

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Mišković

UTJECAJ AEROSOLA IZ UREĐAJA ZA ZAGRIJAVANJE
DUHANA I DUHANSKOG CIGARETNOG DIMA NA
PARODONTNA TKIVA I NJIHOV SPECIFIČAN MIKROBIOM

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Mišković

UTJECAJ AEROSOLA IZ UREĐAJA ZA ZAGRIJAVANJE
DUHANA I DUHANSKOG CIGARETNOG DIMA NA
PARODONTNA TKIVA I NJIHOV SPECIFIČAN MIKROBIOM

Doktorski rad

Mentorica: izv.prof.dr.sc. Jelena Prpić dr.med.dent, Fakultet dentalne
medicine

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Ivana Mišković

THE EFFECT OF AEROSOL FROM TOBACCO HEATING SYSTEM
AND TOBACCO CIGARETTE SMOKE ON PERIODONTAL
TISSUES AND ITS SPECIFIC MICROBIOME

Doctoral thesis

Rijeka, 2025.

Mentorica rada: Izv.prof.dr.sc. Jelena Prpić dr.med.dent

Doktorski rad obranjen je dana _____u/na _____,
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

Rad je izrađen na Odjelu za parodontologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Katedri za parodontologiju Fakulteta dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jelene Prpić dr.med.dent , a u sklopu poslijediplomskog sveučilišnog znanstvenog (doktorskog) studija „Biomedicina“ pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Rad je izrađen u sklopu projekta "Okolišni čimbenici i mikrobiološke interakcije u strukturi dentalnog biofilma" Hrvatske zaklade za znanost (IP-2020-02-4027) pod vodstvom prof. dr. sc. Stjepana Špalja dr.med.dent.

ZAHVALA

Neizmjerne sam zahvalna svima koji su me podržavali, savjetovali i usmjeravali tijekom mog poslijediplomskog obrazovanja.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Jeleni Prpić koja je prvenstveno bila prijatelj a tek onda mentorica, na nesebičnoj pomoći i velikom strpljenju. Ovaj put je bio dug i iznimno izazovan, ali zahvaljujući Vašoj podršci, optimizmu, entuzijazmu i vjeri u mene, svaka prepreka je uspješno savladana.

Zahvaljujem se svojem Odjelu i Katedri za parodontologiju na svakodnevnoj motivaciji koja me u trenucima nesigurnosti gurala naprijed.

Veliko hvala prof.dr.sc. Stjepanu Špalju na nesebičnoj pomoći i ohrabrenju. Vaše znanje, iskustvo i strast za istraživanjem bili su mi uzor i motivacija da se uvijek trudim dati najbolje od sebe.

Hvala B. M. V, tvoj sam doživotni dužnik.

Kolegicama i kolegama zahvaljujem na zajedničkom radu, razmjeni ideja i ohrabrenju.

Veliko hvala mojim roditeljima i sestri koji su me podupirali, ohrabrivali i vjerovali u mene.

I naposljetku, hvala mojim ljubavima Damiru, Eriku i Maris na bezrezervnoj ljubavi, podršci, razumijevanju i strpljenju.

SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Utvrditi i usporediti parodontni status putem parodontnih indeksa (PPD (engl. *Probing Pocket Depth*, hrv. dubina sondiranja parodontnog džepa), GR (engl. *Gingival Recession*, hrv. recesija gingive), TM (engl. *Tooth Mobility*, hrv. mobilnost zuba), FD (engl. *Furcation Defect*, hrv. furkacijski defekt), CAL (engl. *Clinical Attachment Level*, hrv. razina kliničkog pričvrstka), FMPS (engl. *Full Mouth Plaque Score*) i FMBS (engl. *Full Mouth Bleeding Score*) između skupina nepušača, pušača cigareta i pušača bezdimnih cigareta (IQOS). Sekvenciranjem 16S rRNA gena parodontnih patogenih bakterija u nepušača, pušača cigareta i korisnika IQOS-a dobit će se uvid u bakterijske vrste (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*) i odrediti te usporediti ukupno bakterijsko opterećenje sve tri skupine.

Ispitanici i metode: Opažajno presječno istraživanje je uključilo 66 punoljetnih ispitanika (22 muškog i 42 ženskog spola) uparenih po dobi, spolu i pušačkom statusu. Formirane su tri skupine: I. skupinu čine pušači običnih cigareta, II. skupinu korisnici sustava za zagrijavanje duhana (IQOS), a III. skupinu nepušači. Ispitanici su dodatno podijeljeni u dvije podskupine ovisno o prisutstvu ili odsutstvu parodontitisa (P).

Rezultati: Pronađene su statistički značajne više vrijednosti PPD, GR, FMPS, FMBS i CAL-a u pušača običnih cigareta u odnosu na druge dvije skupine. Vrijednosti PPD i CAL-a su bile statistički značajno manje u skupini konzumenata IQOS-a. Prevalencija parodontnih patogena u subgingivnom dentalnom plaku je veća u pušača bez obzira da li se duhan zagrijava ili sagorijeva. Parodontitis ima izraženiji učinak na ukupno bakterijsko opterećenje i raznolikost subgingivno smještenih bakterija u odnosu na efekt koji ima izloženosti duhanu.

