikuplja podatke o vrsti, intenzitetu pušenja te samoreportiranim simptomima i promjenama koji se mogu povezati s pušenjem (pečenje usne šupljine, suhoća usne šupljine, promjena osjeta okusa i mirisa, neugodni zadah, samoreportirane vidljive promjene oralne sluznice). Ispitanici su bili

identificirani kao pušači ako su potvrdno odgovorili da su pušači konvencionalnih cigareta ili pušači THS-a koji su tijekom svog života konzumirali najmanje 100 cigareta [106]. Intenzitet pušenja određen je pomoću indeksa pušenja (Brinkman indeks, BI) koji predstavlja umnožak pušačkog staža u godinama i dnevnog broja konzumacije cigareta [107]. Ovaj indeks kvantificira intenzitet pušenja te sadrži sljedeće kategorije: 0-199 = nizak intenzitet pušenja, 200-599 = umjereni intenzitet pušenja, ≥ 600 = visok intenzitet pušenja [108]. Nadalje, pušači THS-a konzumirali su isključivo duhanske preparate bez izgaranja unazad 6 mjeseci. Također, prikupljeni su podaci o subjektivnim simptomima koje se mogu povezati s pušenjem (pečenje usne šupljine, suhoća usne šupljine, promjena osjeta okusa i mirisa, neugodni zadah, vidljive promjene oralne sluznice), te njihove karakteristike i dužina trajanja. U slučaju potvrdnog odgovora prisutnosti simptoma pečenja dodatno su ispitani mjesto, vrijeme pojave simptoma, frekvencija, intenzitet, predisponirajući i olakšavajući čimbenici. Intenzitet simptoma pečenja određen je pomoću vizualno analogne skale (0-10) (VAS) gdje 0 predstavlja stanje bez osjećaja pečenja, a 10 najveći intenzitet pečenja. U slučaju promjene osjeta okusa, prikupljeni su podaci o tome radi li se o potpunom gubitku ili smanjenom osjetu okusa, te o kojem okusu ili okusima se radi. Ispitanici iz skupine pušača THS-a koji su prethodno pušili konvencionalne cigarete ili bili nepušači ispunili su četiri dodatna pitanja o postojanosti i karakteru subjektivnih simptoma nakon prelaska na THS proizvode. Pitanja su uključivala subjektivnu percepciju simptoma pečenja, suhoće, osjeta mirisa/okusa i respiratornih simptoma.

3.2.2. Klinički pregled

Klinički pregled oralne sluznice vršio se pomoću dentalnog ogledalca uz standardno osvjetljenje, te se zabilježilo prisustvo/odsustvo oralnih promjena, njihova lokalizacija te vrsta promjene. Bilježeni su klinički znakovi: angularnog heilitisa, eksofolijativnog heilitisa, aktiničnog heilitisa, atrofičnog jezika, obloženog jezika, areali na jeziku, suhoća jezika/sluznice, fisuriran jezik, varikoziteti jezika, protetski palatitis (Newton tip I, Newton tip II, Newton tip III), kandidijaze, nikotinskog stomatitisa, pušačke melanoze, hiperpigmentacije,

leukoedem, lihen/lihenoidna reakcija, hiperkeratotične promjene, upala/eritem, atrofija, erozija, ulkus, fibrom, *morsicatio*, lezije uzrokovane protezom/ortodontskim aparatićem.

3.2.3. Test lučenja sline

Ispitanicima je napravljen test lučenja nestimulirane sline metodom pljuvanja. Test se provodio u periodu od 9:00 do 11:00 kako bi se izbjegao učinak cirkadijalnog lučenja sline. Svi ispitanici su bili instruirani da ne piju, ne jedu i ne puše 2 h prije samog testiranja [109]. Metoda pljuvanja je metoda sakupljanja sline u kojoj ispitanici spontano pljuju izlučenu slinu u graduiranu epruvetu dok im je glava lagano nagnuta prema naprijed. Dobivene vrijednosti izražene su u mililitrima po minuta, a vrijednosti brzine lučenja sline manje od 1 ml/5min smatrane su hiposalivacijom [110].

3.2.4. Obrisak oralne sluznice

Svim ispitanicama uzet je obrisak oralne sluznice sa sterilnim štapićem s vatom za detekciju gljive roda *Candida*, i to s obrazne sluznice u slučaju nepostojanja kliničkih znakova infekcije, odnosno određenog dijela sluznice u slučaju postojanja kliničkih znakova infekcije [109,111]. Neposredno nakon uzimanja obriska, isti su standardnom metodom nasađivanja nasađeni na kromogenu podlogu *Chromagar Candida* (CHROMagar, Paris, Francuska) koja identificira pet vrsta *Candide* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida* druge vrste). Nakon inkubacije na 37°C kroz 48 sati vizualnom tehnikom identificirane i prebrojane su različite vrste kolonija kandidate (*C. albicans* – svjetlo zelene kolonije, *C. glabrata* – ljubičasto smeđe glatke kolonije, *C. krusei* – ružičaste kolonije, *C. tropicalis* – plava, metalik plava boje, *Candida* druge vrste – izolati bijele do ljubičaste boje) [112]. Nakon prebrojavanja kolonija, rezultati su zajednički kategorizirani prema sljedećoj ljestivici: bez kolonija, 1-9 kolonija, 10-24 kolonije, 25-100 kolonija, >100 kolonija i konfluentni rast [111].

3.2.5. Halitoza

Prisutnost neugodnog zadaha odredila se organoleptičkom metodom. Prije samog ispitivanja ispitanici su bili instruirani da drže usta zatvorena dvije minute, a potom polako izdahnu kroz otvorena usta. Ispitivač je bio udaljen 5 - 10 cm od usta ispitanika, a neugodni zadah je ocijenio od 0 – 5 (0 – nema zamjetnog mirisa; 1 – vonj se jedva osjeća; 2 – vonj je blag, ali se jasno osjeća; 3 – umjeren vonj; 4 – jak vonj; 5 – izniman smrad) [113].

S obzirom na to da je organoleptička metoda subjektivna metoda procjene neugodnog zadaha, prije početka provođenja istraživanja, dva ispitivača su prošla proces kalibracije i procijenjena je njihova pouzdanost. Prvotno se olfaktornim testom ((*Sniffin' Sticks Screening test* (Burghart Messtechnik, Wedel, Njemačka)) ispitala mirisna funkcija kod dva ispitivača koja su sudjelovala u samoj metodi. Ispitivači su bili instruirani da ne piju kavu, čaj, sok, puše ili koriste mirisne preparate prije same evaluacije. Olfaktorni test sastojao se od 12 mirisnih olovaka koje su bile impregnirane različitim mirisima, a zadatak ispitivača je bio da za svaku olovku izabere jedan od četiri ponuđena odgovora na kartici. Nakon procjene olfaktorne funkcije, na dvadeset ispitanika koji nisu sudjelovali u istraživanju svaki ispitivač je procijenio prisutnost neugodnog zadaha organoleptičkom metodom. Nakon završenog testiranja, odredio se postotak slaganja između ispitivača, te kako bi se isključila slučajna slaganja u subjektivnim procjenama izračunat je Cohenov Kapa koeficijent. Analiza rezultata pokazala je da između ispitivača postoji visoki stupanj osjetljivosti za mirise i gotovo savršen stupanj slaganja između ispitivača ($\kappa=0,90$).

3.2.6. Evaluacije olfaktorne i gustatorne funkcije

Evaluacija olfaktorne funkcije procijenjena je pomoću mirisnog testa (*Sniffin' Sticks Screening test* (Burghart Messtechnik, Wedel, Njemačka)). Test se provodio pomoću 12 mirisnih olovaka koje su impregnirane različitim poznatim mirisima (naranča, koža, cimet, pepermint, banana, limun, likoricija, kava, češnjak, ananas, ruža, riba). Prije provođenja olfaktornih i gustatornih testova ispitanici su bili instruirani da ne jedu, ne piju i ne puše 2 sata prije ispitivanja.

Pojedinačne olovke ispitanici su postavili ispred obje nosnice na udaljenosti od 2 cm i kroz 3 do 4 sekunde, a potom su morali odabrati jednu od četiri ponuđene opcije na kartici proizvođača. Između pojedinačnih olovaka napravljena je stanka od 30 sekundi. Odabrani odgovori prenijeli su se na ispitnu listu i u konačnici se promatrali kao ukupni zbir koji je ispitanika svrstao u kategoriju anosmija (0-5), hiposmija (6-9), ili normosmija (10-12).

Gustatorno testiranje provedeno je pomoću 16 okusnih papirnatih trakica (*Taste stripes* (Burghart Messtechnik, Wedel, Njemačka)) s četiri osnovna okusa (slatko, slano, gorko, kiselo) u različitim koncentracijama. Ovom metodom procijenila se cjelokupna okusna funkcija, a uz 16 papirnatih trakica s okusom, ispitanicima su se prezentirale dvije kontrolne papirnatih trakice bez okusa. Okusne trakice su se preporučenim slijedom proizvođača postavljale na prednju trećinu dorzalne površine jezika, nakon čega su ispitanici bili instruirani da zatvore usta i lagano pomiču jezik. Nakon svake pojedinačne trakice ispitanici su definirali jesu li i koji okus su osjetili. Između pojedinačnih papirnatih trakica ispitanici su isprali usnu šupljinu običnom vodom. Rezultati testa su se interpretirali kao ukupni zbir ili pojedinačni zbir za svaki pojedini okus, pri čemu svaki točan odgovor je nosio jedan bod, a kontrolne trakice nisu ulazile u ukupni zbir. Normativna klasifikacije definira hipogeuziju (ukupni zbir manji od 9) i totalnu ageuziju (nedostatak osjeta za najveće koncentracije). Normalne vrijednosti normogeuzije za pojedinačni okus slatkog, slanog i kiselog su bile dvije prepoznate trakice, a okus gorkog niti jedna prepoznata trakica. Niže vrijednosti od prethodno opisanih ili kriva identifikacija interpretira se kao hipogeuzija, dok potpuni nedostatak svih koncentracija osjeta za jedan okus kao parcijalna ageuzija.

3.2.7. Prikupljanje uzoraka sline za Enzimski povezani imunosorbentni test (ELISA test)

Za analizu salivarnih citokina (IL-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α) i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa (8-OHdG) prikupljeno je 2 ml nestimulirane sline od svakog ispitanika. Slina je prikupljena u sterilni kontejner te je centrifugirana na 4000 rpm/20 minuta. Nakon

centrifugiranja, oprezno se odvojio supernatant i pohranio u novu sterilnu epruvetu na temperaturu od -80°C do komplementiranja uzorkovanja.

3.2.8. Analiza uzoraka imunoenzimskim ELISA testom

Prije analize uzoraka ELISA metodom, svi uzorci su izvađeni iz zamrzivača (-80°C) i stavljeni radi otapanja na sobnu temperaturu. Nakon otapanja, uzorci su strojno promiješani na vibrirajućem aparatu.

Imunoenzimatski DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Abingdon, Velika Britanija) koristio se za analizu IL-2, dok su za analizu TNF- α , IL-1 β i IL-6 korišteni kitovi Human TNF- α ELISA kit, Human IL-1 β ELISA kit i Human IL-6 ELISA kit (Immunotools GmbH, Friesoythe, Njemačka). Tijekom analize svih salivarnih citokina korištena je „sendvič“ ELISA metoda, te su poštovane upute proizvođača. Svi uzorci su testirani u monoplikatu, a dobivene vrijednosti izražene su u pg/ml. Prije početka analize učinjena su sva potrebna razrjeđenja.

Analiza TNF- α , IL-1 β i IL-6 je bila identična u svim koracima. Za analizu navedenih citokina korištena je mikropločica s 96 jažica koja se obložila hvatajućim protutijelima razrijeđenim u puferu za oblaganje, odnosno u fosfatnom puferu (100 μ l hvatajućih protutijela na 10 ml fosfatne puferirane otopine - PBS) te se inkubirala tijekom noći na sobnoj temperaturi. Sljedeći dan, nakon ispiranja mikropločice puferskom otopinom za ispiranje (PBS + 0,05% Tween20), slobodna preostala mjesta u jažici su blokirana puferom za zaustavljanje (PBS + 2% goveđi serumski albumin (BSA) + 0,05% Tween20) i inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi. Sljedeći korak, podrazumijevao je dodavanje standarda i supernatanta koji su prije analize serijski razrijeđeni u otopini za razrjeđivanje (PBS + 2% BSA + 0,05% Tween 20). Standard ili standardna bočica ovih kitova sastojala se od liofiliziranog rhTNF α , rhIL-6 ili rhIL-1 β . Po 100 μ l standarda od najviše do najniže koncentracije dodalo se u 7 jažica (100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,3 ng/ml, 3,1 ng/ml), dok se u zadnju jažicu u stupcu dodala otopina za razrjeđivanje – „blank“. U ostale jažice dodalo se 100 μ l supernatanta te se pločica inkubirala 2 h na sobnoj temperaturi. Tijekom inkubacije, antigen (citokin) iz uzorka vezao se za vezujuće

protutijelo u stijenkama jažice. Nakon inkubacije, ploča se pet puta ručno isprala s puferском otopinom za ispiranje (PBS + 0,05% Tween 20), a višak otopine uklonio se preokretanjem mikropločice. Zatim se u svaku jažicu dodalo 100 μ L otopine razrijeđenog biotiliranog detekcijskog protutijela koji se vezao za prethodno vezani citokin, te se ploča inkubirala dva sata na sobnoj temperaturi. Otopina biotiliranog detekcijskog tijela, pripravila se rekonstrukcijom s 500 μ L blokirajućeg pufera (PBS + 2% BSA + 0,05% Tween 20), a zatim se razrijedila u omjeru 1:100 s otopinom za razrjeđivanje (PBS + 2% BSA + 0,05% Tween 20). Nakon peterostrukog ispiranja, u jažice na mikropločici se dodala pripravljena otopina peroksidaze hrena (1:100 u razrjeđivaču pufera, 100 μ L po jažici) te se inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Konjugirani streptavidin se vezao na prethodno dodano biotilirano protutijelo. Ponovljeno je peterostruko ispiranje, te se u jažice dodalo 3,3',5,5' tetrametilbenzidin (TMB) supstrata (100 μ L po jažici) te se mikropločica inkubirala na sobnoj temperaturi 20 minuta do optimalne plave boje. Promjena boje i enzimatska reakcija zaustavila se dodatkom 100 μ L otopine za zaustavljanje (H_3PO_4) koja je uzrokovala prelazak plave u žutu boju. Odmah po zaustavljanju reakcije, ploča se premjestila na spektrofotometrijskih uređaj za očitavanje rezultata pri valoj duljini od 450 nm. Optička gustoća je proporcionalno povezana s koncentracijom promatranih citokina u uzorku tako da izraženija boja upućuje na više koncentracije.

Analiza IL-2 zahtijevala je pripremu mikropločice i oblaganje pločice hvatajućim protutijelima. Prvi koraci analize IL-2 su uključivali oblaganje svake pojedinačne jažice s hvatajućim protutijelima razrijeđenim u PBS-u, inkubaciju preko noći na 4 °C, dvostruko ispiranje s 400 μ L puferske otopine za ispiranje (0,05% Tween[®] 20 + PBS), te dodavanje 300 μ L pufera za blokiranje (1 % BSA + PBS). Mikropločica se potom inkubirala 60 minuta na sobnoj temperaturi te se ponovio proces ispiranja. Nakon završetka pripreme mikropločice, u sedam jažica se otpipetiralo 100 μ L razrijeđenog standarda od najviše do najniže koncentracije (100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,3 ng/ml, 3,1 ng/ml), a u zadnju jažicu dodala se otopina za razrjeđivanje. U ostale jažice dodalo se 100 μ L supernatanta te se pločica inkubirala 2 h na sobnoj temperaturi. Tijekom inkubacije, antigen (citokin) iz uzorka vezao se za vezujuće

protutijelo u stijenkama jažice. Nakon inkubacije, pločica se dva puta isprala puferom otopinom za ispiranje. Potom se dodalo 100 μ L biotiliranog detekcijskog protutijela koje se inkubiralo na sobnoj temperaturi dva sata. Nakon dvosatne inkubacije i dvostrukog ispiranja, u svaku jažicu se otpipetiralo 100 μ L razrijeđenog pigmenta konjugiranog streptavidinom. Ploča se inkubirala u tami na sobnoj temperaturi kroz 20 minuta, a potom se ponovio korak ispiranja. Predzadnji korak uključivao je dodavanje 100 μ L substrata (3,3',5,5' tetrametil-benzidin - TMB) i inkubaciju u trajanju od 20 minuta, na sobnoj temperaturi i izvan dosega svjetla. U konačnici je dodana otopina za zaustavljanje (H_3PO_4), a pločica je premještena na čitač ELISA testa. Rezultati su izmjereni spektrofotometrijski na valnoj duljini od 450 nm. Za svaku jažicu izražena je optička gustoća i s pomoću prethodno izrađenih baždarenih dijagrama je određena koncentracija citokina u svakom pojedinom uzorku.

Određivanje koncentracije salivarnog 8-OHdG-a izvršena je pomoću Elabscience® 8-OHdG (8 *Hydroxydeoxyguanosine*) ELISA Kit-a. Analiza uzoraka je izvršena prema uputi proizvođača. U analizi se koristila kompetitivna ELISA tehnika za koju je karakteristična kompeticija između tvornički imobiliziranog 8-OHdG antigena na dnu i stijenkama jažice i 8-OHdG antigena iz uzorka sline s protutijelom označenim biotinom. Svi uzorci su analizirani u monoplakatu i prije same analize, svi potrebni reagensi, otopine standarda i uzorci su se razrijedili prema uputi proizvođača. Postupak ELISA testa uključivao je sljedeće korake. Prvotno se pomoću mikrokanalne pipete u sedam jažica na mikropločici otpipetiralo 50 μ L pripremljene i razrijeđene otopine standarda od najviše prema najnižoj koncentraciji (100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,13 ng/mL, 1,55 ng/mL). U zadnju jažicu ispipetirala se otopina za razrjeđivanje standarda. U ostale jažice su se dodali razrijeđeni uzorci sline u količini od 50 μ L. Odmah nakon uzoraka, u svaku jažicu se dodalo razrijeđeno biotilirano protutijelo (50 μ L po jažici) i pločice su se inkubirale na 37 °C u trajanju od 45 minuta. Nakon inkubacije, pločice su ručno tri puta isprane s 350 μ L pripremljene otopine za ispiranje po svakom ispiranju. Zatim se u svaku jažicu dodalo se 100 μ L razrijeđenog konjugata streptavidin-peroksidaza hrena. Sadržaj mikropločice se inkubirao 45 minuta na temperaturi 37 °C, a potom nakon isteka vremena inkubacije sadržaj mikropločice se pet puta ručno isprao s 350 μ L pripremljene otopine

za ispiranje. U jažice se dodalo 90 μ L supstrata specifičnog za enzim koji se veže za streptavidin-peroksidazu i uzrokuje plavo obojenje. Ploče su se inkubirale u tami na 37 °C kroz 15 minuta (do optimalnog obojenja), a razvoj daljnjeg obojenja zaustavio se dodavanjem 50 μ L otopine za zaustavljanje u svaku pojedinačnu jažicu. Nakon zaustavljanja reakcije, pločica se odmah premjestila na spektrofotometar gdje se izmjerila optička gustoća na valnoj duljini 450. Koncentracija 8-OHdG-a u ispitivanim uzorcima izračunala se na temelju baždarnog dijagrama standarda. Vrijednost optičke gustoće kod kompetitivne metode obrnuto je proporcionalna koncentraciji tako da jače obojenje upućuje na manju koncentraciju.

3.2.9. Psihološki upitnici

3.2.9.1. Ljestvica percipiranog stresa

Ljestvica percipiranog stresa (LJPS) (Cohen i sur., 1983) (Privitak 2) je psihološki instrument koji se koristi za mjerenje osnovne tri komponente stresa odnosno mjeri u kojem su stupnju ispitanici svoj život doživljavali nekontrolabilnim, preopterećavajućim ili nepredvidljivim tijekom posljednjih mjesec dana. Upitnik ili ljestvica se sastoji od 10 čestica, a ispitanici su odgovarali na pitanja zaokruživanjem broja na Likertovoj ljestvici s četiri stupnja gdje 0 predstavlja nikad, a 4 vrlo često. Ukupni rezultat dobio se zbrajanjem pojedinačnih odgovora, pri čemu pitanja 4., 5, 7., i 8., su bila negacijska i bodovala su se obrnutim redoslijedom. Na temelju ukupnog zbira, ispitanikova razina stresa kategorizirala se kao: niska razina stresa (ukupni zbir od 0 do 13), umjerena razina stresa (ukupni zbir od 14 do 26), i visoka razina stresa (ukupni zbir od 27 do 40).

3.2.9.3. Skala depresivnosti, anksioznosti i stresa

Skala depresivnosti, anksioznosti i stresa (DASS) (Privitak 3) je psihološki upitnik koji ima trofaktorsku strukturu i procjenjuje koliko učestalo i izraženo je ispitanik u posljednjih 7 dana bio izložen negativnim emocijama depresivnosti, anksioznosti ili stresa. Ukupno skala ima 42 čestice podijeljene u tri kategorije – 14 čestica subskale anksioznosti, 14 čestica subskale

depresivnosti i 14 čestica subskale stresa. Ispitanici su odgovarali na pitanja zaokruživanjem broja na ljestvici Likertovog tipa s četiri stupnja (0 – ne odnosi se na mene, 3 – potpuno se odnosi na mene). Ukupan rezultat je sumarni zbroj za svaku pojedinačnu skalu i proporcionalan je težini simptoma. Zbroj rezultata pojedinih subskala razvrstava težinu simptoma prema indeksu ozbiljnosti procjene težine simptoma. Za depresivnost, indeks procjene težine simptoma imao je 5 kategorija (normalna razina, ukupni zbir od 0 do 9; blagi stupanj, ukupni zbir od 10 do 13; umjereni stupanj, ukupni zbir od 14 do 20; teški stupanj, ukupni zbir od 21 do 27; iznimno teški stupanj, ukupni zbir jednak ili veći od 28). Za simptome anksioznosti, indeks procjene težine simptoma imao je 5 kategorija (normalna razina, ukupni zbir od 0 do 7; blagi stupanj, ukupni zbir od 8 do 9; umjereni stupanj, ukupni zbir od 10 do 14; teški stupanj, ukupni zbir od 15 do 19; iznimno teški stupanj, ukupni zbir jednak ili veći od 20). Za simptome stresa, indeks procjene težine simptoma imao je također 5 kategorija (normalna razina, ukupni zbir od 0 do 14; blagi stupanj, ukupni zbir od 15 do 18; umjereni stupanj, ukupni zbir od 19 do 25; teški stupanj, ukupni zbir od 26 do 33; iznimno teški stupanj, ukupni zbir jednak ili veći od 34).