Zaključak: Izlaganje aerosolu grijanog duhana ima manje štetan utjecaj mjerljiv parodontnim indeksima PPD i CAL nego dim obične cigarete. Na količinu subgingivnih parodontnih patogena više utječe parodontitis nego pušenje, neovisno o tome da li se pritom duhan zagrijava ili gori. Pušenje običnih cigareta pokazuje tendenciju povećanja broja parodontopatogenih bakterija.

Ključne riječi: Disbioza; duhanski proizvodi; elektronska dostava nikotina; mikrobiologija; mikrobiota; parodontitis; parodontni indeksi; pušači; 16S sekvenciranje

SUMMARY

Objectives: To determine and compare the periodontal status, by using periodontal indices (PPD (Probing Pocket Depth), GR (Gingival Recession), TM (Tooth Mobility), FD (Furcation Defect), CAL (Clinical Attachment Level), FMPS (Full Mouth Plaque Score) and FMBS (Full Mouth Bleeding Score) between groups of non-smokers, cigarette smokers and IQOS users. By sequencing the 16S rRNA genes of periodontal pathogenic bacteria in non-smokers, cigarette smokers and IQOS users, we will gain insight into the bacterial species (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*) and determine and compare the total bacterial load in all three groups.

Patients and methods: An observational cross-sectional study included 66 adult subjects (22 male and 42 female) matched according to age, gender and smoking status. Three groups were formed: group I. group included smokers of regular cigarettes, group II. included users of the tobacco heating system (IQOS), and non-smokers were in the III. group. The subjects were further divided into two subgroups depending on the presence or absence of periodontitis (P).

Results: A statistically significant higher values of PPD, GR, FMPS, FMBS and CAL were found in regular cigarette smokers compared to the other two groups. PPD and CAL values were statistically significantly lower in the group of IQOS consumers. The prevalence of periodontal pathogens in subgingival dental plaque is higher in smokers regardless of whether the tobacco is heated or burned. Periodontitis has a more pronounced effect on the total bacterial load and the diversity of subgingival bacteria compared to the effect of tobacco exposure.

Conclusion: Exposure to the aerosol of heated tobacco has a less harmful effect measured by the periodontal indices PPD and CAL than the smoke of ordinary cigarettes. The amount of subgingival periodontal pathogens is more affected by periodontitis than by smoking, regardless of whether the tobacco is heated or burned. Smoking classic cigarettes shows a tendency to increase the number of periodontopathogenic bacteria.

Keywords: Dysbiosis; electronic nicotine delivery; microbiology; microbiota; periodontitis; periodontal index; smokers; tobacco products; 16S sequencing

SADRŽAJ

1	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1	<i>Duhanski proizvodi i pušenje.....</i>	2
1.2	<i>Alternativni duhanski proizvodi.....</i>	4
1.3	<i>Duhanski dim-karakteristike i utjecaj na usnu šupljinu.....</i>	9
1.4	<i>Utjecaj duhanskog dima na usnu šupljinu</i>	11
1.5	<i>Parodontna tkiva i parodontne bolesti.....</i>	12
1.5.2.1	<i>Gingivitis.....</i>	13
1.5.2.2	<i>Parodontitis</i>	14
1.6	<i>Mikrobiologija usne šupljine</i>	20
1.7	<i>Utjecaj aerosola grijanog duhana na usnu šupljinu i oralni mikrobiom.....</i>	23
1.8	<i>Analiza subgingivnog mikrobioma.....</i>	28
2	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	39
3	ISPITANICI I METODE.....	41
3.1	<i>Ispitanici</i>	41
3.2	<i>Metode.....</i>	43
3.2.1.1	<i>Prikupljanje podataka o općem zdravstvenom stanju, ispunjavanje upitnika o pušačkim navikama i parodontnom zdravlju.....</i>	43
3.2.1.2	<i>Ispunjavanje upitnika o oralno-higijenskim navikama i navikama pušenja.....</i>	44
3.2.1.3	<i>Klinički parodontološki pregled.....</i>	44
3.2.1.4	<i>Prikupljanje uzoraka subgingivnog dentalnog plaka</i>	45
3.2.1.5	<i>Izolacija DNA iz uzoraka subgingivnog dentalnog plaka.....</i>	46
3.2.1.6	<i>Amplifikacija i sekvenciranje nove generacije hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena.....</i>	49
3.2.1.7	<i>Amplifikacija hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena</i>	50
3.2.1.8	<i>Priprema knjižnica</i>	56
3.2.1.9	<i>Priprema <i>template</i>-a</i>	68
3.2.1.10	<i>Seqvenciranje knjižnica metodom sekvenciranja nove generacije (NGS).....</i>	70
4	REZULTATI.....	76
4.1	<i>Rezultati istraživanja o utjecaju dima cigarete i aerosola IQOS-a na parodontni status mjeren parodontnim indeksima.....</i>	76
4.2	<i>Kanonička diskriminacijska funkcija</i>	92
5	RASPRAVA.....	105
6	ZAKLJUČCI.....	115

7 LITERATURA.....	117
POPIS SLIKA	139
POPIS TABLICA.....	141
POPIS POKRATA.....	142
POPIS KRATICA BAKTERIJA.....	145
ŽIVOTOPIS	150

1 UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Pušenje cigareta dobro je poznati čimbenik rizika za brojne patološke implikacije po zdravlje ljudi uključujući i parodontne bolesti. Štetni učinci pušenja na parodontna tkiva opsežno su proučavani, a dokazi dosljedno pokazuju snažnu povezanost između pušenja i povećanog rizika od parodontitisa [1].

Pušenje cigareta štetno djeluje na parodontna tkiva različitim mehanizmima. Nikotin i druge štetne kemikalije u dimu cigareta mogu oslabiti imunološki odgovor domaćina, što dovodi do povećane osjetljivosti na parodontne patogene. Pušenje također smanjuje dotok krvi u gingivu, otežava cijeljenje rana i remeti ravnotežu upalnih medijatora u parodontnim tkivima, stvarajući pogodno okruženje za razvoj i progresiju parodontitisa [2].

Epidemiološke studije dosljedno pokazuju da pušači imaju veću prevalenciju i težinu parodontitisa u usporedbi s nepušačima [2,3]. Nadalje, pokazalo se da pušenje negativno utječe na ishode parodontnog liječenja, pri čemu pušači imaju lošiji odgovor na parodontnu terapiju i veće stope neuspjeha liječenja i gubitka zuba [3].

Sustavi za zagrijavanje duhana (engl. *tobacco heating system* THS) novi su hibridni proizvodi na tržištu. Kombinacija su konvencionalnih (običnih) cigareta i elektroničkih i reklamirani kao manje štetna alternativa za pušače. U takvim uređajima duhan se zagrijava a ne gori kao u običnim cigaretama. Aerosol takvih uređaja je produkt isparavanja i destilacije a ne izgaranja i pirolize, te prema navodima proizvođača sadrži manju količinu štetnih sastojaka u odnosu na dim obične cigarete [4].

Mikrobiom dentalnog plaka pod snažnim je i negativnim utjecajem duhanskog dima. Sastav i ravnoteža bakterijskih populacija unutar subgingivnog dentalnog plaka je patološki promijenjena u pušača. Disbioza u vidu povećanja parodontopatogenih bakterija, a smanjenja komenzalnih je čest nalaz u pušača cigareta. Crveni i narančasti kompleksi parodontopatogenih bakterija prema Socranskom imaju veću prevalenciju u pušača u odnosu na nepušače [5,6].

Obzirom da su uređaji koji zagrijavaju duhan relativno novi na tržištu, istraživanja orijentirana na utjecaj aerosola THS na parodontna tkiva i subgingivni mikrobiom su manjkava. Malobrojna

istraživanja ukazuju da postoje indikacije da je ovakav aerosol manje štetan po parodont i parodontni subgingivni mikrobiom u vidu smanjenja prevalencije parodontitisa i parodontopatogenih bakterija.

1.1 Duhanski proizvodi i pušenje

1.1.1 Prevalencija pušenja duhana

Pušenje cigareta je jedan od glavnih globalnih javnozdravstvenih problema koji doprinosi značajnom povećanju bolesti i smrtnosti, a koji su direktna posljedica konzumacije duhana. Prema Svjetskoj Zdravstvenoj Organizaciji (SZO), svake godine više od 6 milijuna ljudi umre zbog posljedica pušenja cigareta [7]. Bolesti povezane s pušenjem su apsolutno preventabilne, jedan od pet smrtnih slučajeva svakih 6 sekundi se može spriječiti. Kardiovaskularne bolesti, KOPB (kronična opstruktivna bolest pluća), razna sijela neoplazmi - osobito onih respiratornog sustava, neplodnost, parodontitis su neke od mnogih potencijalnih bolesti koje su direktna posljedica pušenja cigareta [8,9,10].

Smatra se da je danas gotovo jedna milijarda ljudi na zemlji aktivan pušač cigareta, što čini čak 21% svjetske populacije starije od 15 godina. Muškarci su nešto češći konzumenti u odnosu na žene (32 % muškaraca naspram 7 % žena) [11].

Pušenje cigareta je problem javnog zdravstva i u Hrvatskoj. Prema SZO Hrvatska se nalazi pri samom vrhu zemalja s najviše pušača [12]. Gotovo svaka treća osoba u Republici Hrvatskoj je aktivan pušač, dok 14.000 ljudi godišnje umire od bolesti vezanih uz pušenje [13]. U Republici Hrvatskoj se tijekom 2014. i 2015. godine provodilo istraživanje Europskog statističkog ureda (Eurostat-a) na odrasloj populaciji (15 i više godina) putem Europske zdravstvene ankete (EHIS-2). Istraživanje je proveo Hrvatski zavod za javno zdravstvo u suradnji s domovima zdravlja i patronažnim sestrama. Istraživanje je pokazalo da je 25 % ispitanika u Republici Hrvatskoj svakodnevni pušač cigareta (29,5% muškaraca i 20,8% žena), povremenih pušača je 3,7 % dok je nepušača 71,3% [13,14].