3.2. Statistička analiza

Veličina uzorka je određena temeljem prethodnih saznanja o koncentracijama proupalnih citokina u slini pušača i nepušača, a za izračun veličine uzorka se koristio MedCalc softver (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgija). Minimalni uzorak od 18 ispitanika je bio potreban kako bi se detektirala razlika razine IL-1 β u slini pušača čija vrijednost iznosi 2,84 pg/mL, a čija vrijednost u slini kontrolne skupine iznosi 1,43 pg/mL, uz standardnu devijaciju 1,54 u obje skupine, snagu (β) 80% i razinu značajnosti (α) 95%. Nadalje, očekivana koncentracija IL-6 u slini pušača je $1,68 \pm 0,48$ te 2,04 pg/mL u slini nepušača, uz snagu (β) od 80% i razinu značajnosti od $\alpha = 0,005$ potrebno je minimalno 26 ispitanika u svakoj skupini. Temeljem rezultata odredila se veličina pojedine skupine ispitanika [1].

Kategorički podaci su predstavljeni apolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike u kategoričkim varijablama testirane su χ^2 testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Cramerovim V testom izmjerila se veličina učinka (engl. *Effect size*) značajnih razlika, kod testiranja razlika kategoričkih varijabli. U slučaju testiranja razlika kategoričkih varijabli Fisherovim egzaktnim testom, veličinu efekta (Cramerov V) procijenilo se na temelju χ^2 testa za iste podatke. Veličina efekta interpretirana je pomoću Cohenovih kriterija: $r=0,25 - 0,3$ = mala veličina efekta, $0,3 - 0,5$ = umjerena, $0,5 - 0,7$ = velika, $>0,7$ = vrlo velika [114, 115]. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro - Wilkovim testom, a zbog razdiobe koja ne slijedi normalnu, podaci su opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Za testiranje razlika kontinuiranih varijabli između dvije nezavisne skupine koristio se Mann Whitney U test (iskazana Hodges-Lehmannova razlika medijana i 95% raspon pouzdanosti), a između tri i više nezavisnih skupina Kruskal Wallisovim testom (*post hoc test* Conover). Povezanost varijabli od interesa ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije Rho (ρ). Za tumačenje korelacije korišteni su sljedeći kriteriji $Rho=0,25-0,5$ = slaba korelacija, $0,5-0,7$ = umjerena, $0,7-0,9$ = jaka i $>0,9$ = vrlo jaka. Za višestruka testiranja koristila Bonferronijeva korekcija [116, 117]. Multiplom linearnom regresijom ispitani su prediktori olfaktorne i gustatorne disfunkcije.

Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na α (alpha) = 0,05. Za statističku analizu koristili su se statistički paket MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024) i SPSS 23 (*IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS, Ver 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.*).

Izvješće o provedenom istraživanju načinjeno je prema smjernicama za izvještavanje rezultata istraživanja u biomedicini i zdravstvu [118].

4. REZULTATI

4.1. Opća obilježja ispitanika

Presječno istraživanje sa stratificiranim uzorkom uključivalo je 90 ispitanika i provedeno je u Kliničkom bolničkom centru Rijeka i Fakultetu dentalne medicine, Sveučilišta u Rijeci. Ispitanici su bili podijeljeni u tri jednake skupine: nepušači/kontrolna skupina ($n = 30$), pušači konvencionalnih cigareta ($n = 30$) i pušači THS-a ($n = 30$). Žene su zastupljenije u odnosu na muškarce (66,7 % vs. 33,3 %), bez značajne razlike u odnosu na skupine (Tablica 1).

Tablica 1. Raspodjela ispitanika prema spolu u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				P^*
	Nepušači	Pušači konvencionalnih cigareta	Pušači THS-a	Ukupno	
Spol					
Muškarci	10 (33,3)	10 (33,3)	10 (33,3)	30 (33,3)	> 0,99
Žene	20 (66,7)	20 (66,7)	20 (66,7)	60 (66,7)	

* χ^2 test (df = 2; $\chi^2 = 1,0$)

THS – Tobacco Heating System

Medijan starosne dobi uključenih ispitanika je 32 godine (interkvartilnog raspona od 25 do 42 godine) u rasponu od 20 do najviše 55 godina (Tablica 2).

Tablica 2. Razlike u dobi ispitanika u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Medijan (interkvartilni raspon)			P^*
	Nepušači ($n = 30$)	Pušači konvencionalnih cigareta ($n = 30$)	Pušači THS-a ($n = 30$)	
Dob (godine)	33 (25 – 44)	31 (24 – 42)	33 (25 – 42)	0,99

*Kruskal Wallisov test

THS – Tobacco Heating System

Ispitanici u pojedinačnim skupinama uspoređivani su obzirom na stupanj obrazovanja, te nije uočena statistički značajna razlika. Najveći udio ispitanika imao je srednjoškolsko obrazovanje (44 ispitanika, 48,9 %), ili visoku stručnu spremu (36 ispitanika, 40 %) (Tablica 3).

Tablica 3. Razina obrazovanja ispitanika u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				<i>P</i> *
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	
Razina obrazovanja					
Diplomski studij (mag.)	17 (57)	8 (27)	11 (37)	36 (40)	
Prijediplomski studij (bacc.)	1 (3)	3 (10)	6 (20)	10 (11)	0,06
Srednja stručna sprema	12 (40)	19 (63)	13 (43)	44 (49)	

* χ^2 test (df = 4; $\chi^2 = 9,26$)

THS – Tobacco Heating System

4.2. Karakteristike skupine pušača

Medijan duljine pušenja za obje skupine pušača je 8,5 godina (interkvartilnog raspona od 5 do 15 godina) u rasponu od jedne do 30 godina. Značajno duže puše ispitanici iz skupine pušača konvencionalnih cigareta (Mann Whitney U test, $P = 0,02$), u odnosu na skupinu pušača THS-a. Medijan dnevne konzumacije cigareta u pušačkim skupinama je 12 (interkvartilni raspon od 8 do 20), u rasponu od dvije do 20 popušanih cigareta na dan, bez značajne razlike u odnosu na skupine (Tablica 4).

Tablica 4. Razlike u pušačkom stažu i dnevnoj konzumaciji cigareta u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika*	95% raspon pouzdanosti	<i>P</i> [†]
	Pušači konvencionalnih cigareta	Pušači THS-a			
Pušački staž (godine)	10 (6 – 15)	6 (5 – 10)	-3	-6 do 0	0,02
Broj cigareta/ dnevno	12 (9 – 20)	12 (8 – 15)	0	-5 do 2	0,72

*Hodges-Lehmannova razlika medijana; [†]Mann Whitney U test

THS – *Tobacco Heating System*

Kada je kategoriziran intenzitet i pušački staž u četiri podjednake kategorije, pokazalo se da značajno više ispitanika iz skupine THS-a uz umjerenu snagu efekta ima pušački staž do 5 godina, dok ispitanika iz skupine konvencionalnih cigareta ima značajno više s pušačkim stažem preko 15 godina (χ^2 test, $P = 0,01$; $V = 0,419$). Dnevno, 20 (33 %) ispitanika popuši od 11 do 15 cigareta, a 14 (23 %) ispitanika preko 15 cigareta, bez značajne razlike u odnosu na skupine (Tablica 5).

Tablica 5. Ispitanici prema kategoriziranom pušačkom stažu i broju popušenih cigareta na dan u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika			
	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 60)	<i>P</i> *
Pušački staž				
Do 5 godina	5 (17)	14 (47)	19 (32)	0,01[†]
6 – 10 godina	11 (37)	9 (30)	20 (33)	
11 – 15 godina	8 (27)	7 (23)	15 (25)	
preko 15 godina	6 (20)	0	6 (10)	
Broj cigareta dnevno				
Do 5 cigareta	3 (10)	6 (20)	9 (15)	0,61
6 – 10	10 (33)	7 (23)	17 (28)	
11 – 15	9 (30)	11 (37)	20 (33)	
preko 15 cigareta	8 (27)	6 (20)	14 (23)	

** χ^2 test; [†](df = 3; χ^2 = 10,53; Cramerov V = 0,419)

THS – *Tobacco Heating System*

Medijan Brinkman indeksa (broj dnevno popušenih cigareta pomnožen s brojem godina pušenja) za sve ispitanike iznosio je 78 (interkvartilnog raspona od 44 do 199) u rasponu od 5 do najviše 600, bez značajne razlike u odnosu na skupine (Tablica 6).

Tablica 6. Razlike u Brinkman indeksu u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika*	95% raspon pouzdanosti	<i>P</i> [†]
	Pušači konvencionalnih cigareta	Pušači THS-a			
Brinkman indeks	112,5 (50 – 240)	73,5 (30 – 100)	-35	-100 do 0	0,06

*Hodges-Lehmannova razlika medijana; [†]Mann Whitney U test

THS – *Tobacco Heating System*

S obzirom na vrijednosti Brinkman indeksa, nizak intenzitet pušenja bilježi se kod 45 (75 %) ispitanika, umjereni kod 13 (22 %) ispitanika, dok se visok intenzitet pušenja bilježi kod dva (3 %) ispitanika, bez značajne razlike u raspodjeli u odnosu na promatrane skupine (Tablica 7).

Tablica 7. Kategorizacija Brinkman indeksa između skupina pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika			<i>P</i> *
	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 60)	
Brinkman indeks				
Nizak intenzitet pušenja (1 – 199)	20 (67)	25 (83)	45 (75)	
Umjereni intenzitet pušenja (200 – 599)	8 (27)	5 (17)	13 (22)	0,20
Visok intenzitet pušenja (600 i više)	2 (7)	0	2 (3)	

*Fisherov egzaktni test

THS – *Tobacco Heating System*

4.3. Prevalencija samoreportiranih simptoma povezanih s pušenjem

Nitko od ispitanika nema komorbiditeta, ne uzima kroničnu terapiju niti je upotrebljavao antibiotike ili antiseptike unazad 30 dana. Samoreportirane promjene i simptomi zabilježeni su kod 31 (34 %) ispitanika, a značajno manje ispitanika uz umjerenu snagu efekta, njih 5 (17 %) sa samoreportiranim promjenama su nepušači (kontrolna skupina) (χ^2 test, $P = 0,04$; $V = 0,265$). Samoreportiranu suhoću usta navodi 21 (68 %) ispitanik, neugodni zadah ili halitozu 6 (19 %), a vidljive promjene oralne sluznice prisutne su kod tri (10 %) ispitanika (Tablica 8).

Tablica 8. Ispitanici prema samoreportiranim simptomima i promjenama u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				<i>P</i> *
	Nepušači	Pušači konvencionalnih cigareta	Pušači THS-a	Ukupno	
Samoreportirane promjene (n = 90)					
Ne	25 (83)	17 (57)	17 (57)	59 (66)	0,04
Da	5 (17)	13 (43)	13 (43)	31 (34)	
Samoreportirana suhoća usta (n = 31)					
Ne	0	4 (31)	6 (46)	10 (32)	0,21 [†]
Da	5 (100)	9 (69)	7 (54)	21 (68)	
Samoreportirana halitoza (n = 31)					
Ne	5 (100)	8 (62)	12 (92)	25 (81)	0,13 [†]
Da	0	5 (38)	1 (8)	6 (19)	
Samoreportirane promjene oralne sluznice (n = 31)					
Ne	5 (100)	11 (85)	12 (92)	28 (90)	> 0,99 [†]
Da	0 (0)	2 (15)	1 (8)	3 (10)	

* χ^2 test(df = 2; χ^2 = 6,299; Cramerov V = 0,265); [†]Fisherov egzaktni test

THS – *Tobacco Heating System*

Samoreportiranu promjenu osjeta okusa navodi 8 (26 %) ispitanika, a statistički je značajno više ispitanika iz skupine THS-a uz veliku snagu efekta (Fisherov egzaktni test, P = 0,02; $V=0,548$). Samoreportiranu promjenu mirisa ima jedan (3 %) ispitanik, i to iz skupine pušača konvencionalnih cigareta. Po 11 (35 %) ispitanika navodi trajanje samoreportiranih simptoma do 6 mjeseci ili više od 12 mjeseci, a 9 (29 %) navodi trajanje do 12 mjeseci (Tablica 9).

Tablica 9. Ispitanici prema samoreportiranim promjenama okusa, mirisa i trajanju samoreportiranih simptoma u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				
	Nepušači (n = 5)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 13)	Pušači THS-a (n = 13)	Ukupno (n = 31)	<i>P</i> *
Samoreportirana promjena okusa					
Ne	5 (100)	12 (92)	6 (46)	23 (74)	0,02*
Da	0	1 (8)	7 (54)	8 (26)	
Samoreportirana promjena mirisa					
Ne	5 (100)	12 (92)	13 (100)	30 (97)	> 0,99
Da	0	1 (8)	0	1 (3)	
Trajanje samoreportiranih simptoma					
Do 6 mjeseci	1 (20)	6 (46)	4 (31)	11 (35)	0,44
do 12 mjeseci	1 (20)	2 (15)	6 (46)	9 (29)	
više od 12 mjeseci	3 (60)	5 (38)	3 (23)	11 (35)	

*Fisherov egzaktni test ([‡]Cramerov V = 0,548)

THS – Tobacco Heating System

Samoreportirane simptome pečenja ili žarenja osjeća 6 (7 %) ispitanika, i to značajnije više uz umjerenu snagu efekta ispitanici iz skupine THS-a, u odnosu na skupinu pušača konvencionalnih cigareta i skupinu nepušača (Fisherov egzaktni test, *P* = 0,04; V = 0,3) (Tablica 10).

Tablica 10. Raspodjela ispitanika prema samoreportiranom osjećaju pečenja i žarenja u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				<i>P</i> *
	Nepušači	Pušači konvencionalnih cigareta	Pušači THS-a	Ukupno	
Pečenje					
Ne	30 (100)	29 (97)	25 (83)	84 (93)	0,04
Da	0	1 (3)	5 (17)	6 (7)	

*Fisherov egzaktni test (Cramerov V = 0,3)

THS – Tobacco Heating System

Većina ispitanika s osjećajem pečenja ($n = 6$) osjeća blago i povremeno pečenje, s obzirom na lokalizaciju po dva ispitanika navodi pečenje vrha jezika ili cijelog jezika. Po jedan ispitanik navodi da ima pečenje na podražaj, spontano pečenje, pogoršanje simptoma pri konzumaciji hrane/pića i pojačavanje intenziteta simptoma prema večeri. Tri ispitanika navode pečenje iste jačine, a dva ispitanika navode da im hrana/piće olakšava tegobe (Tablica 11).

Tablica 11. Raspodjela ispitanika prema intenzitetu, frekvenciji i lokalizaciji pečenja, te povezanost pečenja s podražajem, hranom ili pićem u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika			<i>P</i> *
	Pušači konvencionalnih cigareta ($n = 1$)	Pušači THS-a ($n = 5$)	Ukupno ($n = 6$)	
Intenzitet pečenja				
Blago pečenje	1/1	5/5	6/6	-
Frekvencija pečenja				
Povremeno	1/1	5/5	6/6	-
Lokalizacija pečenja				
Vrh jezika	1/1	1/5	2/6	> 0,99
Cijeli jezik	0	2/5	2/6	
Obraz	0	1/5	1/6	
Tvrdo nepce	0	1/5	1/6	
Pečenje na podražaj	0	1/5	1/6	> 0,99
Pečenje spontano	1/1	0	1/6	0,17
Pečenja olakšava hrana/piće	1/1	1/5	2/6	0,33
Pečenje pogoršanje na hranu/piće	0	1/5	1/6	> 0,99
Pečenje ista jačina	0	3/5	3/6	> 0,99
Pečenje pojačava prema večeri	0	1/5	1/6	> 0,99

*Fisherov egzaktni test

THS – Tobacco Heating System

Medijan intenziteta pečenja u THS pušača (VAS skala) iznosi 25 (interkvartilnog raspona od 16 do 32) u rasponu od 5 do najviše 45 (Tablica 12).

Tablica 12. Intenzitet pečenja u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Medijan (interkvartilni raspon)	
	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 1)	Pušači THS-a (n = 5)
Intenzitet pečenja (VAS skala)	45	25 (16 – 26)

THS – *Tobacco Heating System*

Samoreportiranu promjenu osjeta okusa navodi ukupno 8 (26 %) ispitanika. Promjena osjeta okusa prisutna je samo u skupinama pušača konvencionalnih cigareta ili THS-a, bez značajnih razlika u odnosu na skupine (Tablica 13). Samoreportiranu promjenu u percepciji gorkog osjeta navodi 5 (8%) ispitanika, samoreportiranu promjenu u percepciji slatkog osjeta navodi 3 (5%) ispitanika, a samoreportiranu promjenu u percepciji slanog okusa navodi 1 (2 %) ispitanik.

Tablica 13. Ispitanici prema samoreportiranoj hipogeuziji u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika			<i>P</i> *
	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 60)	
Hipogeuzija				
Slano	1 (3)	0	1 (2)	> 0,99
Slatko	0	3 (10)	3 (5)	0,24
Gorko	1 (3)	4 (13)	5 (8)	0,35

*Fisherov egzaktni test

THS – *Tobacco Heating System*

Prije korištenja THS-a, 27 (90 %) ispitanika su bili pušači konvencionalnih cigareta. Nakon prelaska na THS proizvode, 19 (63 %) ispitanika reportira prisutnost subjektivnih simptoma. Kod svih ispitanika koji su naveli samoreportirane simptome i promjene zabilježeno je poboljšanje u odnosu na period prije konzumacije THS-a, u smislu poboljšanja osjeta okusa (12

ispitanika, 40 %), smanjenja intenziteta neugodnog zadaha (17 ispitanika, 57 %) i rjeđeg kašlja (19 ispitanika, 63 %) (Tablica 14).

Tablica 14. Karakteristike ispitanika iz skupine THS-a i samoreportirani simptomi nakon početka konzumacije THS-a (n = 30)

	Broj (%) ispitanika
Pušenje prije THS-a	
Nepušač	2 (7)
Konvencionalne cigarete	27 (90)
Druge vrste	1 (3)
Nakon prelaska na THS	
Nema promjena	11 (37)
Prisutna promjena	19 (63)
Nakon prelaska na THS - simptomi	
Nema promjene	11 (37)
Poboljšanje	19 (63)
Nakon prelaska na THS - okus	
Nema promjene	18 (60)
Poboljšanje	12 (40)
Nakon prelaska na THS - halitoza	
Nema promjene	13 (43)
Smanjenje intenziteta	17 (57)
Nakon prelaska na THS - kašalj	
Nema promjene	11 (37)
Rjeđi kašalj	19 (63)

THS – Tobacco Heating System

4.4. Utjecaj duhanskih preparata na morfološke promjene oralne sluznice

Morfološke promjene oralne sluznice su zabilježene kod 32 (36 %) ispitanika. Promjene su značajno više prisutne u skupini pušača THS-a i konvencionalnih cigareta, u odnosu na skupinu nepušača uz umjerenu snagu efekta (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$; $V = 0,477$) (Tablica 15).

Tablica 15. Morfološke promjene oralne sluznice u skupini nepušača, skupini pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				<i>P</i> *
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	
Promjene oralne sluznice					
Nema promjena	29 (97)	15 (50)	14 (47)	58 (64)	< 0,001
Prisutne promjene	1 (3)	15 (50)	16 (53)	32 (36)	

*Fisherov egzaktni test (Cramerov V = 0,477)

THS – *Tobacco Heating System*

Nije pronađena značajna razlika u lokalizaciji morfoloških promjena oralne sluznice. Najučestalija lokalizacija promjena oralne sluznice je jezik, kod 12 (38 %) ispitanika i obraz kod 8 (25 %) ispitanika. Druge lokalizacije zastupljene su u manjem postotku (Tablica 16).

Tablica 16. Lokalizacija morfoloških promjena oralne sluznice u skupini nepušača, skupini pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				P*
	Nepušači (n =1)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 15)	Pušači THS-a (n = 16)	Ukupno (n = 32)	
Lokalizacija promjene					
Jezik	1/1	5 (33)	6 (38)	12 (38)	> 0,99
UŠ	0	3 (20)	2 (13)	5 (16)	
Nepce	0	1 (7)	0	1 (3)	
Obraz	0	4 (26)	4 (25)	8 (25)	
Jezik i obraz	0	0	1 (6)	1 (3)	
Gingiva	0	1 (7)	1 (6)	2 (6)	
Jezik, usni kut	0	1 (7)	2 (12)	3 (9)	

*Fisherov egzaktni test

THS – *Tobacco Heating System*

Najčešća zabilježena morfološka promjena je erozija ili ulkus (7 ispitanika, 22 %), a slijede atrofija ili eritem (5 ispitanika, 16 %) i morsikacija (5 ispitanika, 16 %). Značajna razlika uočena

je u prisutnosti geografskog jezika (4 ispitanika, 13 %), pri čemu je najveća učestalost u skupini pušača konvencionalnih cigareta (Fisherov egzaktni test, $P = 0,01$) (Tablica 17).

Tablica 17. Učestalost i razlika morfoloških promjena oralne sluznice u skupini nepušača, skupini pušača konvencionalnih cigareta i skupini pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				<i>P</i> *
	Nepušači (n = 1)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 15)	Pušači THS-a (n = 16)	Ukupno (n = 32)	
Morfološke promjene oralne sluznice					
Pušačka melanoza	0	1 (7)	1 (6)	2 (6)	> 0,99
Fisuriran jezik	0	0	1 (6)	1 (3)	> 0,99
Atrofija/ eritem	0	2 (13)	3 (19)	5 (16)	> 0,99
Eksfolijativni stomatitis	0	2 (13)	2 (13)	4 (13)	> 0,99
Protetski stomatitis - drugi stupanj po Newtonu	0	2 (13)	0	2 (6)	0,27
Erozija, ulkus	0	2 (13)	5 (31)	7 (22)	0,53
Morsikacija	0	3 (20)	2 (13)	5 (16)	0,71
Obložen jezik	0	2 (13)	2 (13)	4 (13)	> 0,99
Dlakav jezik	0	0	2 (13)	2 (6)	0,52
Geografski jezik	1/1	3 (20)	0	4 (13)	0,01‡
Angularni heilitis + geografski jezik	0	1 (7)	2 (13)	3 (9)	> 0,99

*Fisherov egzaktni test (Cramerov V = 0,561)

THS – Tobacco Heating System

4.5. Utjecaj duhanskih preparata na količinu sline

Količina nestimulirane sline značajno je viša u skupini nepušača (kontrolna skupina) u odnosu na skupine pušača, dok između skupina pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a nema značajnih razlika (Kruskal Wallisov test, $P < 0,001$) (Tablica 18).

Tablica 18. Količina nestimulirane sline u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Medijan (interkvartilni raspon)			P^*
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	
Količina nestimulirane sline (ml/5 min)	2,2 (2,0 – 2,6)	1,1 (0,6 – 1,6)	1,6 (0,8 – 2,2)	<0,001[†]

*Kruskal Wallisov test (*Post hoc test* Conover)

[†]na razini $P < 0,05$ značajne su razlike (kontrola) vs. (konvencionalne cigarete, THS)

THS – *Tobacco Heating System*

Smanjena količina nestimulirane sline ili hiposalivacija (vrijednosti manje od 1 ml/5min) pronađene su kod 25 (28 %) ispitanika. Značajno najveći postotak hiposalivacije uz umjerenu snagu efekta prisutan je u skupini pušača konvencionalnih cigareta, a značajno najmanji u skupini nepušača (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$; $V = 0,405$) (Tablica 19).

Tablica 19. Udio hiposalivacije između skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				P^*
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	
Hiposalivacija manje od 1 ml/5min					
Ne	29 (97)	16 (53)	20 (67)	65 (72)	<0,001
Da	1 (3)	14 (47)	10 (33)	25 (28)	

*Fisherov egzaktni test (Cramerov $V = 0,405$)

THS – *Tobacco Heating System*

4.6. Identifikacija gljiva roda *Candida*

Analizom rezultata pokazalo se da je gljiva roda *Candida* uspješno izolirana u 8 (9 %) ispitanika, od kojih je 6 ispitanika iz skupine pušača konvencionalnih cigareta i po jedan ispitanik iz skupine pušača THS-a i skupine nepušača. Najčešća izolirana vrsta je *Candida albicans*. Od ukupnog broja uspješno izoliranih uzoraka, kolonije *Candida albicans* izolirane su kod svakog ispitanika, a kolonije *Candida glabrata* kod tri ispitanika (3%). Niti u jednom uzorku nisu pronađene kolonije *Candida krusei*, *Candida tropicalis* i *Candida* druge vrste. Značajno više ispitanika iz skupine s konvencionalnim cigaretama ima izoliranu *Candida albicans* (Fisherov egzaktni test, $P = 0,04$) (Tablica 20).

Tablica 20. Rezultati mikološkog obriska u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				
Mikološki obrisak	Nepušači (n =30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	<i>P</i> *
<i>Candida albicans</i>					
Nema kolonija	29 (97)	24 (80)	29 (97)	82 (91)	0,04‡
Prisutne kolonije	1 (3)	6 (20)	1 (3)	8 (9)	
<i>Candida krusei</i>					
Nema kolonija	30 (100)	30 (100)	30 (100)	30 (100)	-
<i>Candida tropicalis</i>					
Nema kolonija	30 (100)	30 (100)	30 (100)	30 (100)	-
<i>Candida glabrata</i>					
Nema kolonija	29 (97)	28 (93)	30 (100)	87 (97)	0,77
Prisutne kolonije	1 (3)	2 (7)	0	3 (3)	
Ostale vrste					
Nema kolonija	30 (100)	30 (100)	30 (100)	30 (100)	-

*Fisherov egzaktni test ([‡]Cramerov $V = 0,276$)

THS – Tobacco Heating System

Broj kolonija *Candida albicans* i *Candida glabrata* prikazane su u Tablici 21.

Tablica 21. Broj kolonija *Candida albicans* i *Candida glabrata* u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Medijan (interkvartilni raspon)		
	Nepušači	Pušači konvencionalnih cigareta	Pušači THS-a
Broj kolonija <i>Candida albicans</i>	13 (n = 1)	49 (37 – 56) (n = 6)	69 (n = 1)
Broj kolonija <i>Candida glabrata</i>	5 (n = 1)	30 ili 56 (n = 2)	-

THS – Tobacco Heating System

S obzirom na klasifikaciju prema Olsenu, bez kolonija su 82 (91 %) ispitanika, a kod pet (6 %) ispitanika broj kolonija je između 25 i 100 (Tablica 22).

Tablica 22. Klasifikacija prema Olsenu u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				<i>P</i> *
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	
Klasifikacija prema Olsenu					
Bez kolonije	29 (97)	24 (80)	29 (97)	82 (91)	
10 – 24 kolonija	1 (3)	1 (3)	0	2 (2)	
25 – 100 kolonija	0	4 (13)	1 (3)	5 (6)	0,07
više od 100 kolonija i konfluentni rast	0	1 (3)	0	1 (1)	

*Fisherov egzaktni test

THS – Tobacco Heating System

4.7. Usporedba prisutnosti halitoze između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

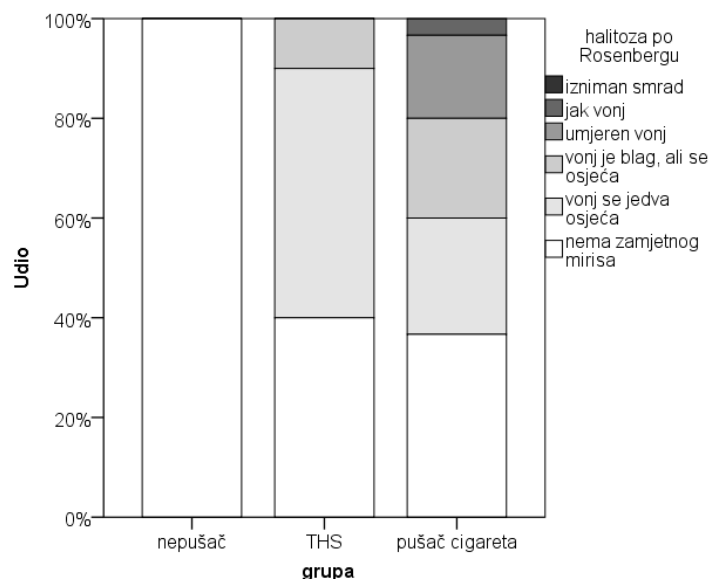
Organoleptičkom metodom i klasifikacijom neugodnog zadaha po Rosenbergu utvrđena je statistički značajna razlika uz veliku snagu efekta (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$; $V = 0,591$). U skupini pušača THS-a prisutnost neugodnog zadaha zabilježena je u 18 (60 %) ispitanika, u skupini pušača konvencionalnih cigareta u 19 (63 %) ispitanika, dok u skupini nepušača navedena promjena nije zabilježena niti kod jednog ispitanika. S obzirom na klasifikaciju halitoze prema Rosenbergu, blag, umjeren i jak vonj je značajno više prisutan kod ispitanika iz skupine pušača konvencionalnih cigareta (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$) (Tablica 23) (Slika 1).

Tablica 23. Prisutnost halitoze, te podjela halitoze prema Rosenbergu u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				<i>P</i> *
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	
Halitoza					
Ne	29 (100)	11 (37)	12 (40)	52 (58)	<0,001[‡]
Da	0	19 (63)	18 (60)	38 (42)	
Halitoza prema Rosenbergu					
Nema zamjetnog mirisa	30 (100)	11 (37)	12 (40)	53 (59)	<0,001[§]
Vonj se jedva osjeća	0	7 (23)	15 (50)	22 (24)	
Vonj je blag, ali se osjeća	0	6 (20)	3 (10)	9 (10)	
Umjeren vonj	0	5 (17)	0	5 (6)	
Jak vonj	0	1 (3)	0	1 (1)	

*Fisherov egzaktni test([‡]Cramerov $V = 0,591$; [§]Cramerov $V = 0,507$)

THS – Tobacco Heating System



Slika 1. Usporedba intenziteta halitoze po Rosenbergu između nepušača, THS pušača i pušača konvencionalnih cigareta

4.8. Usporedba olfaktorne i gustatorne funkcije između skupina pušača konvencionalnih cigareta, pušača THS-a i nepušača

Analizom rezultata ustanovljeno je da 11 (37 %) pušača konvencionalnih cigareta, 6 (20 %) pušača THS-a i jedan (3 %) nepušač ima smanjenju mirisnu funkciju ili hiposmiju. Niti jedan ispitanik nije imao anosmiju. Hiposmiju imaju značajno više ispitanici iz skupine pušača konvencionalnih cigareta (Fisherov egzaktni test, $P = 0,005$).

Prevalencija hipogeuzije uočena je kod 14 (47 %) pušača THS-a i 15 (50 %) pušača konvencionalnih cigareta te tri (10 %) nepušača. Hipogeuzija je značajnije više prisutna kod pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a (Fisherov egzaktni test, $P = 0,01$). Ageuziju za pojedinačni okus slanog ima ukupno 10 (11 %) ispitanika, značajno više ispitanika iz skupine pušača konvencionalnih cigareta (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$). U ostalim vrijednostima nema značajnih razlika u odnosu na skupine (Tablica 24).

Tablica 24. Mirisi i okusi u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

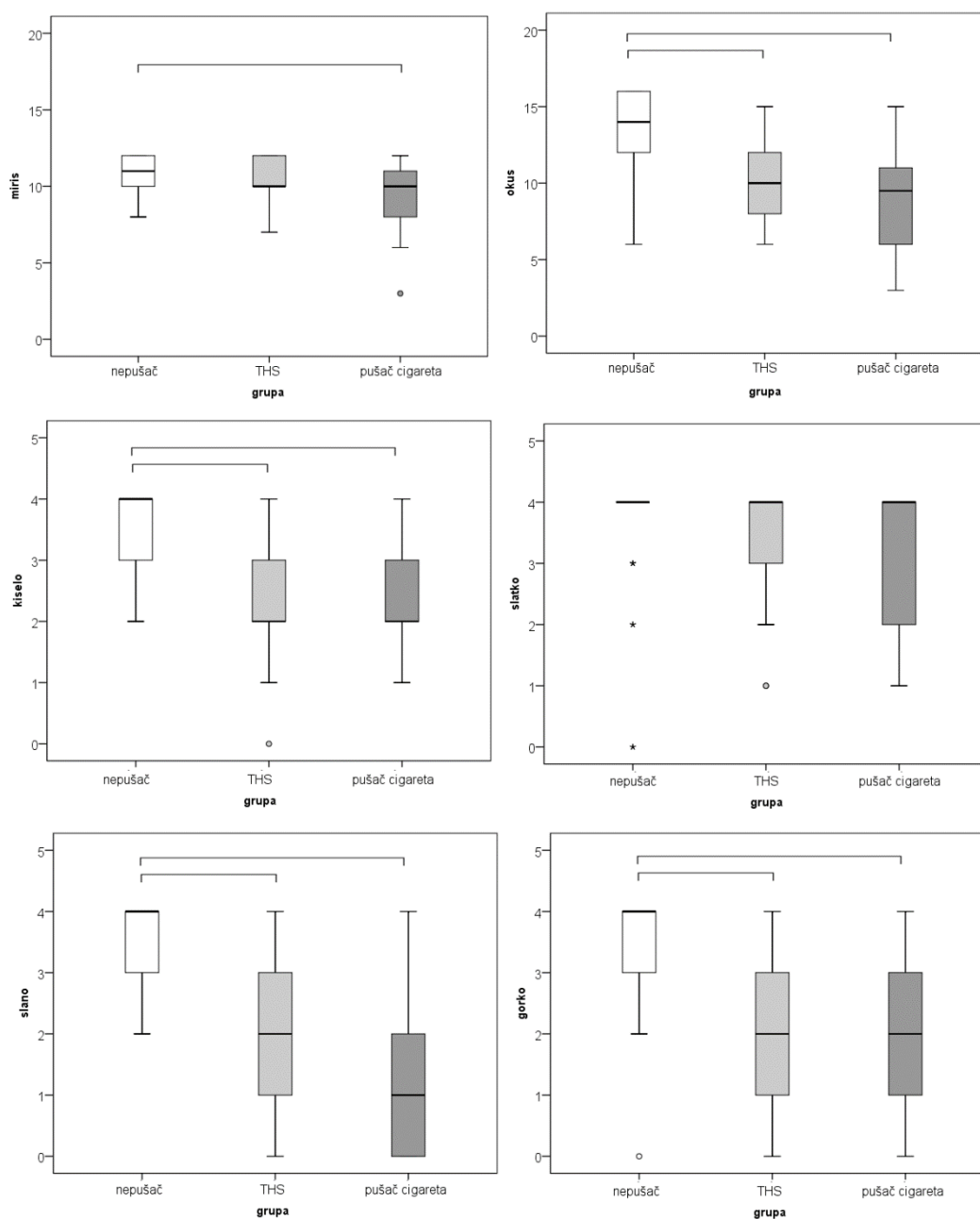
	Broj (%) ispitanika				
	Nepušači (n =30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	P*
Miris					
Normonosmija	29 (97)	19 (63)	24 (80)	72 (80)	0,005*
Hiposmija	1 (3)	11 (37)	6 (20)	18 (20)	
Okus					
Normogeusija	27 (90)	15 (50)	16 (53)	58 (64)	0,002§
Hipogeusija	3 (10)	15 (50)	14 (47)	32 (36)	
Kiselo					
Normalna funkcija	30 (100)	26 (87)	27 (90)	83 (92)	0,12
Smanjena funkcija	0	4 (13)	2 (7)	6 (7)	
Ageuzija za pojedinačni okus	0	0	1 (3)	1 (1)	
Slatko					
Normalna funkcija	28 (93)	27 (90)	28 (93)	83 (92)	0,20
Smanjena funkcija	0	3 (10)	2 (7)	5 (6)	
Ageuzija za pojedinačni okus	2 (7)	0	0	2 (2)	
Slano					
Normalna funkcija	30 (100)	13 (43)	19 (63)	62 (69)	<0,001
Smanjena funkcija	0	8 (27)	10 (33)	18 (20)	
Ageuzija za pojedinačni okus	0	9 (30)	1 (3)	10 (11)	
Gorko					
Normalna funkcija	29 (97)	27 (90)	29 (97)	85 (94)	0,69
Kriva identifikacija	0	1 (3)	0	1 (1)	
Ageuzija za pojedinačni okus	1 (3)	2 (7)	1 (3)	4 (4)	

*Fisherov egzakti test ([‡]Cramerov V = 0,340; [§]Cramerov V = 0,309; ^{||}Cramerov V = 0,416)

THS – Tobacco Heating System

Pušači konvencionalnih cigareta imaju smanjenu olfaktornu funkciju u usporedbi s nepušačima (Kruskal Wallis test, *P* = 0,001) dok se pušači THS-a značajno ne razlikuju niti od pušača konvencionalnih cigareta niti od nepušača.

Sveukupna gustatorna, kao i identifikacija slanog, gorkog i kiselog okusa je niža u skupinama pušača u usporedbi s nepušačima (Kruskal Wallis test, $P < 0,001$). Identifikacija slatkog okusa bila je visoka u sve tri skupine i nije pokazala razlike između skupina (Slika 2).



Slika 2. Usporedba mirisne i okusne funkcije između nepušača, THS pušača i pušača konvencionalnih cigareta. Horizontalne linije povezuju skupine koje se značajno razlikuju.

U cijelom uzorku, BI je značajno negativno i linearno korelirao s okusom ($Rho = -0.548$; $P < 0,001$) i mirisom ($Rho = -0,317$; $P = 0,002$), a korelacija je bila slaba za miris i umjerena za okus. Porastom BI smanjuje se olfaktorna i gustatorna funkcija. Analizom pojedinačnih okusa utvrdilo se da je BI najviše povezan sa slanim okusom ($Rho = -0,585$), nakon čega je slijedio okus gorkog ($Rho = -0,448$) i kiseloga ($Rho = 0,482$; $P < 0,001$). Za okus slatkog korelacijski koeficijent nije dosegnuo 0,25 da bi se interpretirao kao značajna povezanost. Dob nije korelirala s mirisnom i okusnom funkcijom niti s BI (Tablica 25).

Spol je utjecao na okusnu, ali ne i na mirisnu funkciju. Veći udio ispitanika s hipogeuzijom su muškarci (19/29, 66% vs. 13/61, 21%; $P < 0,001$). Rezultati sugeriraju da muškarci u usporedbi s ženama slabije identificiraju okusne podražaje (Medijan 8 vs 12; $P = 0,010$), što je osobito vidljivo u percepciji slatkog (3 vs 4; $P < 0,001$) i gorkog okusu (2 vs 3; $P = 0,025$). BI nije bio povezan sa spolom.

Tablica 25. Povezanost Brinkman indeksa, mirisne i okusne disfunkcije procijenjena Spearmanovom korelacijom

Spearmanov koeficijent korelacije Rho (<i>P</i> vrijednost)									
		Brinkman indeks		Okus sumarni					
		pušenja	Miris	zbroj	Kiselo	Slatko	Slano	Gorko	Dob
Brinkman indeks	R	1	-0,317	-0,548	-0,482	-0,231	-0,585	-0,448	0,231
	P	.	0,002	<0,001	<0,001	0,028	<0,001	<0,001	0,029
Miris	R	-0,317	1	0,297	0,331	0,124	0,316	0,312	0,151
	P	0,002	.	0,004	0,001	0,244	0,002	0,003	0,155
Okus zbroj	R	-0,548	0,297	1	0,717	0,656	0,781	0,750	-0,165
	P	<0,001	0,004	.	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,119
Kiselo	R	-0,482	0,331	0,717	1	0,409	0,519	0,421	-0,194
	P	<0,001	0,001	<0,001	.	<0,001	<0,001	<0,001	0,066
Slatko	R	-0,231	0,124	0,656	0,409	1	0,349	0,467	-0,225
	P	0,028	0,244	<0,001	<0,001	.	0,001	<0,001	0,033
Slano	R	-0,585	0,316	0,781	0,519	0,349	1	0,486	-0,177
	P	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,001	.	<0,001	0,096
Gorko	R	-0,448	0,312	0,750	0,421	0,467	0,486	1	-0,069
	P	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	.	0,515
Dob	R	0,231	0,151	-0,165	-0,194	-0,225	-0,177	-0,069	1
	P	0,029	0,155	0,119	0,066	0,033	0,096	0,515	.

Modeli multiple linearne regresije su korišteni za ispitivanje čimbenika povezanih s olfaktornom i gustatornom disfunkcijom. Neovisne varijable razmatrane u analizi bile su spol, dob, vrsta duhanskog proizvoda i BI. Jedini prediktor olfaktorne disfunkcije bio je BI ($P = 0,001$) kada se kontrolirao utjecaj tipa duhanskog proizvoda, dobi i spola, i objašnjavao je 11% varijance ($P = 0,024$, $R^2 = 0,123$). Povećanje BI-a za 1 skalarnu točku smanjilo je rezultat olfaktorne funkcije za 0,004 skalarna boda (95% CI: -0,007 – -0,002). Nije uočena interakcija između prediktora. Za disfunkciju okusa, BI je najznačajniji prediktor ($P = 0,001$), a slijedili su ga spol ($P = 0,016$) i vrsta duhanskog proizvoda (konvencionalne cigarete) ($P = 0,039$) koju su samostalno objašnjavali 11%, 5% i 4% varijance ($P < 0,001$, $R^2 = 0,259$). Povećanje BI za 1 skalarnu točku smanjilo je rezultat funkcije okusa za 0,009 skalarnih bodova (95% CI: -0,015 – -0,005), ženski spol poboljšao je funkciju okusa za 1,8 skalarnih bodova (95% CI: 0,3–3,2) dok je upotreba THS sustava smanjila cjelokupnu okusnu funkciju za 1,5 skalarnih bodova (95% CI: -2,8–0,1). Nije otkrivena interakcija prediktora (Tablica 26).

Tablica 26. Modeli multiple linearne regresije za predikciju olfaktorne i gustatorne disfunkcije

	Nestandardizirani koeficijent			Standardizirani koeficijenti	<i>P</i>	Korelacije		
	B	Std. greška	95% CI			Nultog reda	Parcijalna	Semiparcijalna
Olfaktorna disfunkcija*								
(konstanta)	10.4	0.9						
Dob	0	0	-0,0-0.1	0.2	0.101	0.061	0.177	0.169
BI	0	0	-0,0-(-0.0)	-0.4	0.001	-0.273	-0.338	-0.336
Spol (1=M; 2=Ž)	-0.4	0.4	-1,1-0.3	-0.1	0.253	-0.068	-0.124	-0.117
THS (0=ne; 1=da)	0.2	0.4	-0,5-0.9	0.1	0.547	0.048	0.066	0.061
Gustatorna disfunkcija**								
(konstanta)	9	1.7						
Dob	0	0	-0.1-0.1	0	0.877	-0.155	0.017	0.014
BI	0	0	0.0-(-0.0)	-0.4	0.001	-0.413	-0.361	-0.333
Spol (1=M; 2=Ž)	1.8	0.7	0.3-3.2	0.2	0.016	0.304	0.259	0.23
THS (0=ne; 1=da)	-1.4	0.7	-2.8-0.1	-0.2	0.038	-0.197	-0.223	-0.197

*R=0.350; R²= 0.123; Prilagođeni R²=0.082; p=0.024

**R=0.509; R²= 0.259; Prilagođeni R²=0.224; p<0.001

THS – *Tobacco Heating System*

4.9. Usporedba koncentracija salivarnih biomarkera upale (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2) i salivarnih biomarkera oksidativnog stresa (8-OHdG) između skupina pušača konvencionalnih cigareta, pušača THS-a i nepušača

Analizom rezultata nije uočena statistički značajna razlika u razinama citokina IL-1 β , IL-2, IL-6 i salivarnog TNF- α u odnosu na skupine.

Salivarni biomarker oksidativnog stresa (8-OHdG) značajno je viši u skupini nepušača u odnosu na skupinu pušača konvencionalnih cigareta ili pušača THS-a (Kruskal Wallisov test, $P < 0,001$) (Tablica 27).

Tablica 27. Koncentracije salivarnih citokina i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Medijan (interkvartilni raspon)			P^*
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	
Salivarni interleukin IL-1 β [pg/ml]	0 (0 – 51,2)	11,8 (0 – 174,6)	0 (0 – 97,9)	0,68
Salivarni interleukin IL-2 [pg/ml]	0 (0 – 0) (min 0 – max 157,2)	0 (0 – 0) (min 0 – max 28,5)	0 (0 – 0) (min 0 – max 31,3)	0,64
Salivarni interleukin IL-6 [pg/ml]	0 (0 – 0) (min 0 – max 202,8)	0 (0 – 0) (min 0 – max 157,2)	0 (0 – 0) (min 0 – max 106,5)	0,30
Salivarni TNF- α [pg/ml]	57,1 (29,7 – 1112,2)	43,3 (10,3 – 2962,3)	29,1 (10,3 – 82,6)	0,16
Salivarni biomarker oksidativnog stresa (8-OHdG) [pg/ml]	2,89 (0,84 – 5,64)	0 (0 – 1,68)	0 (0 – 0,09)	<0,001[†]

*Kruskal Wallisov test (*Post hoc test* Conover)

[†]na razini $P < 0,05$ značajne su razlike (kontrola) vs. (konvencionalne cigarete, THS)

THS – Tobacco Heating System

4.10. Procjena razine psiholoških simptoma

4.10.1. Ljestvica percipiranog stresa

Teorijski raspon percipiranog stresa u svakodnevnim situacijama je od 0 do 40, gdje viši rezultat označava viši stupanj percipiranog stresa.