Konzumacija duhanskih proizvoda u Hrvatskoj je najčešća u obliku tvornički proizvedene cigarete, potom slijedi ručno motana cigareta, te upotreba bezdimnih oblika duhana koje prema trenutnim podacima konzumira tek 0.6% ispitanika [15]. Istraživanje EHIS-2 iz 2015. godine ne donosi podatke o konzumaciji alternativnih proizvoda konvencionalnoj cigareti poput elektronskih cigareta i uređaja za zagrijavanje duhana, jer je prvi proizvod takvog oblika lansiran na hrvatsko tržište tek u prosincu 2017. godine [16]. Istraživanje EHIS-3 iz 2019. godine donosi nove rezultate i ukazuje na trend smanjenja pušenja u Hrvatskoj. Naime, prema dobivenim podacima, 22,1% stanovnika svakodnevno puši, i to 25,6% muškaraca i 19,5% žena. Povremeno puši 3,6% stanovnika, dok 74,3% stanovnika ne puši. U ovom istraživanju su obuhvaćeni i korisnici elektroničkih cigareta i uređaja. Istraživanje je pokazalo da je uporaba ovakvih uređaja (e-cigareta, uređaja za zagrijavanje duhana i sl.) manja u odnosu na konzumaciju konvencionalnih cigareta. Svakodnevno ih koristi tek 0,8%, a povremeno 1,1% stanovnika Hrvatske [17].

1.1.2 Duhanski proizvodi kroz povijest i njihov razvoj do danas

Duhanski proizvodi su proizvodi sastavljeni uglavnom od duhana, a mogu se konzumirati. Pušenje je najčešći način konzumacije duhana i podrazumijeva udisanje dima ili aerosola koji nastaje sagorijevanjem duhana u usnu šupljinu i /ili u pluća do krajnjih alveola putem cigareta, cigara, lula ili drugih duhanskih proizvoda [18]. Konzumacija duhana se može odvijati žvakanjem i sisanjem ili ušmrkavanjem. To su bezdimne varijante konzumacije koje također zadovoljavaju nikotinske potrebe konzumenata kao i inhalatorni način [18,19].

Arheološka istraživanja su pokazala da su Maje još u prvom stoljeću prije Krista pušili listove duhana u svetim i vjerskim obredima. Njihovim migracijama na teritoriju Amerike u periodu od 470 do 630 godine prije Krista, upotreba duhana je prihvaćena od susjednih i domorodačkih plemena tog područja. Indijanski vračevi, šamani, su ga također upotrebljavali u vrijeme vjerskih obreda, dok su ljudi koji su se u to vrijeme bavili medicinom, duhan primjenjivali kod liječenja astme, vrućice, ujeda insekata, sanacije opeklina ali i depresivnih stanja. U 15. stoljeću Kolumbo je prilikom osvajanja Novog svijeta zamijetio i dokumentirao upotrebu ove biljke u domorodaca, te su kasnije kroz 16. stoljeće portugalski i španjolski mornari pomogli u širenju duhana Europom

i ostatkom svijeta. Upravo su Španjolska i Portugal bile prve zemlje koje su počele masovno uzgajati duhan u komercijalne svrhe i to prvenstveno radi svojih kolonijalnih posjeda na teritoriju Novog svijeta [20].

Istraživanja o štetnosti pušenja cigareta su započela još 1939. kada je Mueller po prvi put objavio rezultate svojeg epidemiološkog istraživanja koje je povezalo pušenje cigareta i karcinom pluća. Kroz 1950. godine istraživanja su se nastavila od strane drugih istraživača te potvrdila ono što je i Mueller iznio [21]. Istraživanja o štetnosti pušenja se nastavljaju do danas, pri čemu se pušenje cigareta dovodi u vezu s brojnim patološkim bolestima i stanjima. Duhanske kompanije se prilagođavaju tržištu predstavljajući alternativne proizvode klasičnoj cigareti obećavajući manju štetnost, čime nastoje zadržati dosadašnje korisnike ali i privući nove.

Uređaji za zagrijavanje duhana *Tobacco Heating System* (THS), *Heated Tobacco Products* (HTP) ili *Heat not Burn system* (HnB) su još 1988. uvedeni na tržište. Zbog lošeg marketinga, ideje o novim duhanskim proizvodima nisu bile prihvaćene od strane potencijalnih potrošača, te je 1989. godine THS povučen s tržišta. Razvojem i unaprjeđenjem tehnologije ovakvog tipa uređaja, 2000-tih godina, noviji modeli bivaju bolje prihvaćeni od strane konzumenata te započinje njihov intenzivniji marketing. PMI (Phillip Morris Int.), BAT (British American Tobacco) i KT&G (Korea Tobacco & Ginseng Corporation) su 2014. uspjeli osvojiti značajni dio globalnog tržišta, i to prvenstvo u regiji zapadnog Pacifika. Osobito su popularni u azijskim zemljama - Japanu i Koreji, ali i u Europi - Italija i Engleska [2,22,23]. Osim THS proizvoda na tržištu su prisutni i drugi oblici duhanskih proizvoda poput električne ili e-cigarete te nikotinskih vrećica (engl. *snuff*) namijenjenih oralnoj upotrebi [22].