Pušači konvencionalnih cigareta značajno niže percipiraju svakodnevne stresne situacije u usporedbi s nepušačima i pušačima THS-a (Kruskal Wallisov test, $P = 0,012$) (Tablica 28).

Tablica 28. Medijan i interkvartilni raspon percipiranog stresa između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Medijan (interkvartilni raspon)			P^*
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	
Ljestvica percipiranog stresa	23 (21 – 26)	21 (19 – 22)	22 (19 – 26)	0,01[†]

*Kruskal Wallisov test (*Post hoc test* Conover)

[†]na razini $P < 0,05$ značajne su razlike (konvencionalne cigarete) vs. (kontrola, THS)

THS – *Tobacco Heating System*

Obzirom na dobivene vrijednosti i rezultate, LJPS se kategorizira u tri stupnja (visoku, umjerenu i nisku razinu stresa). Visoka razina percipiranog stresa uočava kod 15 (17 %) ispitanika, umjerena razina kod 65 (72 %) i niska razina kod 10 (11 %). Nije uočena značajna razlika u raspodjeli u odnosu na skupine (Tablica 29).

Tablica 29. Raspodjela ispitanika prema stupnju percipiranog stresa između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				P*
	Nepušači (n =30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	
Stupanj percipiranog stresa					
Niska razina stresa (0 – 13)	2 (7)	3 (10)	5 (17)	10 (11)	0,08
Umjerena razina stresa (14 – 26)	21 (70)	26 (87)	18 (60)	65 (72)	
Visoka razina stresa (27 – 40)	7 (23)	1 (3)	7 (23)	15 (17)	

*Fisherov egzaktni test
THS – *Tobacco Heating System*

4.10.2. Skala depresivnosti, anksioznosti i stresa

Analizom rezultata nije pronađena značajna razlika u subskalama stresa, anksioznosti i depresivnosti (DASS) s obzirom na skupine ispitanika (Tablica 30).

Nema značajne razlike u subskali stresa, anksioznosti i depresivnosti (DASS) s obzirom na skupine ispitanike (Tablica 30).

Tablica 30. Razlike u stresu, anksioznosti i depresivnosti između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

DASS Ljestvica	Medijan (interkvartilni raspon)			<i>P</i> *
	Nepušači (n = 30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	
Stres	12 (6 – 18)	9 (4 – 13)	15 (4 – 22)	0,18
Anksioznost	6 (1 – 11)	5 (1 – 11)	2 (1 – 9)	0,47
Depresivnost	4 (1 – 10)	4 (1 – 9)	6 (1 – 10)	0,99

*Kruskal Wallisov test
THS – *Tobacco Heating System*

U subskali stresa, teški ili iznimno teški stres navodi 10 (11 %) ispitanika, isti broj ima blagi stupanj stresa, umjereni stupanj se nalazi kod 11 (12 %) ispitanika, a normalne razine stresa kod 59 (66 %) ispitanika.

Težak ili iznimno težak stupanj anksioznosti ima 7 (8 %) ispitanika, umjeren stupanj njih 21 (23 %), blagi stupanj anksioznosti 7 (8 %) ispitanika, dok ih je 55 (61 %) s normalnom razinom anksioznosti, bez značajne razlike u odnosu na skupine.

Bez simptoma depresivnosti je 67 (74 %) ispitanika, umjereni stupanj ima 11 (12 %) ispitanika, blagi njih 8 (9 %), a po 2 (2 %) ispitanika imaju težak ili iznimno težak stupanj depresivnosti, bez značajne razlike u odnosu na skupine (Tablica 31).

Tablica 31. Raspodjela ispitanika prema izraženosti stresa, anksioznosti i depresivnosti između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Broj (%) ispitanika				<i>P</i> *
	Nepušači (n =30)	Pušači konvencionalnih cigareta (n = 30)	Pušači THS-a (n = 30)	Ukupno (n = 90)	
DASS stres					
Normalan stres	20 (67)	25 (83)	14 (47)	59 (66)	0,13
Blagi stupanj	3 (10)	2 (7)	5 (17)	10 (11)	
Umjereni stupanj	3 (10)	3 (10)	5 (17)	11 (12)	
Teški stupanj	3 (10)	0	5 (17)	8 (9)	
Iznimno teški stupanj	1 (3)	0	1 (3)	2 (2)	
DASS anksioznost					
Normalna razina	16 (53)	19 (63)	20 (67)	55 (61)	0,77
Blagi stupanj	3 (10)	1 (3)	3 (10)	7 (8)	
Umjereni stupanj	8 (27)	8 (27)	5 (17)	21 (23)	
Teški stupanj	0	1 (3)	1 (3)	2 (2)	
Iznimno težak stupanj	3 (10)	1 (3)	1 (3)	5 (6)	
DASS depresivnost					
Bez simptoma	22 (73)	23 (77)	22 (73)	67 (74)	0,74
Blagi stupanj	2 (7)	2 (7)	4 (13)	8 (9)	
Umjereni stupanj	3 (10)	5 (17)	3 (10)	11 (12)	
Teški stupanj	1 (3)	0	1 (3)	2 (2)	
Iznimno težak stupanj	2 (7)	0	0	2 (2)	

*Fisherov egzaktni test

THS – Tobacco Heating System

4.11. Povezanost razine salivarnih citokina i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa sa psihološkim statusom ispitanika

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenila se povezanost salivarnih citokina i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa sa psihološkim statusom ispitanika.

U skupini nepušača uočava se slaba i negativna povezanost salivarnog IL-6 sa simptomima depresivnosti (DASS) i salivarnog TNF- α sa skalom percipiranog stresa, odnosno što su izraženiji simptomi depresivnosti to su niže vrijednosti salivarnog interleukina IL-6 ($Rho = -0,418$), te što je jače izražen percipirani stres, to su niže vrijednosti salivarnog TNF- α ($Rho = -0,402$) i obratno. U skupini pušača konvencionalnih cigareta i u skupini pušača THS-a nema značajne povezanosti salivarnih citokina i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa sa psihološkim statusom ispitanika (Tablica 32).

Tablica 32. Povezanost salivarnih citokina i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa sa psihološkim statusom ispitanika u skupinama nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)				
	Salivarni interleukin IL-1 β	Salivarni interleukin IL-2	Salivarni interleukin IL-6	Salivarni TNF- α	Salivarni biomarker oksidativnog stresa (8-OHdG)
Nepušači					
Ljestvica percipiranog stresa	0,133 (0,49)	-0,257 (0,18)	-0,318 (0,09)	-0,402 (0,03)	0,101 (0,60)
DASS stres	-0,017 (0,93)	-0,077 (0,69)	-0,111 (0,57)	-0,024 (0,90)	0,095 (0,63)
DASS anksioznost	-0,059 (0,76)	-0,153 (0,43)	-0,214 (0,26)	-0,141 (0,47)	0,069 (0,72)
DASS depresivnost	0,021 (0,91)	-0,218 (0,26)	-0,418 (0,02)	-0,050 (0,80)	-0,031 (0,87)
Pušači konvencionalnih cigareta					
Ljestvica percipiranog stresa	0,05 (0,79)	0,028 (0,88)	0,019 (0,92)	-0,064 (0,74)	0,115 (0,54)
DASS stres	0,119 (0,53)	-0,19 (0,31)	0,118 (0,53)	-0,286 (0,12)	-0,119 (0,53)
DASS anksioznost	0,088 (0,64)	-0,092 (0,63)	0,234 (0,21)	-0,257 (0,17)	0,005 (0,98)
DASS depresivnost	0,028 (0,88)	-0,076 (0,69)	0,236 (0,21)	-0,287 (0,12)	-0,073 (0,70)
Pušači THS-a					
Ljestvica percipiranog stresa	-0,311 (0,09)	0,035 (0,85)	0,004 (0,98)	-0,084 (0,66)	-0,127 (0,51)
DASS stres	-0,127 (0,51)	0,145 (0,44)	0,087 (0,65)	0,003 (0,99)	0,026 (0,89)
DASS anksioznost	-0,007 (0,97)	0,263 (0,16)	0,082 (0,67)	0,067 (0,73)	-0,015 (0,94)
DASS depresivnost	-0,206 (0,28)	0,032 (0,87)	-0,092 (0,63)	-0,133 (0,48)	-0,252 (0,18)

THS – Tobacco Heating System

5. RASPRAVA

5.1. Opća obilježja ispitanika i karakteristike skupina pušača

Prema nalazima Europske zdravstvene ankete provedene u Hrvatskoj 2019. godine, 22 % stanovnika Republike Hrvatske su svakodnevni pušači konvencionalnih cigareta, dok je postotak pušača duhanskih preparata bez izgaranja neprestano u porastu [119]. Prema istraživanjima Laverty i sur. [120], 2020. godine postotak pušača duhanskih preparata bez izgaranja iznosio je 6,8 %. Veliko presječno istraživanje provedeno na 7714 ispitanika u Japanu navodi da 5 % muškaraca i 2,2 % žena svakodnevno koristi THS proizvode. Uz spolne razlike, autori također navode češću upotrebu THS proizvoda u mlađoj populaciji (20-im i 30-im godinama) [121]. Rezultati našeg istraživanja sa stratificiranim uzorkom djelomično su u skladu s provedenim istraživanjem, uključujući većinom mlađe ispitanike ženskog spola. U literaturi se nalaze oprečni rezultati kada se promatra stupanj obrazovanja pušača, a rezultati sugeriraju da najveći broj pušača ima srednju stručnu spremu. U skupini pušača THS-a visoki postotak ispitanika ima i visoku stručnu spremu, a prema istraživanju Laverty i sur. [120] visokoobrazovane osobe češće upotrebljavaju ove alternativne duhanske proizvode kako bi izbjegle zabrane i pravila o konzumaciji duhanskih preparata u zatvorenim prostorima. U skladu s našim rezultatima su rezultati presječnog istraživanja provedenog u Japanu koje navodi da je prevalencija ženskih THS pušača najveća u dobi između 20 do 30 godine i u osoba s 15 ili više godina obrazovanja [15]. Nasuprot našim nalazima, presječno istraživanje Yoshioka i sur. [121] provedeno na 10 439 pušača konvencionalnih cigareta, pušača THS-a, bivših pušača i nepušača sugerira rezultatima da najveći udio ispitanika iz svake skupine ima prvostupanjsku diplomu. Upotreba THS-a češća je također među bivšim i sadašnjim pušačima, te nepušačima, a smatra se da otprilike 2 % nepušača ima želju isprobati ili su isprobali ove nove alternativne sustave bez izgaranja [121]. U našem istraživanju, svi osim dva ispitanika su prethodno pušili konvencionalne cigarete, a jedan ispitanik je bio nepušač. Potencijalni razlog i objašnjenje ovih rezultata je činjenica da su THS sustavi u medijima reklamirani kao manje opasni ili bezopasni duhanski proizvodi zbog čega su privlačni nepušačima ili pušačima konvencionalnih cigareta gdje predstavljaju i oblik pomoći pri smanjenju ili prestanku pušenja [121, 122]. Prosječna dnevna konzumacija konvencionalnih cigareta prema Europskoj zdravstvenoj anketi u Hrvatskoj je iznosila od 15 do 24 cigareta dnevno u skoro polovice ispitanika [119]. U našem istraživanju dnevna konzumacija cigareta bila je niža u obje skupine pušača, a prosječno je iznosila između 11 do 15 cigareta dnevno. U skupinama pušača konvencionalnih cigareta, također su ispitanici imali duži pušački staž u usporedbi s pušačima THS-a, a vjerojatno jer se

radi o novim alternativnim sustavima duhanskih preparata koji još nisu toliko rasprostranjeni u usporedbi s konvencionalnim cigaretama. Prethodno spomenuto istraživanje provedeno u Japanu koristilo je sličan indeks pušenja koji je jednak umnošku trajanja navike pušenja izražene u godinama i dnevnoj potrošnji kutija cigareta, a u rezultatima navodi da skupina THS pušača ima prisutne niže vrijednosti indeksa, odnosno puši manje kutija cigareta dnevno i kraći period [121]. Iako nije pronađena značajna razlika, naši rezultati također sugeriraju niže vrijednosti indeksa pušenja u skupini pušača THS-a. Zapravo većina ispitanika prema vrijednostima BI se kategorizira u skupinu pušača s niskim ili umjerenim intenzitetom pušenja, a prosječna dnevna konzumacija cigareta ne prelazi 15 cigareta dnevno što se može objasniti većinski ženskim uzrokom i mlađom populacijom [123-125].

5.2. Utjecaj duhanskih sustava na samoreportirane oralne simptome i promjene oralne sluznice

Prisutnost samoreportiranih simptoma ili promjena je podjednako prisutna u skupinama pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a te se značajno razlikovala u usporedbi sa skupinom nepušača. U skupini pušača konvencionalnih cigareta najčešće je reportiran osjećaj suhoće usne šupljine, prisutnost neugodnog zadaha, samoreportirane promjene oralne sluznice, promjene osjeta mirisa i okusa, te prisutnost simptoma pečenja. U skupini pušača THS-a najčešći samoreportirani simptomi i promjene su samoreportirana promjena osjeta okusa, suhoća usne šupljine, simptomi pečenja, prisutnost neugodnog zadaha i samoreportirane promjene oralne sluznice. Kod skupine nepušača jedini samoreportirani simptom bila je suhoća usne šupljine. Učestalost samoreportiranih simptoma proučavana je u velikom istraživanju provedenom u Turskoj gdje je zamijećena povećana učestalost kašlja, suhoće grla, iritacije oralne sluznice, poremećaj osjeta okusa, neugodnog zadaha i zubobolje u skupinama pušača konvencionalnih cigareta [126]. Također, djelomično u skladu s našim rezultatima su i rezultati istraživanja koje proučava štetne učinke električnih cigareta gdje je zabilježeno da više od polovice ispitanika ima barem jedan simptom ili promjenu koja se može povezati s pušenjem. Najčešći samoreportirani simptomi u pušača električnih cigareta i pušača konvencionalnih cigareta bili su kašalj, suha usta ili grlo, vrtoglavica, glavobolja ili migrena, otežano disanje i promjena ili gubitak osjeta okusa. U našem istraživanju značajna razlika između skupine pušača THS-a, pušača konvencionalnih cigareta i nepušača je ustanovljena za osjeta okusa. Naime, smanjenje osjeta okusa prisutno je samo u skupinama pušača gdje se navedene promjene najčešće

reportiraju kao smanjenje percepcije slanog, gorkog i slatkog okusa. Naši rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim ciklusom istraživanja Nacionalnog zdravstvenog intervjua (NHIS) 2021. godine koji navodi da pušači različitih duhanskih proizvoda i električnih cigareta češće reportiraju oslabljenje okusne funkcije u usporedbi s nepušačima [127]. Također, značajna razlika uočena je kod samoreportiranih simptoma pečenja ili žarenja oralne sluznice koji su najviše zastupljeni u skupini pušača THS-a. Simptomi pečenja uglavnom su lokalizirani na jeziku, blagog su karaktera, nemaju uniformni obrazac pojave simptoma te su češće prisutni kod THS pušača što može ukazivati na neželjene reakcije ovih novih duhanskih sustava ili da su rezultat mehaničkih, termičkih ili kemijskih podražaja [16, 127, 128]. Većina istraživanja koje proučava samoreportirane simptome u skupinama pušača uključivala je veliki broj ispitanika s dužim pušačkim stažem što može objasniti činjenicu zbog čega su u našem istraživanju izostale značajne razlike u većini promatranih samoreportiranih simptoma. Većina naših ispitanika su mlađi ispitanici s kraćim pušačkim stažem. U našem istraživanju 90 % pušača THS-a je prije početka konzumacije novih duhanskih preparata konzumiralo preparate konvencionalnih cigareta, a prelaskom na ove nove duhanske sustave navode poboljšanje osjeta okusa, smanjenje prisutnosti neugodnog zadaha i rjeđi kašalj. Smanjena učestalost i intenzitet navedenih simptoma prema našim saznanjima nisu proučavani u literaturi, ali se potencijalno mogu se objasniti smanjenim udjelom opasnih sastojaka i smanjenom učestalosti konzumacije duhanskih preparata.

5.3. Utjecaj duhanskih sustava na morfološke promjene oralne sluznice

Pušenje konvencionalnih cigareta ima štetne učinke na oralno zdravlje i povezano je s povećanim rizikom razvoja oralnih bolesti, kao što su premaligne i maligne lezije. Prema literaturi, inhalirani sastojci cigaretnog dima uzrokuju upalne i strukturalne promjene oralnog epitela [16, 17]. Presječno istraživanje Patil i sur. [129] navodi da je pušenje jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj ne samo premalignih i malignih lezija, već i mnogih drugih stanja kao što su leukodem, lihen planus, pušačko nepce i pušačka melanoza. Prevalencija morfoloških promjena značajno se razlikovala između skupina pušača i nepušača, ali bez značajnosti za pojedinačne skupine pušača. U skupinama pušača prosječno 50 % ispitanika ima prisutne morfološke promjene oralne sluznice, koje su najčešće lokalizirane na jeziku ili bukalnoj sluznici. Morfološke promjene oralne sluznice, njihova prevalencija i lokalizacija proučavane su u presječnom istraživanju provedenom na 1000 korisnika različitih duhanskih

preparata. Lokalizacije navedenih promjena djelomično su u skladu s našim saznanjima, a uključuju veći postotak i veći broj lokalizacija na kojim su prisutne promjene oralne sluznice [130, 131]. Veći broj lokalizacija i povećanje postotka pojavnosti oralnih lezija na određenim lokalizacijama može se objasniti činjenicom da je ovo istraživanje uključivalo veći broj ispitanika koji koriste različite duhanske preparate za koje se opisuju raznovrsnije i specifične promjene oralne sluznice. U našem istraživanju, prevalencija morfoloških promjena je viša u usporedbi s istraživanjem Patel i sur. [132] gdje je kod 16 % ispitanika utvrđena prisutnost morfoloških promjena oralne sluznice koje se mogu povezati s pušenjem te su težinom i izgledom proporcionalne dužini i intenzitetu upotrebe duhanskih proizvoda. Nadalje, povećana prevalencija oralnih lezija u pušača dokazana je i u presječnom istraživanju provedenom na 750 korisnika različitih duhanskih proizvoda. Od 750 ispitanika, 225 (30%) je imalo prisutne oralne mukozne promjene koje su karakterizirane u 13 % slučajeva kao premaligne lezije, u 28 % kao premaligna stanja, i u 60 % kao druge lezije povezane s pušenjem (lihenoidne lezije, pušačka melanoza, palatalna hiperkeratoza) [130]. Ovi rezultati nasuprot su našim saznanjima gdje niti jedan ispitanik nije imao promjene koje se mogu definirati kao premaligne ili maligne lezije. Morfološke promjene u našem istraživanju definirane su kao benigne oralne lezije, a najzastupljenije oralne promjene koje se potencijalno mogu povezati s pušenjem su erozija ili ulceracija, eritem ili atrofija, morsikacija, obložen ili dlakav jezik, pušačka melanoza i eritematozni oblik kandidijaze. Eritem, erozija ili atrofija oralne sluznice najčešće su opisane promjene u skupinama pušača, te se nešto češće javljaju u THS pušača. Navedene promjene rezultat su mehaničkih, kemijskih i toplinskih iritacija te su najčešće prisutne na usnicama, nepcu ili jeziku odnosno na mjestima udara najjačeg mlaza dima cigarete. Povećana prevalencija navedenih promjena dokazana je u pušača konvencionalnih cigareta [26, 131]. Prethodno provedena istraživanja koja su proučavala povezanost pušenja i obloženog jezika imaju oprečna saznanja. U istraživanju provedenom na 100 pušača i 100 nepušača dokazana je značajno veća učestalost obloženog jezika u skupini pušača [133]. Nasuprot ovim saznanjima, Suzuki i sur. [134] u svom istraživanju su promatrali obloženi jezik i sastav bakterijskog biofilma u pušača i nepušača te zaključili da ne postoji značajna razlika u prevalenciji, ali pušenje konvencionalnih cigareta doprinosi kolonizaciji dorzalne površine jezika bakterijama. Iako nije dokazana povećana učestalost obloženog ili dlakavog jezika, prema njihovim nalazima, pušenje može utjecati na morfologiju jezika, salivaciju i bakterijsku kolonizaciju te zajedničkim djelovanjem navedenih čimbenika doprinijeti razvoju obloženog ili dlakavog jezika [134]. Pušačka melanoza ili melaninske pigmentacije pričvrzne gingive bile su prisutne u samo 3 pušača, od kojih su 2 ispitanika pušači THS-a. Nasuprot našim istraživanjima, Kato i

sur. [135] u svojim istraživanjima navode veću prevalenciju pušačke melanoze u pušača konvencionalnih cigareta [24, 135]. Također, navode da je intenzitet pušenja izravno proporcionalan intenzitetu pigmentacija, s izraženim povećanjem prevalencije kod pojedinaca koji puše više od 10 cigareta dnevno [135]. Pigmentacije gingive su rezultat djelovanja nikotina i ostalih opasnih sastojaka cigaretnog dima na melanocyte što posljedično vodi pojačanoj produkciji melanina [24]. S obzirom na to da novi duhanski sastojci u sastavu imaju nikotin očekivano je da će ove promjene biti prisutne i u skupinama pušača THS-a, a niski ili blagi intenzitet pušenja, kraći pušački staž te mlađa dob ispitanika objašnjava izostanak pigmentacija. U našem istraživanju dva ispitanika su imala eritematoznu kandidijazu koja je potvrđena obriskom sluznice. Brojni čimbenici mogu doprinijeti razvoju kandidijaze u usnoj šupljini, a ispitanici s potvrđenom kandidijazom imaju više predisponirajućih čimbenika koji mogu pogodovati razvoju oralne infekcije (nosioci protetskih radova, smanjeno lučenje sline, pušači su konvencionalnih cigareta) [132]. Od ostalih promjena na oralnoj sluznici uočene su promjene: fisurirani jezik, eksfolijativni heilitis, geografski jezik i *morsicatio*. Navedene promjene nisu rezultat konzumacije duhanskih preparata, iako mogu biti jače izražene u pušača. U literaturi nismo uspjeli pronaći istraživanja koja proučavaju klinički vidljive morfološke promjene u pušača THS-a, ali prema navedenim in vitro istraživanjima za očekivati je manje opsežne i izražene promjene u usporedbi s pušačima konvencionalnih cigareta. Morfološke promjene na bukalnim i gingivnim kulturama stanica izloženim aerosolu THS-a bile su sličnije kontrolama epitelnih stanica izloženim zraku nego epitelnim stanicama izloženim dimu konvencionalnih cigareta [16, 17]. To je u suprotnosti s našim istraživanjem gdje su navedene oralne promjene bile sličnije promjenama pronađenim u pušača konvencionalnih cigareta. Međutim navedena odstupanja mogu se objasniti činjenicom da su in vitro istraživanja uključivala detaljniju analizu tkiva (npr. patohistološka ili citološka analiza) te su uključivale veći broj uzoraka koji su bili izloženi različitim koncentracijama duhanskih sastojaka, dok su naši rezultati bili ograničeni na kliničke preglede i mlađe ispitanike s kraćim pušačkim stažem i blagim intenzitetom pušenja.

5.4. Utjecaj duhanskih preparata na količinu sline

Proces lučenja sline je složen proces na koji mogu utjecati različiti unutarnji i vanjski čimbenici koji uključuju i pušenje [39]. Utjecaj pušenja na količinu i kvalitetu sline je uvjetovan dužinom i intenzitetom pušenja, odnosno pušači s dužim pušačkim stažem ili visokim brojem dnevne

konzumacije cigareta imaju smanjenu količinu i/ili promijenjenu kvalitetu sline [42, 136, 137]. U ovom istraživanju, rezultati su pokazali da obje skupine pušača imaju smanjeno lučenje sline i hiposalivaciju u usporedbi s nepušačima, dok između pojedinih skupina pušača nije pronađena značajna razlika. Ipak, analizom srednjih vrijednosti pokazalo se da pušači THS-a imaju veću količinu nestimulirane sline u usporedbi s pušačima konvencionalnih cigareta, što može biti objašnjeno kraćim pušačkim stažem, izostankom sagorijevanja duhana i smanjenim udjelom opasnih i potencijalno opasnih sastojaka [8]. Literatura koja proučava utjecaj pušenja na količinu sline navodi oprečne rezultate [18, 39, 40, 42, 138-143]. U presječnom istraživanju provedenom na 28 pušača i 24 nepušača pokazalo se da pušenje značajno utječe na smanjene količine sline, pH i viskoznost sline. Rezultati tog istraživanja, u skladu su s našim rezultatima, osobito jer su uključivali mlade odrasle osobe kod kojih proces starenja i posljedična parenhimalna atrofija žlijezda slinovnica isključeni kao zbunjujući čimbenici [138]. Smanjeno lučenje sline i hiposalivacija kod dugogodišnjih pušača može se objasniti morfološkim promjenama u strukturi žlijezda slinovnica ili prilagodbom receptora na opetovane podražaje duhanskim dimom [44]. U istraživanju Fenoll-Palomares i sur. [141] došlo je do kratkotrajnog povećanja brzine protoka sline kod novih pušača, ali nije uočena značajna razlika u količini sline kod dugogodišnjih pušača. Kratkotrajno povećanje količine sline, istraživači objašnjavaju kemijskom stimulacijom nikotinskih i citozinskih receptora te obrambenom reakcijom doušnih žlijezda koje nakon iritacije duhanskim dimom počinju lučiti veće količine sline kako bi očuvale oralne strukture [44, 141, 142]. Nadalje, Petrušić i sur. [37], također, nisu pronašli značajnu razliku u količini nestimulirane i stimulirane sline pušača i nepušača, iako brzina lučenja sline je bila niža u skupini pušača. Autori, također, navode da je dužina pušenja značajniji rizični čimbenik u odnosu na broj konzumiranih cigareta u danu. Utjecaj THS-a na količinu sline do sada je proučavan u jednom istraživanju, a dobiveni rezultati su u skladu s našim saznanjima gdje najveću količinu nestimulirane sline imaju nepušači, nakon čega slijede pušači THS-a te u konačnici pušači konvencionalnih cigareta [18].

5.5. Utjecaj duhanskih preparata na gljive roda *Candida*

Utvrđeno je da pušenje i duhanski preparati imaju negativni utjecaj na gljive roda *Candida* povećavajući njihov broj i kolonizaciju u usnoj šupljini. Neki od čimbenika koji doprinose kolonizaciji su nutritivni čimbenici duhanskog dima, smanjena količina sline i obrambenih čimbenika, te češće lokalne epitelne promjene uzrokovane štetnim sastojcima dima [47, 144].

Iako se u literaturi navodi da pušenje povećava broj kolonija i učestalost kandidijaze, druga istraživanja uključujući i naše nisu uspjeli pronaći ovu povezanost [47]. S obzirom na to da je kod malog broja ispitanika uspješno identificirana jedna od vrsti kandidate u usnoj šupljini, ovi rezultati sugeriraju da ne postoji povezanost između pušenja i povećane učestalosti gljivične infekcije. Naši rezultati mogu se usporediti s rezultatima istraživanja provedenog na 58 pušača i 42 nepušača u Brazilu gdje nije pronađena statistički značajna razlika u broju različitih vrsta kandidate u usnoj šupljini. Ispitanici su, također, bili zdravi i bez kliničkih znakova oralne kandidijaze, a broj kandidate u ustima određen je metodom obriska dorzalne površine jezika [145]. U našem istraživanju većina ispitanika su bili mladi, odrasli ljudi koji su imali kraći pušački staž, za razliku od drugih istraživanja u kojima su ispitanici s oralnom kandidijazom bili umjereni do teški pušači s dužim pušačkim stažem [146, 147]. Iako je *Candida* izolirana u malom broju ispitanika, broj kolonija koje su porasle identificiran i kvantificiran je vizualnom tehnikom. Uspješno su izolirane dvije vrste *Candida* u 8 ispitanika, a one uključuju *Candidu albicans* i *Candidu glabrata*, pri čemu pušači konvencionalnih cigareta imaju značajno češće izoliranu *Candidu albicans* u usporedbi s ostalim skupinama. Kvantifikacijom broja kolonija pokazalo se da najveći broj izolata broji između 25 do 100 kolonija. Naši rezultati su u skladu s rezultatima presječnog istraživanja provedenog u Saudijskoj Arabiji na 47 muškaraca podijeljenih u skupine pušača i nepušača. U 19 ispitanika je uspješno izolirana kandida. Od 19 izolata kandidate, 18 (94,7 %) je također identificirano kao *Candida albicans*, a 1 (5,3 %) kao *Candida tropicalis* [147].

5.6. Utjecaj duhanskih preparata na razvoj halitoze

Pušenje se smatra jednim od glavnih uzroka neugodnog zadaha. Mnogobrojna istraživanja opisuju ovu povezanost, a razlikuju se po metodi određivanja prisutnosti neugodnog zadaha, geografskoj lokaciji i pridruženim patološkim stanjima [52]. Većina istraživanja se temelji na samoreportiranoj halitozi te obuhvaća zemlje s visokom stopom pušenja (Indija, Saudijska Arabija), te alternativnim metodama konzumacije duhanskih preparata [148, 149]. Ovo istraživanje je obuhvatilo subjektivnu i relativno objektivnu organoleptičku metodu određivanja halitoze. Samopercipirana halitoza procijenila se pitanjima u upitniku za pušače, a rezultati su pokazali da iako ne postoji statistički značajna razlika između pušača i nepušača, povećani udio samoreportirane halitoze prisutan je u obje skupine pušača. Slično našim rezultatima, presječno istraživanje provedeno u Saudijskoj Arabiji procjenjivalo je prisutnost neugodnog zadaha

upitnikom i potvrdilo njegovu povećanu učestalost kod skupine pušača [150]. Također, povećanu učestalost samoreportirane halitoze potvrdilo je i istraživanje provedeno na velikom broju ispitanika na europskom kontinentu [151]. Istraživanje autora Lisetska i sur. [54], također, je provedeno na malom broju ispitanika, a nasuprot našim rezultatima sugerira smanjenje neugodnog zadaha u pušača THS-a u usporedbi s pušačima konvencionalnih cigareta. Drugi dio istraživanja odnosio se na kliničku procjenu halitoze organoleptičkom metodom. Organoleptička metoda procjene se zasniva na subjektivnoj procjeni ispitivača, a kako bi se smanjio udio subjektivne procjene provedena je kalibracija dva ispitivača [152]. Rezultati sugeriraju da pušači konvencionalnih cigareta i pušači THS imaju značajno veću stopu neugodnog zadaha u usporedbi s nepušačima, ali bez značajne razlike između pojedinačnih pušačkih skupina. Presječno istraživanje provedeno na 896 ispitanika proučavalo je povezanost halitoze i kliničkih parametara povezanih s tim stanjem kod odraslih u Pretoriji, Južnoafričkoj Republici. Rezultati istraživanja sukladni su s našim nalazima i sugeriraju značajnu povezanost pušenja i organoleptički potvrđene halitoze kod ispitanika. Uz to navode da obloženi jezik, povećana razina plaka, krvarenje pri sondiranju i parodontitis povećavaju vjerojatnost razvitka halitoze [153]. Nadalje, istraživanje provedeno u Italiji proučavalo je halitozu u pušača i uspoređivalo parametre dobivene upitnikom i organoleptičkom metodom, te potvrdilo povećanu učestalost halitoze u pušača, negativnu povezanost između intenziteta pušenja, samopercipirane halitoze i organoleptičke procjene. Teški pušači samoprocjenom su naveli da nemaju ili u maloj mjeri imaju prisutan neugodan zadah, dok su organoleptičke procjene sugerirale suprotno [154]. Pušači, osobito pušači koji puše više i duže, imaju lošiju oralnu higijenu te iako su svjesni svojeg lošijeg oralnog zdravlje, traže pomoć kasnije u usporedbi s nepušačima [155, 156]. Nadalje, istraživanje Jiun i sur. [157] određivalo je prisutnost neugodnog zadaha u pušača halimetrom, odnosno uređajem koji mjeri razinu hlapljivih sumpornih spojeva u izdahu i u skladu s našim rezultatima istraživači su potvrdili da 75 % pušača u usporedbi s 8 % nepušača ima prisutan neugodan zadah. U skupinama pušača, također, je potvrđena i hiposalivacija koja je jedan od uzroka halitoze. Dokazano je da dugotrajno pušenje uzrokuje morfološke promjene unutar žlijezda slinovnica, mijenja kvalitetu i kvantitetu sline te u konačnici dovodi do neugodnog zadaha [42]. Nasuprot ovim rezultatima, istraživanje Gavazova i sur. [53] ne navodi značajnu razliku između pušača i nepušača, ali sugerira da pušači imaju veću stopu halitoze u usporedbi s nepušačima. Prisutnost halitoze u THS pušača opisana je u već spomenutom istraživanju o samoreportiranoj halitozi, a rezultati podupiru naša otkrića, te navode smanjenu učestalost pojave neugodnog zadaha i njegov blaži intenzitet. Smanjenja učestalost i intenzitet neugodnog zadaha u THS pušača može se objasniti izostankom procesa

sagorijevanja i duhanskog dima, odnosno smanjenim udjelom štetnih tvari te vjerojatno promijenjenim djelovanjem aerosola na oralni mikrobiom koji u našem istraživanju nije proučavan [158].

5.7. Utjecaj duhanskih preparata na olfaktornu i gustatornu funkciju

Prema literaturi, pušači konvencionalnih cigareta i ostalih oblika duhanskih preparata imaju veći rizik za razvoj olfaktorne i gustatorne disfunkcije [41, 59, 61]. Iako rezultati ovog istraživanja sugeriraju da pušenje negativno utječe na olfaktornu i gustatornu funkciju, također sugeriraju da ne postoji razlika u utjecaju različitih duhanskih preparata (THS i konvencionalne cigarete).

U literaturi se navodi da pušenje konvencionalnih cigareta ima negativan utjecaj na olfaktornu funkciju i da pušači imaju i do 60 % veći rizik od razvoja disfunkcije u usporedbi s nepušačima [59]. U ovom istraživanju, pušači konvencionalnih cigareta imali su najveću prevalenciju i stupanj hiposmije, dok pušači THS-a imaju manju stopu olfaktorne disfunkcije. Prema našim saznanjima do sada u literaturi nije proučavan učinak THS sustava na olfaktornu funkciju, a istraživanja koja su proučavala učinak sličnih električnih cigareta navela su najvišu stopu oslabljenja funkcije mirisa u skupini pušača električnih cigareta kada se ona uspoređivala s ostalim duhanskim preparatima [127]. Veliki broj istraživanja objašnjava negativni utjecaj pušenja na funkciju mirisa, a najčešće korišteni test za procjenu mirisne funkcije je „*Sniffin' Sticks*“ test. Ovaj instrument uključuje ispitivanje praga osjeta mirisa (engl. *odor threshold*), razlikovanja (engl. *odor discrimination*) i prepoznavanja (engl. *odor identification*), a rezultati sugeriraju negativni utjecaj pušenja na sve tri komponente mirisa [60, 159]. Nasuprot ovim rezultatima, istraživanja koja su koristila jednostavniji, screening test koji ispituje samo sposobnost identifikacije nisu pronašle značajnu povezanost između pušenja i smanjenja mirisne funkcije [160, 161]. U našem istraživanju, također je korištena jednostavnija, screening varijanta testa koja mjeri mogućnost identifikacije pojedinih mirisa što može objasniti činjenicu da je narušena funkcija pronađena samo u skupini pušača konvencionalnih cigareta, ali ne i u THS pušača. Osim samog testa, THS sustavi izbjegavaju proces pirolize i generiraju aerosol umjesto duhanskog dima što posljedično može uzrokovati manju iritaciju i promjene u olfaktornom epitelu. Osim samog prisustva olfaktorne disfunkcije kod pušača, rezultati našeg istraživanja sugeriraju negativnu povezanost između indeksa pušenja i olfaktorne funkcije, te su u skladu s dosad provedenim istraživanjima [60, 61]. Veliko istraživanje u Njemačkoj

procijenilo je sposobnost mirisa na 1277 ispitanika koristeći isti Screening 12-identifikacijski test i otkrilo najveću prevalenciju hiposmije u pušača te pozitivan odnos doze i odgovora između dnevne konzumacije cigareta i hiposmije [61]. Prema istraživanju, olfaktorna disfunkcija je izraženija kod pušača, muškaraca i starijih osoba [61, 63, 64]. Starenje se navodi kao glavni uzrok smanjenja mirisne funkcije, a po intenzitetu nadmašuje i pušenjem uzrokovanu mirisnu disfunkciju [59]. Osim starenja, opisane su i spolne razlike u percepciji mirisa, pri čemu žene imaju niži prag podražaja, bolju mogućnost identifikacije i prepoznavanja. U našoj linearnoj regresijskoj analizi, jedini prediktor za razvoj olfaktorne disfunkcije se pokazao intenzitet pušenja dok vrsta duhanskih preparata, dob i spol nisu bili značajni prediktori. Slične rezultate su prikazali Larsen i sur. [161] koji su mjerili sposobnost identifikacije mirisa kod kroničnih pušača i izvijestili da funkcija mirisa u pušača nije ovisna o dobi, spolu i vrsti duhanskih proizvoda.

Osim funkcije mirisa, kod pušača je narušena i funkcija okusa [41, 66, 67, 162, 163]. U našem istraživanju, funkcija okusa je bila značajno više narušena u usporedbi s funkcijom mirisa vjerojatno zbog direktnog djelovanja dima/aerosola i opasnih sastojaka na oralnu sluznicu i okusne receptore. Nasuprot ovim rezultatima, Venneman i sur. [61] navode da pušenje značajno utječe na funkciju mirisa, dok je funkcija okusa narušena samo u skupinama „teških“ pušača (dnevna konzumacija viša od 20 cigareta). Osim što je veća učestalost gustatorne disfunkcije, ona je prisutna i u skupini pušača konvencionalnih cigareta i u skupini pušača THS-a, te uključuje smanjenje funkcije za cjelokupnu percepciju okusa, te pojedinačne okuse slanog, kiselog i gorkog. Percepcija pojedinačnih okusa kod pušača se različito opisuje u literaturi [59, 67], a prema nacionalnim reprezentativnim podacima u SAD-u, kronični pušači s većom ovisnošću o nikotinu osjećaju smanjeni intenzitet gorkog i slanog okusa [127]. Međutim, druga istraživanja nisu pronašla razlike u percepciji ili identifikaciji pojedinačnih okusa [164-166]. Naši nalazi podupiru činjenicu da pušači općenito imaju smanjenu osjetljivost na kiselo, gorko i slano. Zanimljivo je da su pušači THS-a pokazali bolju sposobnost identifikacije slanog okusa od pušača konvencionalnih cigareta što se može objasniti smanjenim udjelom štetnih sastojaka i mlađom dobi ispitanika s kraćim pušačkim stažem. U našem istraživanju, uspješna identifikacija slatkog okusa je bila očuvana u sve tri skupine, a rezultati su u kontrastu sa istraživanjem Tomassini i sur. [68] gdje se navodi povećan prag osjetljivost za slatki okus u skupinama pušača. Slično olfaktornoj funkciji, pronađena je negativna linearna korelacija između BI i okusne funkcije, pri čemu više vrijednosti indeksa se povezuju sa slabijom okusnom funkcijom [41, 66]. Khan i sur. [66], također, navode negativnu linearnu povezanost

između intenziteta pušenja i praga osjetljivosti. Sličan odnos utvrđen je u našem istraživanju, gdje povećanje trajanja i intenziteta pušenja dovodi do niže osjetljivosti za ukupnu osjetljivost i pojedinačne okuse (kiselo, slano, gorko). Ova povezanost se može objasniti negativnim djelovanjem duhanskog dima na broj i morfologiju gljivastih papila na dorzalnoj površini jezika [162]. Prema dosadašnjim saznanjima poremećaji okusa češće se javljaju kod starije populacije, žena i korisnika različitih duhanskih proizvoda. Jedan od najvažnijih prediktora za razvoj gustatorne disfunkcije je intenzitet pušenja ili BI čija negativna povezanost je ovisna o dnevnoj konzumaciji i dužini pušenja. Nakon BI, važan prediktor za razvoj koji je i prije potvrđen u istraživanjima je spol pri čemu žene puno češće razvijaju okusnu disfunkciju [163]. I na kraju važan prediktor za razvoj disfunkcije je vrsta duhanskih proizvoda. Ovaj prediktor sugerira da alternativni duhanski proizvodi također mogu oštetiti funkciju okusa [127]. Iako je u literaturi opisana povezanost starenja i slabljenja okusne funkcije, naši rezultati sugeriraju da dob nije važan prediktor za razvoj gustatornih smetnji. Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje koje procjenjuje učinke THS proizvoda na okusnu funkciju. Unatoč tvrdnjama proizvođača da su ovi proizvodi manje štetni od konvencionalnih cigareta, naše istraživanje sugerira slične učinke na olfaktornu i gustatornu funkciju onima koji se vide kod pušača konvencionalnih cigareta.

5.8. Utjecaj duhanskih preparata na salivarne citokine i biomarker oksidativnog stresa

U sastavu duhanskog dima nalaze se brojni opasni i potencijalno opasni sastojci koji utječu na stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta koje posljedično oksidiraju stanične biomolekule te narušavaju oksidativno-antioksidativnu ravnotežu. Stanje oksidativnog stresa nastaje kada antioksidativni obrambeni mehanizmi ne mogu neutralizirati oksidanse i popraviti oštećenja stanica uzrokovana njihovim djelovanjem. Kao posljedica oksidativnog stresa dolazi do upale koja je regulirana upalnim biomarkerima ili citokinima. Osim oksidativnog stresa, dim cigarete ima također i izravno djelovanje na upalu, pojačavajući ili suprimirajući ekspresiju određenih salivarnih citokina [19]. U literaturi, najproučavaniji citokini u slini pušača su IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Mnogobrojna istraživanja proučavaju salivarne koncentracije spomenutih citokina, a rezultati su ovisni o tome proučavaju li zdrave pušače ili pušače s oralnim bolestima kao što su gingivitis, parodontitis, leukoplakija ili oralni karcinom [91-95, 167]. Uz to, koncentracije salivarnih citokina ovisne su o dobi te intenzitetu pušenja [94]. Analizom naših rezultata, nije pronađena statistički značajna razlika u koncentracijama salivarnih citokina kod

pušača konvencionalnih cigareta, pušača THS-a i nepušača. Naprotiv, izmjerene koncentracije IL-1 β , IL-2 i IL-6 su bile izrazito niske u sve tri analizirane skupine, izuzev dva ispitanika iz skupine pušača koja pokazuju izrazito visoke vrijednosti IL-6, IL-1 β i TNF- α . Niske koncentracije salivarnih citokina mogu se objasniti mlađom dobi ispitanika, kraćim pušačkim stažem te činjenicom da kada kategoriziramo skupine pušača radi se o pušačima s niskim ili umjerenim intenzitetom pušenja. Ovo potvrđuje i činjenica da prethodno spomenuti pušači s visokim koncentracijama su ispitanici s visokim BI i starijom životnom dobi.

Kao što je već spomenuto, analizom uzoraka nije pronađena statistički značajna razlika u koncentracijama IL-6. U većini uzoraka koncentracija je bilo izrazito niska, a kada se promatraju rasponi salivarnih koncentracije može se uočiti najveći raspon koncentracija u skupini nepušača. Slično istraživanje provedeno u Francuskoj imalo je za cilj odrediti utjecaj različitih duhanskih preparata (konvencionalne cigarete, električne cigarete, THS) na koncentraciju salivarnih citokina, kemokina i faktora rasta. Koncentracije IL-6 u tom istraživanju slične su našim nalazima, odnosno nisu pokazivale statistički značajnu razliku između promatranih skupina. Također, rezultati istraživanja provedenog na 18 zdravih pušača i 31 zdravom nepušaču nisu pronašli statistički značajnu razliku u salivarnim koncentracijama IL-6, te sukladno našim nalazima najveći raspon salivarnih koncentracija prisutan je u skupini nepušača [94]. Nasuprot našim rezultatima i navedenim istraživanjima, Sheth i sur. [168] navode da dim cigarete povećava reaktivnost makrofaga i povećava lučenje IL-6, IL-1 β i TNF- α . Nadalje, istraživanje koje je uključivalo ispitanike s leukoplakijom, parodontitisom i zdravim kontrolnim ispitanicima navodi značajno više koncentracije IL-6 u slini pušača [169]. In vitro istraživanja na staničnim kulturama humanih bronhijalnih epitelnih stanica pokazale su snižene razine IL-1 β i IL-6 u usporedbi s kulturama izloženim konvencionalnim cigaretama, a povišene vrijednosti u usporedbi s kontrolnim kulturama [6, 12]. Također, slični rezultati dobiveni su i u in vitro istraživanjima provedenim na bukalnim i gingivnim kulturama [16, 17].

Koncentracija salivarnog TNF- α bila je najniža u skupini pušača THS-a, dok su se koncentracije u skupinama nepušača i pušača vrlo malo razlikovale. Također, nije pronađena statistički značajna razlika između promatranih skupina. Nasuprot našim rezultatima, istraživanje provedeno u Švedskoj na zdravim odraslim ispitanicima navodi povišene koncentracije TNF- α u slini pušača, dok ne pronalazi značajnu razliku u koncentracijama IL-1 β i IL-6 [170, 171]. Nasuprot ovim rezultatima, Suzuki i sur. [94] nisu pronašli značajnu razliku u koncentraciji promatranog citokina u slini pušača, ali ipak naglašavaju veće salivarne koncentracije TNF- α u pušača. Istraživanje provedeno na ispitanicima s patohistološki potvrđenom leukoplakijom

navodi da ne postoji značajna razlika u salivarnim razinama TNF- α u pušača i nepušača [95]. Istraživanje Faridoun i sur. [1] proučavalo je razine TNF- α kod skupine nepušača, skupine pušača električnih cigareta i pušača konvencionalnih cigareta te nije pronašlo značajne razlike između pušačkih skupina što potencijalno upućuje da izostanak sagorijevanja i pirolize nema značajni učinak na koncentracije ovog proupalnog citokina. Istraživanje Ziebe i sur. [19] promatralo je učinak THS-a na salivarnu koncentraciju TNF- α i djelomično je u skladu s našim rezultatima gdje pušači THS-a imaju nižu koncentraciju u usporedbi s nepušačima, ali bez značajne razlike.