1.2 Alternativni duhanski proizvodi

Prema SZO, konzumacija duhana konvencionalnom cigaretom je u stalnom padu u protekla dva desetljeća [24]. Kontinuirane javnozdravstvene kampanje i osvješćivanje konzumenata o štetnosti, ali i suočavanje s posljedicama je zasigurno dovelo do ovog silaznog trenda. Međutim, dok je smanjenje konzumacije duhana putem cigarete smanjeno, upotreba alternativnih proizvoda cigareti je u porastu. Konzumacija e-cigareta, THS uređaja, vodenih lula (shishe, hookah, nargile

i slično) su u konstantnom porastu. Osobito osjetljiva populacija jesu mlađe osobe - tinejdžeri, adolescenti i mladi koji su često zavarani ugodnim okusima, aromama i odsustvom teškog cigaretnog dima, te samim time i krivo pretpostavljaju da su ovakvi proizvodi bezopasni [25]. Ovakvi alternativni proizvodi, dapače, nimalo nisu bezopasni. E-cigarete, vodene lule i uređaji za zagrijavanje duhana stvaraju nove ovisnike i to je jedan od novih izazova javnozdravstvenih kampanja s kojima će se trebati što prije uhvatiti u koštac. Istraživanja pokazuju na primjeru THS uređaja da oni možda i izlažu korisnike nešto nižim koncentracijama toksičnih tvari u odnosu na klasične cigarete, ali ih i izlažu višim koncentracijama nekih drugih toksina. Utjecaj takvih toksina na ljudski organizam još nije u dovoljnoj mjeri ispitan [26].

1.2.1 Uređaji za zagrijavanje duhana

Proizvodi koncipirani na principu elektronike, odnosno pogonjeni su baterijama koje su punjive ili potrošne nazivaju se elektronskim cigaretama [23]. To su proizvodi koji pripadaju skupini takozvanih sustava elektroničke dostave nikotina (engl. *Electronic Nicotine Delivery Systems*, ENDS). U tu skupinu se ubrajaju električne cigarete ili e-cigarete i uređaji za zagrijavanje duhana. E-cigarete sadrže bateriju koja zagrijava spremnik s tekućinom koji sadrži nikotin, različite arome i ovlaživače. Grijanjem takve tekućine dolazi do aerosolizacije tekućine koju potom korisnik udiše [27]. Uređaji za zagrijavanje duhana također pripadaju skupini sustava za elektroničku dostavu nikotina, ali funkcioniraju po nešto drugačijem principu. Kod ovakvih uređaja duhan se zagrijava, ali ne gori kao u običnim cigaretama, te ne proizvodi vatru, pepeo ili dim. Zagrijavanjem duhana oslobađa se nikotin, hlapljive tvari poput propanala, akroleina i glicerola koji stvaraju aerosol [4,24,28].

1.2.2 Sustav uređaja za zagrijavanje duhana

Uređaji za zagrijavanje duhana- *Tobacco Heating System (THS)*, *Heated Tobacco Products (HTP)* ili *Heat not Burn (HNB)* proizvodi su novi, moderni, inovativni i primamljivi duhanski proizvodi za koje proizvođači tvrde da imaju manje loših posljedica po ljudsko zdravlje u usporedbi s konvencionalnom cigaretom. Ovakvi duhanski proizvodi proizvode samo aerosol, bez vatre, pepela i dima, jer se duhan zagrijava na temperaturi od 250-350°C ovisno o proizvođaču, a ne gori kao u klasičnim cigaretama, kao što je već navedeno ranije [4]. Aerosol koji proizvodi ovaj uređaj svojim konzumentima navodno zadovoljava potrebe za nikotinom poput obične cigarete. THS je hibridni model koji kombinira električnu i klasičnu cigaretu.

U ovo istraživanje bili su uključeni korisnici samo IQOS uređaja tvrtke PMI kao primjera jednog od uređaja za zagrijavanje duhana koji je najzastupljeniji na hrvatskom tržištu, stoga će ova vrsta uređaja za zagrijavanje duhana biti i поближе objašnjena.

U tekstu ove doktorske disertacije će se koristiti samo kratica THS odnosno IQOS koja će se odnositi na sustav uređaja za zagrijavanje duhana (THS) odnosno specificirani uređaj (IQOS).

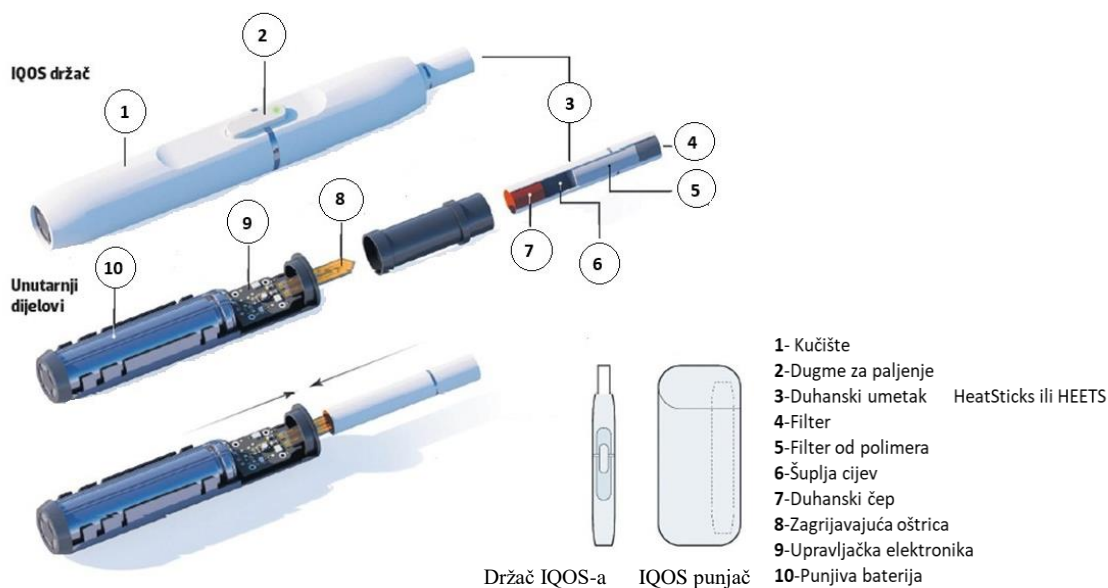
1.2.3 Uređaj za zagrijavanje duhana- Primjer IQOS-a

Uređaj za zagrijavanje duhana - IQOS svjetski poznate tvrtke PMI (Phillip Morris International, Inc., Stamford, Connecticut) koja je proizvođač duhanskih i alternativnih duhanskih proizvoda, je potencijalnim konzumentima prezentiran kao sredstvo na putu od odvikavanja od obične cigarete. Mediji su iznijeli tvrdnju da je sam naziv "IQOS" akronim od "I Quit Ordinary Smoking" odnosno "I Quit Original Smoking". PMI se ogradio od te pretpostavke te naglasio kako IQOS nije skraćunica od zapravo ničega [29]. Međutim, taj akronim se i danas široko koristi i na taj način manipulira s potencijalnim korisnicima odnosno novim ovisnicima.

Proizvodi koji su alternativa klasičnim cigaretama su brojni te se još uvijek razvijaju i nadograđuju. Istraživanja pokazuju, da način konzumacije nije bitan za očitovanje bolesti koje pušenje duhana

nosi. Za sve ove proizvode je dokazan negativan i štetan utjecaj po ljudsko zdravlje koje je vrlo slično ili identično kao i pušenje konvencionalnih cigareta [30,31].

Sustav za zagrijavanje duhana IQOS sastoji se od tri glavne komponente: držača za grijanje duhana, duhanskog umetka (HEETS) i punjača (Slika 1). Punjač baterije sustava je prijenosan, te je potrebno umetnuti držač u punjač čime započinje proces punjenja. Duhanski umetak za jednokratnu upotrebu - HEETS se umetne u utor držača koji sadrži elektronski kontroliranu oštricu. Pritiskom gumba na držaču započinje grijanje oštrice a potom i duhana [24,32]. Temperatura se tokom inhalacije održava na temperaturi do 350 °C. Uređaj se automatizmom zaustavlja ako temperatura prelazi preko 350 °C i na taj način se održava temperatura grijanja [4]. Duhanski umeci se zagrijavaju u držaču te se ne smiju paliti otvorenim plamenom kao konvencionalne cigarete. Sastav takvog duhanskog umetka je prikazan na Slici 1 [33].



Slika 1. Shematski prikaz IQOS-a i duhanskog umetka HEETS (Heat Sticks)

Preuzeto i prilagođeno iz : [33]

Duhanu duhanskog umetka se dodaje oko 112 aditiva. Veziva su celuloza i guar guma dok su glicerol i propilenglikol humektansi. Mentol i vanilin su među poznatijim aromama, pri čemu je mentol prisutan u značajnoj količini. Filtar HEETS-a se sastoji od tri dijela. Prvi dio je šuplja acetatna cijev koja omogućuje održavanje strukture duhanskog umetka tijekom umetanja u držač. Drugi dio je filter od polimera (polimljična kiselina) koja uklanja višak vodene pare iz aerosola, smanjujući njegovu temperaturu. Zadnji dio filtra podsjeća na onaj iz običnih cigareta i napravljen od celuloznog acetata (Slika 1) [34].

Duhan se zagrijava oštricom u uređaju za grijanje koja je umetnuta u jedan kraj duhanskog umetka, tako da se toplina raspršuje kroz umetak prilikom pušenja. Emisija aerosola zatim prolazi kroz šuplju acetatnu cijev i filter od polimernog filma na putu do usta [35]. Nakon otprilike 12-14 udisaja, uređaj vibracijom signalizira da je grijanje završeno te da se tada duhanski umetak može odložiti u otpad. Prvi IQOS uređaji su mogli grijati duhan najviše 6 minuta, i nakon toga je bateriju bilo potrebno puniti. Time se maksimalni broj udisaja aerosola u 6 minuta sveo na 12-14. Današnji modeli su unaprijeđeni, te imaju mogućnost da se koriste i do 20 puta bez punjenja baterije [36,37].