Koncentracija salivarnog IL-1 β u svim uzorcima je bila niska. Iako nije pronađena statistički značajna razlika, pušači konvencionalnih cigareta imali su najviše koncentracije u usporedbi s nepušačima i THS pušačima. Slični rezultati opisani su u presječnom istraživanju provedenom na mladim ispitanicima s parodontitisom gdje se pokazalo da pušači s parodontitisom imaju značajno veću koncentraciju u usporedbi s nepušačima. Također, u skladu s našim rezultatima, zdravi pušači su imali više koncentracije promatranog citokina, ali bez statističke značajnosti [172]. Nasuprot našim rezultatima su rezultati istraživanja provedenog na 154 muškarca gdje se pokazalo da su razine IL-1 β i IL-6 značajno više među pušačima cigareta i vodenih lula nego kod pušača električnih cigareta i nepušača [90]. U skladu s našim rezultatima, istraživanje koje je proučavalo učinak THS-a na salivarne koncentracije IL-1 β , također, ne navodi značajnu razliku između pušača THS-a, pušača konvencionalnih cigareta i nepušača [19].

Koncentracija salivarnog IL-2 je, također, u većini uzoraka bila niska, te nije pokazivala značajnu razliku između promatranih skupina. Ipak, kada se analiziraju koncentracije može se uočiti najviši raspon koncentracija u skupini nepušača, a najniži u skupini pušača konvencionalnih cigareta. IL-2 nije do sada ekstenzivno proučavan u zdravih pušača, a rezultati provedenih istraživanja sugeriraju povišene vrijednosti u slini pušača [88]. Također, povišene salivarne koncentracije opisali su Rodríguez-Rabassa i sur. [87], a kada to presječno istraživanje usporedimo s našim možemo uočiti veći udio teških pušača (dnevna konzumacija 20 ili više cigareta) i dobno stariji uzorak. Utjecaj novih duhanskih preparata na salivarne koncentracije IL-2 prema našim saznanjima do sada nije proučavan.

Jedina statistički značajna razlika pronađena je u salivarnim koncentracijama 8-OHdG-a gdje su najviše koncentracije i najveći raspon pronađeni kod skupine nepušača. 8-OHdG je biomarker oksidativnog stresa koji je do sada proučavan u urinu gdje su nasuprot našim saznanjima dokazane povišene vrijednosti u starijih ispitanika, pušača i pri čestoj konzumaciji alkoholnih pića [98, 99]. Istraživanje provedeno u Japanu proučavalo je učinak životnih navika

na koncentraciju sličnog salivarnog biomarkera oksidativnog oštećenja DNK, a suprotno našim rezultatima navodi povećanje koncentracije 8-OHdGu-a u starijih ispitanika, pušača, osoba oboljelih od arterijske hipertenzije i osoba s povećanim udjelom visceralne masti. Također, u istraživanju se navodi da povišene salivarne koncentracije promatranog biomarkera u skupini pušača su proporcionalne BI, te su značajno povišene u skupini ispitanika s BI većim od 400 [98]. S obzirom na to da su u našem istraživanju uključeni većinom mlađi, zdravi pušači koji imaju niži BI može se objasniti izostanak većih salivarnih koncentracija u skupinama pušača. U randomiziranom kliničkom istraživanju koje je uključivalo ispitanike s parodontitisom, pušače i kontrolnu skupinu potvrdile su se povišene vrijednosti u slini pušača, pušača s parodontitisom i ispitanika s parodontitisom te navedene činjenice sugeriraju da cigaretni dim ima veliku količinu kisikovih radikala koji bi potencijalno mogli uzrokovati visoke koncentracije salivarnog biomarkera [173]. Nadalje, istraživanje koje je proučavalo salivarne koncentracije 8-OHdG-a u ispitanika s oralnim karcinomom i oralnom submukoznom fibrozom navodi pozitivnu korelaciju između intenziteta pušenja i navedenog biomarkera [174]. Istraživanje Feng i sur. [175] ne pronalazi povezanost urinarnog 8-OHdG-a i pušenja konvencionalnih cigareta, dok pregledom literature nisu pronađeni radovi koji proučavaju utjecaj novih alternativnih sustava na koncentraciju spomenutog biomarkera oksidativnog oštećenja.

5.9. Utjecaj pušenja na psihološke simptome i njihova povezanost sa salivarnim biomarkerima upale i oksidativnog stresa

Mnogobrojna istraživanja opisuju povezanost pušenja i psiholoških simptoma stresa, anksioznosti i depresivnosti [100]. U literaturi se navodi uzročno-posljedična veza, gdje pušenje može olakšavati ili pogoršavati psihološke simptome, ili psihološki distress može biti okidač početka pušenja. Mjerenje simptoma stresa, depresivnosti i anksioznosti provodi se različitim dijagnostičkim testovima s različitim graničnim vrijednostima i različitim kategorizacijama određenih psiholoških simptoma što se i navodi kao jedan od glavnih uzroka oprečnih saznanja o ovoj povezanosti. U našem istraživanju veličina uzroka je bila mala i većina regrutiranih kontrolnih ispitanika su bili su studenti, što djelomično može objasniti činjenicu povišenih razina percipiranog stresa, depresivnosti i anksioznosti u skupini nepušača. U našem istraživanju koristili smo jedan upitnik za procjenu depresivnosti, anksioznosti i stresa, te dodatni upitnik za procjenu percipiranog stresa. U LJPS pušači konvencionalnih cigareta

značajno niže percipiraju stres pri svakodnevnim situacijama, a najveći udio ispitanika u svim promatranim skupinama percipira i kategorizira stres u skupinu umjerena razina stresa. Nasuprot našim saznanjima, rezultati opisani u presječnom istraživanju u Danskoj navode da iako ne postoji značajna razlika u percipiranom stresu izmjenom LJPS, pušači imaju tendenciju viših razina stresa te su navedene razine proporcionalne intenzitetu pušenja [176]. Nadalje, veliko presječno istraživanje navodi povećane razine percipiranog stresa u dugogodišnjih i teških pušača što je oprečno našem uzorku gdje većina pušača spada u kategoriju blagih do umjerenih pušača [177]. Analizom DASS upitnika niti u jednoj subskali nisu pronađene značajne razlike. Kada se promatraju vrijednosti i rasponi može se uočiti da kod subskale stresa i subskale depresivnosti najviše vrijednosti i rasponi postignuti u skupini pušača THS-a, a najniže u skupini pušača konvencionalnih cigareta. U subskali anksioznosti najveće vrijednosti prisutne su u skupini nepušača, niže u skupini pušača konvencionalnih cigareta, a najniže u skupini pušača THS-a. U skupinama pušača konvencionalnih cigareta snižene su vrijednosti stresa, depresivnosti i anksioznosti što se potencijalno može objasniti činjenicom da kod novih pušača ili pušača s kraćim pušačkim stažem, pušenje predstavlja način kompenzacije i svojevrsnu pomoć u olakšanju simptoma [100]. Nadalje, kod mlađih pušača pušenje djeluje na receptore u mozgu te u početnim stadijima pušenja je pojačano lučenje dopamina koji smanjuje utjecaj proučavanih simptoma te vodi relaksaciji [101]. Colgan i sur. [178] su koristili također DASS upitnik, a njihovim rezultatima sugeriraju da iako ne postoji značajna razlika u pojedinačnim skali između pušača i nepušača, ipak su ukupni zbrojevi za depresivnost, anksioznost i stres viši u skupinama pušača. U literaturi nisu pronađeni radovi koji proučavaju utjecaj psiholoških simptoma depresivnosti i anksioznosti u pušača THS-a, dok su nasuprot našim rezultatima pronađene snižene razine percipiranog stresa u pušača THS-a [179].

Suzuki i sur. [94] u istraživanju su proučavali povezanost pušenja, salivarnih biomarkera i raspoloženja. Njihovo istraživanje temeljilo se na spoznaji da pušenje uzrokuje kroničnu upalu koja je praćena povišenim koncentracijama proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α) koji mogu stimulirati hipotalamo-hipofizno-adrenalnu (HPA) os. HPA os je jedan od glavnih odgovora na stres u ljudskom tijelu i praćen je povećanim lučenjem kortizola i samopercipiranog stresa. Autori su u svojoj analizi koristili upitnik *Profile of Mood States* koji mjeri pet odrednica raspoloženja, a to su napetost, depresivnost, umor, ljutnju i zbunjenost. Ljutnja i umor su jedine dvije odrednice koje su bile povezane s pušenjem konvencionalnih cigareta, a koncentracije TNF- α negativno su korelirale s ljutnjom [94]. U našem istraživanju nije dokazana povezanost između salivarnih citokina i biomarkera oksidativnog stresa sa simptomima stresa,

depresivnosti i anksioznosti u skupinama pušača, ali je u skupini nepušača dokazana negativna povezanost salivarnog IL-6 i simptoma depresivnosti te negativna povezanost salivarnog TNF- α i simptoma stresa izmjerenog s LJPS-a. U svom radu Ting i sur. [180] opisuju povezanost IL-6 s depresivnim simptomima i stresom, pri čemu navode oprečnost rezultata, odnosno opisuju normalne ili povišene vrijednosti u usporedbi sa skupinom nepušača. Također, nasuprot našim rezultatima, u istraživanju Kumaragu i sur. [181] salivarne koncentracije TNF- α pozitivno su korelirale s percipiranim stresom koji je izmjeren inačicom LJPS-a. Nasuprot našim rezultatima su i rezultati istraživanja Black i sur. [182] gdje depresivni simptomi mogu uzrokovati oksidativno oštećenje DNK te povisiti koncentracije oksidativnih biomarkera, te također navode slabu pozitivnu korelaciju između depresije i urinarne, plazmatske i serumske koncentracije 8-OHdG-a. Shimanoe i sur. [183] u svojem istraživanju opisuju pozitivnu korelaciju između LJPS-a i urinarnog 8-OHdG-a, ali bez njihove značajne povezanosti s pušenjem.

6. ZAKLJUČCI

Konvencionalne cigarete i THS proizvodi imaju značajan utjecaj na samoreportirane simptome, količinu nestimulirane sline, prisutnost neugodnog zadaha, osjet mirisa i okusa, biomarker oksidativnog stresa i psihološki simptom stresa izmjeren LJPS-a.

Samoreportirani simptomi i vidljive promjene oralne sluznice značajnije su više prisutne u skupinama pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a. Samoreportirani simptomi pečenja oralne sluznice i samoreportirano oslabljenje osjeta okusa značajnije su prisutni kod pušača THS-a u usporedbi s pušačima konvencionalnih cigareta.

Metodom pljuvanja ustanovila se smanjena količina sline i povećani udio hipofunkcije u obje skupine pušača, ali bez značajne razlike između THS pušača i pušača konvencionalnih cigareta.

Organoleptičkom metodom ustanovljena je prisutnost neugodnog zadaha u skupinama pušača, pri čemu je neugodni zadah jačeg intenziteta u pušača konvencionalnih cigareta nego u pušača THS-a.

Objektivnim testovima dokazano je da su olfaktorna i gustatorna funkcija značajno više narušene u skupinama pušača, a neovisne su o tipu duhanskih preparata. Osjet mirisa više je narušen u skupini pušača konvencionalnih cigareta, dok je okusna funkcija značajno smanjena u obje skupine pušača, osobito u percepciji slanog, gorkog i kiselog okusa. Zajednički prediktor mirisne i okusne disfunkcije je intenzitet pušenja.

Salivarne vrijednosti biomarkera oksidativnog stres (8-OHdG) značajno su se razlikovale između promatranih skupina gdje su nepušači imali više koncentracije u usporedbi s THS pušačima i pušačima konvencionalnih cigareta.

LJPS-a ustanovljena je niža razina psihološkog stresa u skupini pušača konvencionalnih cigareta. Pušači konvencionalnih cigareta postižu niže vrijednosti na ljestvici od nepušača i pušača THS-a. Nije bilo povezanosti između salivarnih biomarkera oksidativnog stresa i psiholoških simptoma izmjerenih LJPS-a i DASS-a.

7. LITERATURA

1. Faridoun A, Sultan AS, Jabra-Rizk MA, Weikel D, Varlotta S, Meiller TF. Salivary biomarker profiles in E-cigarette users and conventional smokers: a cross-sectional study. *Oral Dis* 2021;27:277-9.
2. Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:613–28.
3. World Health Organisation. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025, third edition. Geneva: World Health Organization; 2019.
4. Markelić M, Muslić Lj, Jovičić Burić D, Lanščak N, Križan H, Musić Milanović S. Europsko istraživanje o pušenju, pijenju alkohola i uzimanju droga među učenicima 2019. *Sredstva ovisnosti* 2021;1:19-21.
5. Ruprecht AA , Marco CD, Saffari A i sur. Environmental pollution and emission factors of electronic cigarettes, heat-not-burn tobacco products, and conventional cigarettes. *Aerosol Sci Tech* 2017;51:674–84.
6. Leigh NJ, Lawton RI, Hershberger PA i sur. Flavourings significantly affect inhalation toxicity of aerosol generated from electronic nicotine delivery systems (ENDS). *Tob Control* 2016;25:81–7.
7. Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE i sur. Interleukin-1 β causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:311–8.
8. Kopa PN, Pawliczak R. IQOS - a heat-not-burn (HnB) tobacco product - chemical composition and possible impact on oxidative stress and inflammatory response. A systematic review. *Toxicol Mech Methods* 2020;30:81-7.
9. Eaton D, Jakaj B, Forster M i sur. Assessment of tobacco heating product THP1.0. part 2: Product design, operation and thermophysical characterisation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018;93:4–13.
10. Bekki K, Inaba Y, Uchiyama S, Kunugita N. Comparison of chemicals in mainstream smoke in heat-not-burn tobacco and combustion cigarettes. *J UOEH* 2017;39:201-7.
11. Li X, Luo Y, Jiang X i sur. Chemical analysis and simulated pyrolysis of tobacco heating system 2.2 compared to conventional cigarettes. *Nicotine Tob Res* 2019;21:111-8.
12. Sohal SS, Eapen MS, Naidu VGM, Sharma P. IQOS exposure impairs human airway cell homeostasis: direct comparison with traditional cigarette and e-cigarette. *ERJ*

Open Res 2019;5:00159-2018.

13. Kaur G, Muthumalage T, Rahman I. Mechanisms of toxicity and biomarkers of flavoring and flavor enhancing chemicals in emerging tobacco and non-tobacco products. *Toxicol Lett* 2018;288:143-55.
14. Gallus S, Lugo A, Liu X i sur. Use and awareness of heated tobacco products in Europe. *J Epidemiol* 2022;32:139-44.
15. Kinjo A, Kuwabara Y, Fujii M, Imamoto A i sur. Heated tobacco product smokers in Japan identified by a population-based survey. *J Epidemiol* 2020;30:547-55.
16. Zanetti F, Titz B, Sewer A i sur. Comparative systems toxicology analysis of cigarette smoke and aerosol from a candidate modified risk tobacco product in organotypic human gingival epithelial cultures: a 3-day repeated exposure study. *Food Chem Toxicol* 2017;101:15–35.
17. Zanetti F, Sewer A, Mathis C i sur. Systems toxicology assessment of the biological impact of a candidate modified risk tobacco product on human organotypic oral epithelial cultures. *Chem Res Toxicol* 2016;29:1252–69.
18. Mori Y, Tanaka M, Kozai H i sur. Effects of heat-not-burn cigarette smoking on the secretion of saliva and its innate immune system components. *Healthcare (Basel)* 2022;11:132.
19. Zięba S, Maciejczyk M, Antonowicz B i sur. Comparison of smoking traditional, heat not burn and electronic cigarettes on salivary cytokine, chemokine and growth factor profile in healthy young adults-pilot study. *Front Physiol* 2024;15:1404944.
20. Gabhane MH, Hemagiriappa MS, Sharma VJ, Pardeshi KV, Rai BA, Nahar P. Clinicopathological evaluation of tobacco-related oral mucosal lesions. *J Contemp Dent Pract* 2022;23:399-404.
21. Nosratzahi T. Salivary chemical factors in relation with oral cancer in smokers and non-smokers: a literature review. *J Dent (Shiraz)* 2017;18:237-43.
22. Taybos G. Oral changes associated with tobacco use. *Am J Med Sci* 2003;326:179-82.
23. Michalak E, Halko-Gąsior A, Chomyszyn-Gajewska M. The impact of tobacco on oral health-based on literature. *Przegl Lek* 2016;73:516-9.
24. Ramasamy J, Sivapathasundharam B. A study on oral mucosal changes among tobacco users. *J Oral Maxillofac Pathol* 2021;25:470-7.
25. Noor SS. Tobacco associated malignant and non-malignant lesions of the oral cavity. *Research J Pharm And Tech* 2015;8:1063-7.

26. Sadri G, Mahjub H. Tobacco smoking and oral cancer: a meta-analysis. *J Res Health Sci* 2007;7:18–23.
27. Kumari P, Debta P, Dixit A. Oral potentially malignant disorders: etiology, pathogenesis, and transformation into oral cancer. *Front Pharmacol* 2022;13:825266.
28. Patel U, Shah R, Patel A, Shah S, Patel D, Patel A. Effect of tobacco in human oral leukoplakia: a cytomorphometric analysis. *Med Pharm Rep* 2020;93:273-9.
29. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006;42:987-93.
30. Villa A, Celentano A, Glurich I i sur. World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia: a systematic review of longitudinal studies. *Oral Dis* 2019;25:64-78.
31. Kusiak A, Maj A, Cichońska D, Kochańska B, Cydejko A, Świetlik D. The Analysis of the frequency of leukoplakia in reference of tobacco smoking among northern Polish population. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:6919.
32. Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol* 2012; 8:1407–25.
33. Müller S. Up date from the 4th edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the oral cavity and mobile tongue. *Head Neck Pathol* 2017;11:33–40.
34. Leite FRM, Nascimento GG, Scheutz F, López R. Effect of smoking on periodontitis: A systematic review and meta-regression. *Am J Prev Med* 2018;54:831–41.
35. Ting M, Craig J, Balkin BE, Suzuki JB. Peri-implantitis: A comprehensive overview of systematic reviews. *J Oral Implantol* 2018;44:225–47.
36. Benedetti G, Campus G, Strohmenger L, Lingström P. Tobacco and dental caries: a systematic review. *Acta Odontol Scand* 2013;71:363–71.
37. Petrušić N, Posavac M, Sabol I, Mravak-Stipetić M. The effect of tobacco smoking on salivation. *Acta Stomatol Croat* 2015;49:309–15.
38. Yordanova M, Shopov N. The effect of smoking on salivary parameters. *J Family Med Prim Care Open Acc* 2019;3:134.
39. Khan GJ, Muhammad J, Muhammad I. Effect of smoking on salivary flow rate. *Gomal J Med Sci* 2010;8:221–4.

40. Iida T, Ono K, Inagaki T, Hosokawa R, Inenaga K. Nicotinic receptor agonist-induced salivation and its cellular mechanism in parotid acini of rats. *Auton Neurosci* 2011;161:81–6.
41. Da Ré AF, Gurgel LG, Buffon G, Moura WER, Marques Vidor DCG, Maahs MAP. Tobacco influence on taste and smell: systematic review of the literature. *Int Arch Otorhinolaryngol* 2018;22:81-7.
42. Rad M, Kakoie S, Niliye Brojeni F, Pourdamghan N. Effect of long-term smoking on whole mouth salivary flow rate and oral health. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2010;4:110–4.
43. Saputri D, Abdillah N, Mutiara S, Basri G. The correlation between pH and flow rate of salivary smokers related to nicotine levels labelled on cigarettes. *Dent J* 2017;50:61-5.
44. Zięba S, Zalewska A, Żukowski P, Maciejczyk M. Can smoking alter salivary homeostasis? A systematic review on the effects of traditional and electronic cigarettes on qualitative and quantitative saliva parameters. *Dent Med Probl* 2024;61:129-44.
45. Fattahi Bafghi A, Goljanian Tabrizi A, Bakhshayi P. The effect of smoking on mineral and protein composition of saliva. *Iran J Otorhinolaryngol* 2015;27:301-5.
46. Akram Z, Al-Kheraif AA, Kellesarian SV, Vohra F, Javed F. Comparison of oral *Candida* carriage in water pipe smokers, cigarette smokers, and non-smokers. *J Oral Sci* 2018;60:115-20.
47. Vila T, Sultan AS, Montelengo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *J Fungi* 2020;6:15.
48. El-Sakhawy MA, M Donia AER, Kobisi ANA i sur. Oral candidiasis of tobacco smokers: A literature review. *Pak J Biol Sci* 2023;26:1-14.
49. Keten HS, Keten D, Ucer H, Yildirim F, Hakkoymaz H, Isik O. Prevalence of oral *Candida* carriage and *Candida* species among cigarette and maras powder users. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:9847-54.
50. Soysa NS, Ellepola AN. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral Dis* 2005;11:268-73.
51. Ye P, Chen W, Huang F i sur. Smoking increases oral mucosa susceptibility to *Candida albicans* infection via the Nrf2 pathway: In vitro and animal studies. *J Cell Mol Med* 2021;25:7948-60.
52. Kauss AR, Antunes M, Zanetti F i sur. Influence of tobacco smoking on the development of halitosis. *Toxicol Rep* 2022;9:316-22.