IQOS uređaji su reklamirani kao „revolucionarni proizvodi koji imaju tehnologiju da zagrijavaju duhan bez gorenja, a pri tome daju pravi autentični okus duhana, ali bez dima, pepela i s manje neugodnih mirisa“ [24]. Prema navodima proizvođača, zagrijavanjem duhana proizvodi se puno manja količina opasnih i štetnih tvari, pa bi se samim time trebale i smanjiti štetne posljedice po zdravlje. Ovakvi proizvodi i njihov aerosol i dalje sadrže nikotin, katran, ugljikov monoksid i amonijak, ali u nešto manjim količinama u odnosu na običnu cigaretu [28].

Uređaji za zagrijavanje duhana započeli su se glasnije reklamirati 2013. godine kada je Japan Tobacco International (JTI) u kolaboraciji s Pax Labs predstavio uređaj koji zagrijava duhan - Ploom u Japanu. 2014. PMI je plasirao IQOS, dok je 2015. BAT lansirao IFuse u Rumunjskoj, a nešto kasnije i svoj drugi THS proizvod - Glo kojeg predstavlja Azijskom tržištu [35,39]. KT&G global 2017. stavlja na tržište i svoj uređaj za zagrijavanje duhana nazvan - lil-a HTP [35]. Uređaji za zagrijavanje duhana su od 2013. počeli malim koracima osvajati tržišta, te su ga do danas praktički i osvojili sa ovim starim-novim konceptom konzumacije duhana.

Dostupnost IQOS uređaja u zemljama diljem svijeta neprestano raste te je za sada dostupna u njih 82, dok je FDA (hrv. Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država, engl. *U. S. Food*

& Drug administration) odobrila njihovu primjenu samo u Americi [40]. Osobito su popularni u Japanu i Koreji, dok od Europskih zemalja Italija i Engleska drže vodeća mjesta [22].

U prosincu 2017. godine PMI je predstavio IQOS i hrvatskom tržištu te je od tada do danas dominantan u odnosu na druge uređaje za zagrijavanje duhana [16].

1.3 Duhanski dim-karakteristike i utjecaj na usnu šupljinu

Dim koji nastaje kao posljedica gorenja duhana u cigareti je kompleksna i reaktivna mješavina više od 6500 različitih kemijskih sastojaka koji na stanicu mogu djelovati kancerogeno, mutageno i toksično. Nepotpunim izgaranjem (sagorijevanjem) oko 600 sastojaka duhana i njihovom toplinskom razgradnjom, pri temperaturi od 1000 °C oslobađa se > 7000 kemikalija. Svaki udisaj cigaretnog dima pušača izloži količini od 172 toksina, 47 kemikalija koje su klasificirane kao opasni otpad i 67 poznatih kancerogenih tvari za ljude ili životinje [25,41].

Duhanski dim je aerosol koji nastaje složenim i preklapajućim procesima gorenja, pirolize, pirosinteze, destilacije i sublimacije [18].

Više od 6000 kemijskih spojeva unutar duhanskog dima čine organski spojevi i to čvrste komponente u obliku čestica koje su uklopljene u plinovitu fazu. Najzastupljenije i najvažnije čvrste komponente duhanskog dima su: nikotin i srodni alkaloidi (nornikotin, anatabin, anabasin), katran, teški metali poput arsena, kadmija i olova, aromatski amini i nitrozamini, fenoli, ugljikovodici (jednostavni, aromatski, heterociklički), dok dušik, ugljikov monoksid i cijanovodik pripadaju skupini najčešće prisutnih plinova [13,42].

Sastav dima nije konzistentan, ovisi prvenstveno o proizvođaču cigareta, potom o fizičkim karakteristikama same cigarete poput njene duljine i debljine, o vrsti duhana koja je unutar cigarete, aditivima, poroznosti papira kojom je duhan omotan, temperature izgaranja i dr. Toksikološki gledano najštetniji sastojci duhanskog dima jesu nikotin i katran kao čvrste komponente te ugljični monoksid kao plin [43].

1.3.1 Nikotin

Nikotin (*Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica*) nije karcinogen, ali je glavni alkaloid duhana i jedan od visoko adiktivnih i psihoaktivnih kemijskih spojeva koji se mogu naći u prirodi. Prvenstveno se nalazi u plinovitom stanju u duhanskom dimu, međutim može biti adsorbiran na površinu čestica dima te se tada klasificira kao čvrsta komponenta. Osim nikotina, ovisnost uzrokuju i poliaromatski ugljikovodici, fenoli i nitrozamini koji se nalaze u dimu [44].

Nikotin se može apsorbirati kroz sluznicu usne šupljine, kožu, pluća, mokraćni mjehur i gastrointestinalni sustav [45]. Jednom apsorbiran, primarno se metabolizira u jetri u kotinin (70-80%) i nikotin -N-oksid, a izlučuje se znojem, slinom, žuči, urinom i fecesom. Kotinin se često upotrebljava u dijagnostičke i istraživačke svrhe kao marker izloženosti duhanu aktivnog ili pasivnog pušača, jer je njegovo poluvrijeme razgradnje jedan do dva dana, dok ono zanikotin iznosi dva do tri sata [43,46].