53. Gavazova G, Pechalova P. The effect of mouthwash containing chlorhexidine digluconate 0.2% on halitosis in smokers and non-smokers. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2019;13:31–5.
54. Lisecka IS, Rozhko MM. The problem of the origin and prevalence of halitosis in teenagers and young adults who smoke. *Wiad Lek* 2021;4:39-43.
55. Ogba OA, Olorode M, Mbah M. Effect of tobacco smoking on oral microbial flora and the relationship with oral health in Calabar, Nigeria. *IJBLS* 2017;6:1–5.
56. Senaratne NLM, Yung On C, Shetty NY, Gopinath D. Effect of different forms of tobacco on the oral microbiome in healthy adults: a systematic review. *Front Oral Health* 2024;5:1310334.
57. Ilankizhai RJ, Leelavathi L. Comparison of oral microbiota among smokers and non-smokers - a pilot study. *Drug Invention Today* 2018;10:2669-73.
58. Xu X, Zhao Y, Gu D, Pei Y, Wu B. Health behaviors and self-reported oral health among centenarians in Nanjing, China: a cross-sectional study. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:7285.
59. Ajmani GS, Suh HH, Wroblewski KE, Pinto JM. Smoking and olfactory dysfunction: a systematic literature review and meta-analysis. *Laryngoscope* 2017;127:1753-61.
60. Katotomichelakis M, Balatsouras D, Tripsianis G i sur. The effect of smoking on the olfactory function. *Rhinology* 2007;45:273-80.
61. Vennemann MM, Hummel T, Berger K. The association between smoking and smell and taste impairment in the general population. *J Neurol* 2008;255:1121-6.
62. Matullionis DH. Ultrastructure of olfactory epithelia in mice after smoke exposure. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1974;83:192-201.
63. Kern RC, Conley DB, Haines GK, Robinson AM. Pathology of the olfactory mucosa: implications for the treatment of olfactory dysfunction. *Laryngoscope* 2004;114:279-85.
64. Ahlström R, Berglund B, Berglund U, Engen T, Lindvall T. A comparison of odor perception in smokers, nonsmokers, and passive smokers. *Am J Otolaryngol* 1987;8:1-6.
65. Schriever VA, Reither N, Gerber J, Iannilli E, Hummel T. Olfactory bulb volume in smokers. *Exp Brain Res* 2013;225:153–7.
66. Khan AM, Narayanan VS, Puttabuddi JH i sur. Comparison of taste threshold in smokers and non-smokers using electrogustometry and fungiform papillae count: a case control study. *J Clin Diagn Res* 2016;10:101–5.

67. Pavlidis P, Gouveris C, Kekes G, Maurer J. Changes in electrogustometry thresholds, tongue tip vascularization, density and form of the fungiform papillae in smokers. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014;271:2325–31.
68. Tomassini S, Cuoghi V, Catalani E, Casini G, Bigiani A. Long-term effects of nicotine on rat fungiform taste buds. *Neuroscience* 2007;147:803–10.
69. Matsuo R. Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:216-29.
70. Younes S. The impact of micronutrients on the sense of taste. *Hum Nutr Metab* 2023;35:200231.
71. Bigman G. Age-related smell and taste impairments and vitamin D associations in the U.S. adults national health and nutrition examination survey. *Nutrients* 2020;12:984.
72. Henkin RI, Hoetker JD. Deficient dietary intake of vitamin E in patients with taste and smell dysfunctions: is vitamin E a cofactor in taste bud and olfactory epithelium apoptosis and in stem cell maturation and development? *Nutrition* 2003;19:1013-21.
73. Simons CT, Boucher Y, Carstens MI, Carstens E. Nicotine suppression of gustatory responses of neurons in the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol* 2006;96:1877-86.
74. Qiu F, Liang CL, Liu H i sur. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: up and down or up side down? *Oncotarget* 2017;8:268-84.
75. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis* 2012;18:236-43.
76. Groer M, Murphy R, Bunnell W i sur. Salivary measures of stress and immunity in police officers engaged in simulated critical incident scenarios. *J Occup Environ Med* 2010;52:595-602.
77. Sjögren E, Leanderson P, Kristenson M, Ernerudh J. Interleukin-6 levels in relation to psychosocial factors: Studies on serum, saliva, and in vitro production by blood mononuclear cells. *Brain Behav Immun* 2006;20:270-8.
78. Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol* 2000 2009;50:52-64.
79. Šiško Markoš I, Franceschi M, Vidranski V i sur. The concentration of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in saliva and blood of patients with inactive multiple sclerosis and coexisting hashimoto's thyroiditis. *Acta Clin Croat* 2023;62:339-44.

80. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:S1-S13.
81. Perrier S, Kherratia B, Deschaumes C i sur. IL-1ra and IL-1 production in human oral mucosal epithelial cells in culture: differential modulation by TGF-beta1 and IL-4. *Clin Exp Immunol* 2002;127:53-9.
82. Miller CS, Foley JD, Bailey AL i sur. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med* 2010;4:171-89.
83. Slavish DC, Graham-Engeland JE, Smyth JM, Engeland CG. Salivary markers of inflammation in response to acute stress. *Brain behav Immun* 2015;44:253-69.
84. Val M, Sidoti Pinto GA, Manini L, Gandolfo S, Pentenero M. Variations of salivary concentration of cytokines and chemokines in presence of oral squamous cell carcinoma. A case-crossover longitudinal prospective study. *Cytokine* 2019;120:62-5.
85. Kalpana R, Thubashini M, Sundharam BS. Detection of salivary interleukin-2 in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Maxillofac Pathol* 2014;18:361-4.
86. Simcic D, Pezelj-Ribaric S, Grzic R, Horvat J, Brumini G, Muhvic-Urek M. Detection of salivary interleukin 2 and interleukin 6 in patients with burning mouth syndrome. *Mediators Inflamm* 2006;2006:54632.
87. Rodríguez-Rabassa M, López P, Rodríguez-Santiago RE i sur. Cigarette smoking modulation of saliva microbial composition and cytokine levels. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15:2479.
88. Rahimi S, Khosravi A, Aazami S. Effect of smoking on cyanide, IL-2 and IFN- γ levels in saliva of smokers and nonsmokers. *Pol Ann Med* 2018;25:203-6.
89. Kamal NM, Shams NS. The impact of tobacco smoking and electronic cigarette vaping on salivary biomarkers. A comparative study. *Saudi Dent J* 2022;34:404-9.
90. Mokeem SA, Alasqah MN, Michelogiannakis D, Al-Kheraif AA, Romanos GE, Javed F. Clinical and radiographic periodontal status and whole salivary cotinine, IL-1 β and IL-6 levels in cigarette- and waterpipe-smokers and E-cig users. *Environ Toxicol Pharmacol* 2018;61:38-43.
91. Kaval B, Renaud DE, Scott DA i sur. The role of smoking and gingival crevicular fluid markers on coronally advanced flap outcomes. *J Periodontol* 2014;85:395-405.
92. Kibayashi M, Tanaka M, Nishida N i sur. Longitudinal study of the association between smoking as a periodontitis risk and salivary biomarkers related to periodontitis. *J Periodontol* 2017;78:859–67.

93. Nishida N, Yamamoto Y, Tanaka i sur. Association between in voluntary smoking and salivary markers related to periodontitis: a 2-year longitudinal study. *J Periodontol* 2008;79:2233–40.
94. Suzuki N, Nakanishi K, Yoneda M, Hirofuji T, Hanioka T. Relationship between salivary stress biomarker levels and cigarette smoking in healthy young adults: an exploratory analysis. *Tob Induc Dis* 2016;14:20.
95. Brailo V, Vucićeović-Boras V, Cekić-Arambasin A, Alajbeg IZ, Milenović A, Lukac J. The significance of salivary interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncol* 2006;42:370-3.
96. Korkmaz K, Butuner B, Roggenbuck D. Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker. *J Lab Precis Med* 2018;3:95.
97. Irie M, Tamae K, Iwamoto-Tanaka N, Kasai H. Occupational and lifestyle factors and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci* 2005;96:600–6.
98. Watanabe S, Kawasaki Y, Kawai K. Salivary 8-hydroxyguanine as a lifestyle-related oxidative stress biomarker in workers. *J Clin Biochem Nutr* 2020;66:57–61.
99. Kawai K, Kasai H, Li YS i sur. Measurement of 8-hydroxyguanine as an oxidative stress biomarker in saliva by HPLC-ECD. *Genes Environ* 2018;40:5.
100. Fluharty M, Taylor AE, Grabski M, Munafò MR. The Association of cigarette smoking with depression and anxiety: a systematic review. *Nicotine Tob Res* 2017;19:3-13.
101. Taylor G, McNeill A, Girling A, Farley A, Lindson-Hawley N, Aveyard P. Change in mental health after smoking cessation: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2014;348:1151.
102. El-Sherbiny NA, Elsary AY. Smoking and nicotine dependence in relation to depression, anxiety, and stress in Egyptian adults: A cross-sectional study. *J Family Community Med* 2022;29:8-16.
103. Kaur D, Behl AB, Isher PP. Oral manifestations of stress-related disorders in the general population of Ludhiana. *J Indian Acad Oral Med Radiol.* 2016;28:262.
104. Vargas HO, Nunes SO, de Castro MR i sur. Oxidative stress and inflammatory markers are associated with depression and nicotine dependence. *Neurosci Lett* 2013;544:136-40.
105. Djuric Z, Bird CE, Furumoto-Dawson A i sur. Biomarkers of psychological stress in health disparities research. *Open Biomark J* 2008;1:7-19.

106. Hanioka T, Ojima M, Tanaka K, Aoyama H. Relationship between smoking status and tooth loss: findings from national databases in Japan. *J Epidemiol* 2007;17:125–32.
107. Brinkman GL, Coates EO Jr. The effect of bronchitis, smoking, and occupation on ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1963;87:684–93.
108. Lorensia A, Muntu CM, Suryadinata RV, Septiani R. Effect of lung function disorders and physical activity on smoking and non-smoking students. *J Prev Med Hyg* 2021;29;62:E89-E96.
109. Glazar I, Muhvic Urek M, Kuis D i sur. Salivary flow rate, oral yeast colonization and dental status in institutionalized and non-institutionalized elderly. *Acta Clin Croat* 2016;55:390–5.
110. Foglio-Bonda PL, Brilli K, Pattarino F, Foglio-Bonda A. Salivary flow rate and pH in patients with oral pathologies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21:369-74.
111. Olsen, I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol Scand* 1974;32:329–33.
112. Tooyama H, Matsumoto T, Hayashi K i sur. Candida concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs. *BMC Oral Health* 2015;15:150.
113. Dayma A, Jain M, Saxena V, Torwane N, Vishu V, Khare A. Validation of organoleptics and instrumental measurement for halitosis among patient with malodor. *J Dent Health Oral Disord Ther* 2020;11:6–10.
114. Agresti A. Categorical data analysis, 2nd edition. Hardcover: Wiley-Interscience; 2002.
115. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. New York: Routledge; 2013. str. 625.
116. Daniel WW, Cross CL. Biostatistics: A foundation for analysis in the health sciences – tenth edition. Las Vegas: Wiley-Interscience; 2002.
117. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. Statistical methods in medical research. Cornwell: Wiley; 200. str. 842.
118. Lang TA, Altman DG. Statističke analize i metode u objavljenoj literaturi: SAMPL smjernice (hrvatski prijevod). Bilten Hrvatskog društva za medicinsku informatiku [Internet]. 2024 [pristupljeno 23.09.2024.];30:52-61. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/316519>.

119. Capak K. Europska zdravstvena anketa u Hrvatskoj 2019. Osnovni pokazatelji. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2021.
120. Lavery AA, Vardavas CI, Filippidis FT. Prevalence and reasons for use of Heated Tobacco Products (HTP) in Europe: an analysis of Eurobarometer data in 28 countries. *Lancet Reg Health Eur* 2021;8:100159.
121. Yoshioka T, Tabuchi T. Combustible cigarettes, heated tobacco products, combined product use, and periodontal disease: A cross-sectional JASTIS study. *PLoS One* 2021;16:e0248989.
122. Myagmar-Ochir E, Kaneko M, Tomiyama K i sur. Occupational difference in use of heated tobacco products: a cross-sectional analysis of retail workers in Japan. *BMJ Open* 2021;11:e049395.
123. Sohrabi MR, Abbasi-Kangevari M, Kolahi AA. Current tobacco smoking prevalence among Iranian Population: a closer look at the STEPS surveys. *Front Public Health* 2020;8:571062.
124. Jamal A, King BA, Neff LJ, Whitmill J, Babb SD, Graffunder CM. Current cigarette smoking among adults—United States, 2005-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:1205-11.
125. Peters SAE, Huxley RR, Woodward M. Do smoking habits differ between women and men in contemporary Western populations? Evidence from half a million people in the UK Biobank study. *BMJ Open* 2014;4:e005663.
126. Şanlı A, Bekmez E, Yıldız G, Erdoğan BA, Yılmaz HB, Altın G. Relationship between smoking and otorhinolaryngological symptoms. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 2016;26:28-33.
127. Bin Hamdan RH, AlAmri WR, Aldosari MA. Tobacco products and sensory health: An assessment of taste and smell disorders using 2021 NHIS data. *Tob Induc Dis* 2024;8;22.
128. King JL, Reboussin BA, Wiseman KD i sur. Adverse symptoms users attribute to e-cigarettes: results from a national survey of US adults. *Drug Alcohol Depend* 2019;196:9-13.
129. Patil PB, Bathi R, Chaudhari S. Prevalence of oral mucosal lesions in dental patients with tobacco smoking, chewing, and mixed habits: a cross-sectional study in South India. *J Family Community Med* 2013;20:130-5.
130. Koothati RK, Raju DR, Krishna Prasad CL, Sujanamulk B, Srivastava A, Maloth KN. Prevalence of tobacco associated oral mucosal lesions in the population of

- Mahabubnagar District of Telangana State: a cross-sectional study. *J Indian Acad Oral Med Radiol* 2020;32:149-5.
131. Kumar Kalidoss V, Singh Bakshi S. COVID-19 and smoking: an association requiring urgent attention. *J Smok Cessat* 2020;15:223.
 132. Patel P, Patel V. Oral mucosal lesions among residence of a town in North Gujarat. *Natl J Med Res* 2011;1:3–6.
 133. Shoorgashti R, Moshiri A, Lesan S. Evaluation of oral mucosal lesions in Iranian smokers and non-smokers. *Niger J Clin Pract* 2024;27:467-74.
 134. Suzuki N, Nakano Y, Yoneda M, Hirofuji T, Hanioka T. The effects of cigarette smoking on the salivary and tongue microbiome. *Clin Exp Dent Res* 2022;8:449–56.
 135. Kato T, Mizutani S, Takiuchi H, Sugiyama S, Hanioka T, Naito T. Gingival pigmentation affected by smoking among different age groups: a quantitative analysis of gingival pigmentation using clinical oral photographs. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14:880.
 136. Alaei A, Azizi A, Valaei N i sur. The correlation between cigarette smoking and salivary flow rate. *J Res Dent Maxillofac Sci* 2017;2:5–9.
 137. Chakrabarty S, Patil S, Bandalore SRH i sur. A comparative study of long-term effect of tobacco on resting whole mouth salivary flow rate and pH. *J Indian Acad Oral Med Radiol* 2015;27:549–52.
 138. Kusumaningrum DM, Tjahajawati S, Rizali E. Differences of young adult smokers and non-smokers saliva reviewed by salivary pH, viscosity, and volume. *Padjadjaran J Dent* 2019;31:142-6.
 139. Maryam R, Shahla K, Fateme NB i sur. Effect of long-term smoking on whole-mouth salivary flow rate and oral health. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2010;4:110–14.
 140. Bachtiar EW, Putri AC, Bachtiar BM. Salivary nitric oxide, Simplified Oral Hygiene Index, and salivary flow rate in smokers and non-smokers: a cross-sectional study. *F1000Res* 2019;8:1744.
 141. Fenoll-Palomares C, Muñoz-Montagud JV, Sanchiz V i sur. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev Esp Enferm Dig* 2004;96:773–83.
 142. Proctor GB, Carpenter GH. Salivary secretion: mechanism and neural regulation. *Monogr Oral Sci* 2014;24:14-29.

143. Singh M, Ingle NA, Kaur N, Yadav P, Ingle E. Effect of long-term smoking on salivary flow rate and salivary pH. *J Indian Assoc of Public Health Dent* 2015;13:11-3.
144. Rath E, Haller D. Intestinal epithelial cell metabolism at the interface of microbial dysbiosis and tissue injury. *Mucosal Immunol* 2022;15:595-604.
145. de Azevedo Izidoro AC, Semprebom AM, Baboni FB i sur. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. *Arch Oral Biol* 2012;57:148-53.
146. Muzurović S, Hukić M, Babajić E, Smajić R. The relationship between cigarette smoking and oral colonization with *Candida* species in healthy adult subjects. *Med Glas (Zenica)* 2013;10:397-9.
147. El-Sakhawy MA, El-Sehrawy MG, Waggiallah HA, Ibrahim AM, Ateya AAE. Appraisal and characterization of candida load isolated from the oral cavity of smokers. *Saudi J Biol Sci* 2023;30:103657.
148. Al-Ansari JM, Boodai H, Al-Sumait N, Al-Khabbaz AK, Al-Shammari KF, Salako N. Factors associated with self-reported halitosis in Kuwaiti patients. *J Dent* 2006;34:444–9.
149. Iwanicka-Grzegorek E, Michalik J, Kepa J, Wierzbicka M, Aleksinski M, Pierzynowska E. Subjective patients' opinion and evaluation of halitosis using halimeter and organoleptic scores. *Oral Dis* 2005;11:86–8.
150. Saadaldina SA, Eldwakhly E, Alnazzawi AA i sur. Awareness and practice of oral health measures in Medina, Saudi Arabia: an observational study. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:9112.
151. Struch F, Schwahn C, Wallaschofski i sur. Self-reported halitosis and gastro-esophageal reflux disease in the general population. *J Gen Intern Med* 2008;23:260–6.
152. Mesquita-Guimarães K, Santin G, Scatena C, Junior AL, Serra MC. Reproducibility of an organoleptic method for halitosis assessment. *Eur J Gen Dent* 2017;6:9-13.
153. Ayo-Yusuf OA, Postma TC, van Wyk C. Clinical correlates of oral malodour in a population of patients attending a preventive clinic in Pretoria, South Africa. *SADJ* 2011;66:226–31.
154. Romano F, Perotto S, Bianco L, Parducci F, Mariani GM, Aimetti M. Self-perception of periodontal health and associated factors: a cross-sectional population-based study. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:2758.

155. Csikar J, Kang J, Wyborn C, Dyer TA, Marshman Z, Godson J. The self-reported oral health status and dental attendance of smokers and non-smokers in England. *PLoS One* 2016;11:e0148700.
156. Kameyama A, Ishii K, Tomita S i sur. Correlations between perceived oral malodor levels and self-reported oral complaints. *Int J Dent* 2015;2015:343527.
157. Jiun IL, Siddik SN, Malik SN, Tin-Oo MM, Alam MK, Khan MM. Association between oral hygiene status and halitosis among smokers and nonsmokers. *Oral Health Prev Dent* 2015;13:395-405.
158. Zanetti F, Zivkovic Semren T, Battey JND i sur. A literature review and framework proposal for halitosis assessment in cigarette smokers and alternative nicotine-delivery products users. *Front Oral Health* 2021;2:777442.
159. Gudziol H, Graul J, Bitter T, Guntinas-Lichius O. Ability of smelling is reduced reversibly by acute smoking and permanently by chronic smoking. *Laryngorhinootologie*. 2013;92:663-6.
160. Brämerson A, Johansson L, Ek L, Nordin S, Bende M. Prevalence of olfactory dysfunction: the skövde population-based study. *Laryngoscope* 2004;114:733-7.
161. Larsen BA, Litt MD, Huedo-Medina TB, Duffy VB. Modeling associations between chemosensation, liking for fats and sweets, dietary behaviors and body mass index in chronic smokers. *Nutrients* 2019;11:271.
162. Chéruef F, Jarlier M, Sancho-Garnier H. Effect of cigarette smoke on gustatory sensitivity, evaluation of the deficit and of the recovery time-course after smoking cessation. *Tob Induc Dis* 2017;15:15.
163. Berube L, Duffy VB, Hayes JE, Hoffman HJ, Rawal S. Associations between chronic cigarette smoking and taste function: results from the 2013-2014 national health and nutrition examination survey. *Physiol Behav* 2021;240:113554.
164. Oncken C, Feinn R, Covault J i sur. Genetic vulnerability to menthol cigarette preference in women. *Nicotine Tob Res* 2015;17:1416-20.
165. Duffy VB, Glennon SG, Larsen BA, Rawal S, Oncken C, Litt MD. Heightened olfactory dysfunction and oral irritation among chronic smokers and heightened propylthiouracil (PROP) bitterness among menthol smokers. *Physiol Behav* 2019;201:111-22.
166. Pepino MY, Mennella JA. Effects of cigarette smoking and family history of alcoholism on sweet taste perception and food cravings in women. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:1891-9.

167. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Miller L, Ho V, Ondrey F. The feasibility of monitoring NF-kappaB associated cytokines: TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6, and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. *Mol Carcinog* 2005;44:77-82.
168. Sheth CC, López-Pedrajas RM, Del Mar Jovani-Sancho M, González-Martínez R, Veses V. Modulation of salivary cytokines in response to alcohol, tobacco and caffeine consumption: a pilot study. *Sci Rep* 2018;8:16687.
169. Sharma M, Bairy I, Pai K i sur. Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. *Clin Oral Investig* 2011;15:705-14.
170. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B i sur. Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. *J Clin Periodontol* 2013;40:140-7.
171. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B i sur. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. *PLoS One* 2013;8:e61356.
172. Gursoy UK, Könönen E, Uitto VJ i sur. Salivary interleukin-1 β concentration and the presence of multiple pathogens in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;36:922–7.
173. Varghese J, Bhat V, Chianeh YR, Kamath V, Al-Haj Husain N, Özcan M. Salivary 8-hydroxyguanosine levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *Odontology* 2020;108:569-77.
174. Nandakumar A, Nataraj P, James A, Krishnan R, K MM. Estimation of salivary 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) as a potential biomarker in assessing progression towards malignancy: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2020;21:2325-9.
175. Feng S, Roethig HJ, Liang Q i sur. Evaluation of urinary 1-hydroxypyrene, S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, 3-methyladenine, 3-ethyladenine, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and thioethers as biomarkers of exposure to cigarette smoke. *Biomarkers* 2006;11:28–52.
176. Buhelt LP, Pisinger C, Andreassen AH. Smoking and stress in the general population in Denmark. *Tob Prev Cessat* 2021;7:27.
177. Stubbs B, Veronese N, Vancampfort D i sur. Perceived stress and smoking across 41 countries: a global perspective across Europe, Africa, Asia and the Americas. *Sci Rep* 2017;7:7597.

178. Colgan Y, Turnbull DA, Mikocka-Walus AA i sur. Determinants of resilience to cigarette smoking among young Australians at risk: an exploratory study. *Tob Induced Dis* 2010;8:7.
179. Lee A, Lee KS, Park H. Association of the use of a Heated Tobacco Product with perceived stress, physical activity, and internet use in Korean adolescents: a 2018 national survey. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16:965.
180. Ting EY, Yang AC, Tsai SJ. Role of interleukin-6 in depressive disorder. *Int J Mol Sci* 2020;21:2194.
181. Kumaraguru M, Chellappa LR, I MA, Jayaraman S. Association between perceived stress and salivary biomarkers of allostatic load among gender minorities in Chennai: an observational cross-sectional study. *Cureus* 2023;15:e46065.
182. Black CN, Bot M, Scheffer PG, Cuijpers P, Penninx BW. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 2015;51:164-75.
183. Shimanoe C, Hara M, Nishida Y i sur. Perceived stress, depressive symptoms, and oxidative DNA damage. *Psychosom Med* 2018;80:28-33.

Popis slika

Slika 1. Usporedba intenziteta halitoze po Rosenbergu između nepušača, THS pušača i pušača konvencionalnih cigareta

Slika 2. Usporedba mirisne i okusne funkcije između nepušača, THS pušača i pušača konvencionalnih cigareta. Horizontalne linije povezuju skupine koje se značajno razlikuju.

Popis tablica

Tablica 1. Raspodjela ispitanika prema spolu u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 2. Razlike u dobi ispitanika u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 3. Razina obrazovanja ispitanika u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 4. Razlike u pušačkom stažu i dnevnoj konzumaciji cigareta u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 5. Ispitanici prema kategoriziranom pušačkom stažu i broju popušanih cigareta na dan u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 6. Razlike u Brinkman indeksu u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 7. Kategorizacija Brinkman indeksa između skupina pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 8. Ispitanici prema samoreportiranim simptomima i promjenama u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 9. Ispitanici prema samoreportiranim promjenama okusa, mirisa i trajanju samoreportiranih simptoma u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 10. Raspodjela ispitanika prema samoreportiranom osjećaju pečenja i žarenja u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 11. Raspodjela ispitanika prema intenzitetu, frekvenciji i lokalizaciji pečenja, te povezanost pečenja s podražajem, hranom ili pićem u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 12. Intenzitet pečenja u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 13. Ispitanici prema samoreportiranoj hipogeuziji u odnosu na skupine pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 14. Karakteristike ispitanika iz skupine THS-a i samoreportirani simptomi nakon početka konzumacije THS-a (n= 30)

Tablica 15. Morfološke promjene oralne sluznice u skupini nepušača, skupini pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 16. Lokalizacija morfoloških promjena oralne sluznice u skupini nepušača, skupini pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 17. Učestalost i razlika morfoloških promjena oralne sluznice u skupini nepušača, skupini pušača konvencionalnih cigareta i skupini pušača THS-a

Tablica 18. Količini nestimulirane sline u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 19. Udio hiposalivacije između skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 20. Rezultati mikološkog obriska u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 21. Broj kolonija *Candida albicans* i *Candida glabrata* u odnosu na skupinu nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 22. Klasifikacija prema Olsenu u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 23. Prisutnost halitoze, te podjela halitoze prema Rosenbergu u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 24. Mirisi i okusi u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 25. Povezanost Brinkman indeksa, mirisne i okusne disfunkcije procijenjena Spearmanovom korelacijom

Tablica 26. Modeli multiple linearne regresije za predikciju olfaktorne i gustatorne disfunkcije

Tablica 27. Koncentracije salivarnih citokina i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa u odnosu na skupine nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 28. Medijan i interkvartilni raspon percipiranog stresa između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 29. Raspodjela ispitanika prema stupnju percipiranog stresa između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 30. Razlike u stresu, anksioznosti i depresivnosti između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 31. Raspodjela ispitanika prema izraženosti stresa, anksioznosti i depresivnosti između skupina nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Tablica 32. Povezanost salivarnih citokina i salivarnog biomarkera oksidativnog stresa sa psihološkim statusom ispitanika u skupinama nepušača, pušača konvencionalnih cigareta i pušača THS-a

Popis pokrata

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

THS - Tobacco Heating System

IQOS - I quit ordinary smoking

OPMD - oralno potencijalni zloćudni poremećaji

IgA - imunoglobulin A

Spp - species

IL - interleukin

TNF- α - Tumorski faktor nekroze α

8-OHdG - 8-hidroksi-2-deoksigvanozin

BI - Brinkman indeks

VAS - Vizualno analogna skala

ELISA - Enzimski povezani imunosorbentni test (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

PBS - fosfatna puferirana otopina

BSA - goveđi serumski albumin

TMB - 3,3',5,5' tetrametil benzidin

LJPS - Ljestvica percipiranog stresa

DASS - Skala depresivnosti, anksioznosti i stresa

n - broj ispitanika

HPA os - hipotalamo-hipofizno-adrenalna os

Privitak 1: Anamnestički upitnik i upitnik o pušenju

Istraživački upitnik

PODACI O PACIJENTU:		
Broj protokola ispitanika:		☐ M ☐ Ž
Godina rođenja:		Broj telefona:
Stručna sprema : ☐ Magistar ili više ☐ Sveučilišni prvostupnik ☐ Četverogodišnja srednja škola ☐ Trogodišnja srednja škola ☐ Osnovna škola ☐ Nezavršena osnovna škola	Adresa:	E-mail adresa:

Bolujete li od sustavnih bolesti (zaokružiti)?

☐ DA ☐ NE

Ako da, od koje? _____

Koje lijekove uzimate – ponekad ili stalno? _____

Jeste li u prethodnih 30 dana koristili antibiotike (zaokružiti)?

☐ DA ☐ NE

Jeste li u prethodnih 30 dana koristili protugljivičnu terapiju (zaokružiti)?

☐ DA ☐

NE Jeste li u prethodnih 30 dana ispirali usnu šupljinu s tekućinama za ispiranje usne šupljine –antiseptici (zaokružiti)?

☐ DA

☐ NE

Označiti odgovarajuće:

☐ Pušač klasičnih cigareta

☐ Pušač THS

☐ Nepušač

(*Tobacco
HeatingSystem*)

Jeste li tijekom svog života konzumirali najmanje 100 cigareta?

☐ DA ☐ NE

Trajanje pušačkog statusa: _____ (napisati broj)

- ☐ < 1 godine
- ☐ 1-2 godine
- ☐ 2-5 godina
- ☐ 5-10 godina
- ☐ >10 godina

Količina popušanih cigareta / duhanskog umetka za grijanje (engl. Heat Stick, HEETS) u 1 danu: _____ (napisati broj)

- ☐ < 5
- ☐ 5-10
- ☐ 10-15
- ☐ >15

Da li ste prije nego što ste počeli pušiti IQOS :

- ☐ bili nepušač
- ☐ pušili klasične cigarete
- ☐ pušili e-cigarete
- ☐ nešto drugo _____

Da li ste zamijetili neke od navedenih simptoma/promjena u usnoj šupljini u vidu:

- ☐ pečenja usne šupljine
- ☐ suhoće usta
- ☐ promjena osjeta okusa
- ☐ promjena osjeta mirisa
- ☐ neugodan zadah
- ☐ vidljivih promjena na sluznici usne šupljine
- ☐ ostalo _____

Koliko vremena su prisutni navedeni simptomi:

- ☐ unutar 6 mjeseci
- ☐ 6-12 mjeseci
- ☐ >12 mjeseci

Molimo Vas da na skali od 0-100 procijenite jačinu pečenja u ustima:

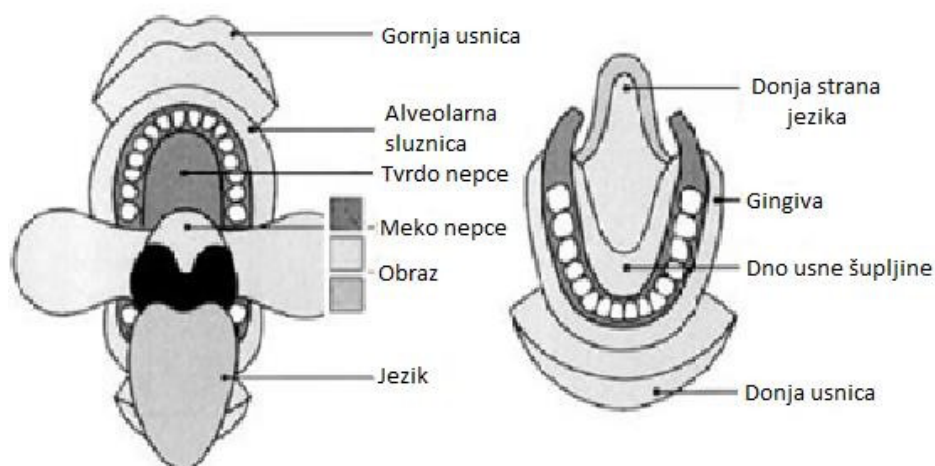
Vizualna analogna skala



Koje riječi najbolje opisuju Vaše pečenje:

- ☐ blago pečenje
- ☐ srednje jako pečenje
- ☐ vrlo jako pečenje
- ☐ izuzetno jako pečenje

Gdje Vas u ustima peče (zaokružite odgovarajuće mjesto)?



Dodatni komentar ispitivača:

Kada osjećate pečenje?

- ☐ stalno (i danju i noću)
- ☐ tijekom dana stalno
- ☐ tijekom dana povremeno
- ☐ tijekom noći (budi me iz sna)

Označiti odgovarajuće u tablici.

Je li pečenje spontano (peče samo od sebe bez podražaja)?

Peče li Vas na podražaj (dok jedete ili pijete)?

Olakšava li jedenje ili pijenje pečenje?

Pogoršava li jedenje ili pijenje pečenje? Je

li je pečenje uvijek iste jačine?

Pojačava li se pečenje prema večeri?

NE	DA

Promjenu osjeta okusa, opisali biste kao:

- ☐ potpuni gubitak
- ☐ slatko
- ☐ slano
- ☐ kiselo
- ☐ gorko

Jeste li ste nakon prelaska s klasičnih cigareta na IQOS primijetili smanjene simptoma pečenja usne šupljine :

- ☐ da
- ☐ ne

Jeste li ste nakon prelaska s klasičnih cigareta na IQOS primijetili povrat okusa i / ili mirisa:

☐ da

☐ ne

Dodatni komentari ispitivača:

Jeste li ste nakon prelaska s klasičnih cigareta na IQOS primijetili smanjenje neugodnog zadaha:

☐ da

☐ ne

Jeste li ste nakon prelaska s klasičnih cigareta na IQOS primijetili promjene vezane uz respiratorni sustav u vidu:

☐ češćeg kašljanja

☐ rjeđeg kašljanja

☐ osjećaja nadražnosti dušnika

☐ osjećaja nadražnosti grla

☐ pečenja dušnika

☐ pečenja grla

☐ osjećaja gušenja

Privitak 2: Ljestvica percipiranog stresa

Ljestvica percipiranog stresa

S.Cohen, T.Karmack, R.Mermelstein

Ljestvica se odnosi na vaše osjećaje i razmišljanja **proteklog mjeseca**. Svako pitanje ispituje koliko često ste se osjećali ili ste razmišljali na određeni način.

Za svako pitanje zaokružite jeste li se tako osjećali ili razmišljali: **nikad**, **gotovo nikad**, **ponekad**, **često**, **vrlo često**. (Svaki put pročitajte sve ponudene odgovore)

	Nikad	Gotovo nikad	Ponekad	Često	Vrlo često
Koliko ste često bili uzrujani zbog iznenadnog događaja na poslu?	1	2	3	4	5
Koliko često ste se osjećali nemoćnim kontrolirati važne događaje u Vašem životu?	1	2	3	4	5
Koliko često ste se osjećali nervoznim i pod stresom?	1	2	3	4	5
Koliko često ste se osjećali samouvjereno u rješavanju osobnih problema?	1	2	3	4	5
Koliko često ste osjećali da se stvari razvijaju onako kako Vi želite?	1	2	3	4	5
Koliko često ste imali osjećaj da ne možete izaći na kraj sa svim što trebate uraditi?	1	2	3	4	5
Koliko često ste bili sposobni kontrolirati nelagode u Vašem životu?	1	2	3	4	5
Koliko često ste osjećali da imate kontrolu nad situacijom?	1	2	3	4	5
Koliko često ste bili ljuti zbog poslovnih situacija koje su se dogodile van Vaše kontrole?	1	2	3	4	5
Koliko često ste osjećali da poteškoće vezane uz posao prelaze Vaše mogućnosti savladavanja?	1	2	3	4	5

Privitak 3: Skala depresivnosti, anksioznosti i stresa

DASS

Pažljivo pročitajte navedene tvrdnje i zaokružite broj uz svaku od njih koji pokazuje koliko se navedena tvrdnja odnosi na Vas (tijekom proteklog tjedna).

0 – uopće se ne odnosi na mene

1 – donekle se odnosi na mene

2 – uglavnom se odnosi na mene

3 – u potpunosti se odnosi na mene

1. Događa mi se da me uznemire prilično banalne stvari.	0	1	2	3
2. Suše mi se usta.	0	1	2	3
3. Čini mi se da ne mogu osjetiti ništa pozitivno.	0	1	2	3
4. Imam poteškoće s disanjem.	0	1	2	3
5. Jednostavno se ne mogu pokrenuti.	0	1	2	3
6. Pretjerano reagiram u nekim situacijama	0	1	2	3
7. Imam osjećaj da mi drhte noge.	0	1	2	3
8. Teško mi je opustiti se.	0	1	2	3
9. Toliko se uznemirim u nekim situacijama da osjetim golemo olakšanje kada prođu.	0	1	2	3
10. Osjećam da se nemam čemu veseliti.	0	1	2	3
11. Lako se uznemirim.	0	1	2	3
12. Čini mi se da imam previše negativne energije.	0	1	2	3
13. Osjećam se tužno i potišteno.	0	1	2	3
14. U nekim situacijama nemam strpljenja (kada čekam lift ili sl.)	0	1	2	3
15. Imam osjećaj da ću se onesvijestiti.	0	1	2	3
16. Čini mi se da sam za sve izgubila interes.	0	1	2	3
17. Osjećam da kao osoba ne vrijedim mnogo.	0	1	2	3
18. Razdražljiv/a sam.	0	1	2	3
19. Pojačano se znojim i bez fizičkog napora.	0	1	2	3
20. Bojim se bez pravog razloga.	0	1	2	3
21. Čini mi se da se ne isplati živjeti.	0	1	2	3
22. Teško mi je prepustiti se opuštanju.	0	1	2	3
23. Teško gutam.	0	1	2	3
24. Ne vesele me stvari koje radim.	0	1	2	3
25. Imam poteškoća sa srcem (ubrzano kuca ili preskače) i kad nisam fizički aktivna.	0	1	2	3
26. Osjećam se potišteno.	0	1	2	3
27. Vrlo sam razdražljiv/a.	0	1	2	3
28. Malo mi nedostaje da me uhvati panika.	0	1	2	3
29. Teško se umirim kada me nešto uzruja.	0	1	2	3
30. Strahujem da će me zateći neki banalan, ali nepoznat zadatak.	0	1	2	3
31. Ne mogu se u ništa uživjeti.	0	1	2	3
32. Teško podnosim kada me nešto prekine u obavljanju nekog posla.	0	1	2	3
33. Napet/a sam.	0	1	2	3
34. Osjećam se prilično bezvrijedno.	0	1	2	3
35. Ne podnosim ono što me odvlači od posla koji obavljam.	0	1	2	3
36. Osjećam se užasnuto.	0	1	2	3
37. U budućnosti ne vidim ništa čemu bih se veselio/la.	0	1	2	3
38. Mislim da je život besmislen.	0	1	2	3
39. Osjećam se uzrujano.	0	1	2	3

40. Brinem se zbog situacija u kojima bi me mogla uhvatiti panika ili bi se mogao/la osramotiti.	0	1	2	3
41. Drhte mi ruke.	0	1	2	3
42. Teško se prisilim da nešto započnem raditi.	0	1	2	3

Depresivnost – 3, 5, 10, 13, 16, 17, 21, 24, 26, 31, 34, 37, 38, 42

Anksioznost – 2, 4, 7, 9, 15, 19, 20, 23, 25, 28, 30, 36, 40, 41

Stres – 1, 6, 8, 11, 12, 14, 18, 22, 27, 29, 32, 33, 35, 39.

Životopis

Ella Sever

Adresa: Kumičićeva 3B, 51 000 Rijeka

E-pošta: ella.seever@gmail.com

Datum rođenj: 20. lipnja 1995.

Radno iskustvo

01/12/2022 – trenutno: doktor dentalne medicine na specijalizaciji – oralna medicina, Klinički bolnički centar Rijeka, Klinika za dentalnu medicinu

16/03/2023 – trenutno: naslovni asistent, Fakultet dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci

01/02/2021 – 30/11/2022 - sveučilišna asistentica, Fakultet dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci

Obrazovanje i osposobljavanje

2021 – trenutno: Doktorska škola iz znanstvenog područja biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet u Rijeci

2024 – trenutno: Program cjeloživotnog obrazovanja Nekirurška estetska medicina – Aesthetic Academy, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

2014 – 2020.: Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Dentalne medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

2010 – 2014.: Prva privatna gimnazija sa pravom javnosti u Osijeku, Gaudeamus

Jezične vještine

Materinski jezik/jezici: hrvatski

Strani jezici: engleski, njemački

Digitalne vještine

MS Office (Word Excel PowerPoint); Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer);
Rad na računalu, alati za statističku obradu i analizu podataka (SPSS)

Projekti:

2020 – trenutačno:

Suradnik na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Okolišni čimbenici i mikrobiološke interakcije u strukturi dentalnog biofilma (IP-2020-02-4027)“ voditelja Stjepan Špalj

Nagrade:

1. Priznanje dekana najboljoj diplomiranoj doktorici dentalne medicine po kriteriju prosječne ocjene kliničkih predmeta u akademskoj godini 2019/2020., Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
2. Priznanje dekana najboljoj studentici 5. godine Integriranog preddiplomskog i diplomskog sveučilišnog studija Dentalna medicina u akademskoj godini 2018/2019., Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Publikacije

Izvorni znanstveni radovi:

1. Impact of the Tobacco Heating System and Cigarette Smoking on the Oral Cavity: A Pilot Study
Sever E, Božac E, Saltović E, Simonić-Kocijan S, Brumini M, Glažar I. Impact of the Tobacco Heating System and Cigarette Smoking on the Oral Cavity: A Pilot Study. *Dent J (Basel)*. 2023;11(11):251.
2. Comparison of smoking conventional cigarettes and using heated tobacco products on the olfactory and gustatory function in healthy young adults: A cross-sectional study
Sever E, Kovačević Pavičić D, Pupovac A, Saltović E, Špalj S, Glažar I. Comparison of smoking conventional cigarettes and using heated tobacco products on the olfactory and gustatory function in healthy young adults: A cross-sectional study. *Tobacco Induced Diseases*. 2024;22:9. doi: 10.18332/tid/192524
3. Absence of Oral Opportunistic Infections in Patients with Inflammatory Bowel Disease Receiving Anti-TNF- α and Anti-Integrin- $\alpha 4\beta 7$ Therapy
Saltović E, Mijandrušić-Sinčić B, Braut A, et al. Absence of Oral Opportunistic Infections in Patients with Inflammatory Bowel Disease Receiving Anti-TNF- α and Anti-Integrin- $\alpha 4\beta 7$ Therapy. *Dent J (Basel)*. 2022;10(3):32.
4. Clinical characteristics and caries risk assessment of tobacco heating systems smokers, cigarette smokers and non-smokers: a cross-sectional study

Božac E, Paljević E, Sever E, Braut A, Špalj S, Peršić Bukmir R. Clinical characteristics and caries risk assessment of tobacco heating systems smokers, cigarette smokers and non-smokers: a cross-sectional study. Clin Oral Investig. 2024;28(7):382.

Kongresna priopćenja:

1. The impact of psychological status on a perception of pain in patients with burning mouth syndrome.
Sever E, Glažar I. kongres Fakulteta dentalne medicine, 01.10.2020-02.10.2020
2. The prevalence and associated factors of burning mouth syndrome.
Sever E, Muhvić Urek M, Pezelj-Ribarić S, Saltović E, Glažar I. 2. kongres Fakulteta dentalne medicine „Orofacijalna bol i disfunkcije”, 02.09.2021 – 03.09.2021
3. Povezanost težine oralnog lihen planusa i oralnih simptoma
Saltović E, Kavazović I, Bonifačić Simčić I, Pezelj-Ribarić S, Glažar I, Sever E, Muhvić Urek M. 2. kongres Fakulteta dentalne medicine „Orofacijalna bol i disfunkcije”, 02.09.2021 – 03.09.2021
4. Učinak klorheksidina na uspješnost inicijalne parodontne terapije.
Pupovac A, Mišković I, Kuiš D, Sever E, Božac E, Prpić J. 8. hrvatski parodontološki dani Rovinj, Hrvatska, 01.01.2022 – 01.01.2022
5. The evaluation of psychological factors in burning mouth syndrome.
Sever E, Glažar I, Saltović E. 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress "Science and us", 16.05.2024 – 18.05.2024
6. Procjena utjecaja novih sustava duhana bez izgaranja na morfološki izgled i karakteristike oralne sluznice i njegova usporedba s konvencionalnim duhanskim preparatima.
Sever E, Pupovac A, Kuiš D, Glažar I. Međunarodni kongres Fakulteta dentalne medicine " Novi koncept estetike osmijeha", 16.09.2022-17.09.2022
7. Clinical characteristics of periodontal tissues in conventional and electronic cigarette smokers - preliminary results.
Pupovac A, Mišković I, Kuiš D, Sever E, Božac E, Kunosić Z, Prpić. Virtual World Congress of Dental Students, 08.05.2024-09.05.2024
8. Antifungal activity of olive leaf extract on oral candida isolates.
Kinkela Devčić M, Simonić-Kocijan S, Pasković I, Vučinić D, Sever E. 26th Congress of the Balkan Stomatological Society, 11.05.2023 – 14.05.2023

9. Minimally invasive tooth preparation in anterior aesthetic restoration
Vučinić D, Morelato L, Kinkela Devčić M, Sever E, Tariba Knežević P. 26th Congress of the Balkan Stomatological Society, 11.05.2023 – 14.05.2023
10. Assessment of the impact of smokeless tobacco aerosol on oral mucosa and chemosensory function
Sever E, Glažar I, Pupovac A, Kinkela Devčić M, Saltović E, 26th Congress of the Balkan Stomatological Society, 11.05.2023 – 14.05.2023
11. Cariogenic microbiome of supragingival dental biofilm in cigarette smokers and non-smokers.
Božac E, Sever E, Badnjević M, Mohar Vitezić B, Špalj S, Peršić Bukmir R. 10. Međunarodni kongres Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 08.03.2024-09.03.2024
12. Does exposure to burnt and heated tobacco affect the abundance of periopathogenic species in the subgingival biofilm?
Mišković I, Kuiš D, Mohar Vitezić B, Pupovac A, Prpić J, Sever E. 10. Međunarodni kongres Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 08.03.2024-09.03.2024
13. Correlation between oral mucosal diseases and systemic diseases in institutionalized and noninstitutionalized elderly
Sever E, Saltović E, Pezelj-Ribarić S, Muhvić Urek M, Glažar I, 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress "Science and us", 16.05.2024 – 18.05.2024
14. Does Exposure to Heated or Burnt Tobacco Affect Chemosensory Function? Sever E, Saltović E, Glažar I, Pezelj-Ribarić S, Muhvić Urek M, Špalj S, Pupovac A. 12th Virtual World Congress of Dental Students, 09.5.2024 -10.05.2024