Pušač udahne u prosjeku oko 37.6 mg (+/- 17.7) nikotina dnevno. Ta brojka ovisi o pušačkim navikama odnosno broju popušanih cigareta te tipu i vrsti cigarete [42,47,48]. Nikotin djeluje stimulatивно po centralni živčani sustav u vidu povećanja broja otkucaja srca, porasta masnih kiselina u plazmi, povišenja razine glukoze u krvi te povećanja katekolamina koji su samo neki od trenutnih učinaka koje duhanski dim ima na ljudski organizam [44]. Otpuštanjem vazopresina, hipertenzivnog pepida, dolazi do prolaznih hipertenzivnih epizoda pri svakoj konzumaciji cigarete. Ovisnost o cigareti za koju je zaslužan nikotin može varirati od umjerene do teške ovisnosti [49].

1.3.2 Ostali toksični sastojci dima cigareta

Osim nikotina, katran je jedan od zastupljenijih čvrstih sastojaka duhanskog dima. To je smeđi, viskozni i ljepljiv kondenzat dima koji nastaje prilikom nepotpunog sagorijevanja duhana u

cigareti. Zbog svoje konzistencije ne može se poput nikotina i ugljičnog monoksida apsorbirati u krvotok, već se taloži u plućima i drugim dijelovima respiratornog sustava [50].

Ugljikov monoksid (CO) je plin bez mirisa, okusa i boje koji nastaje nepotpunom sagorijevanjem organskih spojeva, među ostalim i duhana. Snažan je toksin koji ima 200-250 puta veći afinitet prema molekuli hemoglobina od kisika, stvarajući karboksihemoglobin u krvi. Izloženost organizma karboksihemoglobinu može izazvati hipoksiju tkiva, glavobolje, mučnine i povraćanja, oštećenje tkiva te respiratornu disfunkciju [51,52].

Glavni karcinogeni duhana jesu uglavnom tvari koje se oslobađaju iz katrana gorenjem, poput policikličkih ugljikovodika, teških metala, nitrozamilina, vinilklorida i drugi.

Najvažniji nitrozamili jesu N'-nitrozonornikotin (NNN), N'-nitrozokozin (NNK), N'-nitrozoanatabin (NNT) i N'-nitrozoanabazin (NAB). NNK i NNN imaju najveći utjecaj na kancerogenost dima, specifični su za duhan i prisutni u svim duhanskim proizvodima. Nastaju tijekom obrade i sušenja samog duhana u količinama od milijuntinke (engl. *parts per million quantities* PPMQ), što je vrlo velika količina karcinogenih nitrozamina u odnosu na bilo koji drugi proizvod namijenjen oralnoj konzumaciji ljudi [53,55].

1.4 Utjecaj duhanskog dima na usnu šupljinu

Stanice usne šupljine konzumenata duhana, bilo da se on puši ili konzumira na bilo koji drukčiji način je izložena vrlo visokim koncentracijama nikotina. Te razine mogu biti čak do 300 puta više od uobičajenih u gingivnoj sulkusnoj tekućini u odnosu na koncentraciju u krvi i serumu [42,48].

Usna šupljina je prva površina ljudskog organizma s kojom dim cigarete dolazi u kontakt, te kao takav na tkiva djeluje nepovoljno svojim kemijskim sastavom kao i svojom mogućnošću da fizički ošteti tkivo termičkom provokacijom i iritacijom. Termička iritacija se dešava zbog prolaznog povišenja temperature u ustima prilikom pušenja, što može dovesti do opekotina i ozljeda sluznice [56,57]. Prve vidljive promjene kao rezultat kemijske iritacije jesu promjene na površini tkiva, koje su u većini slučajeva benigne, ali neestetske. Hiperpigmentacija zuba i sluznice usne šupljine, hiperkeratoza, nikotinski stomatitis, crni dlakavi jezik, kandidijaza i halitoza su neke od najčešćih

manifestacija dima cigarete u usnoj šupljini [58-60]. Osim ovakvih promjena, prekancerozna stanja poput leukoplakije i eritroplakije te karcinoma usne šupljine su također, nažalost, jedne od mogućih bolesti koje nastaju kao direktna posljedica pušenja cigareta. Preko 80 % oralnih karcinoma se češće očituje u korisnika duhanskih proizvoda nego u onih koji ne konzumiraju duhan. Pojavnost karcinoma usne šupljine je u direktoj korelaciji s količinom popušanih cigareta, što je konzumacija veća to je i rizik od oboljevanja veći [61-64].

Pojavnost parodontitisa kao upalne bolesti potpornih tkiva zuba je također pod utjecajem udisanja duhanskog dima i njegovih štetnih sastojaka [3,65]. Naime, u pušača je češća prevalencija parodontnih bolesti u odnosu ne nepušače [3].

1.5 Parodontna tkiva i parodontne bolesti

1.5.1 Parodontna tkiva

Parodontna tkiva, odnosno potporni aparat zuba je funkcionalna cjelina koju čini alveolarna kost, cement zuba, parodontni ligament i gingiva. Funkcije parodontnog tkiva su višestruke: omogućuju vezu između zuba i alveolarne kosti te na taj način daju potporu zubima, pružaju tkivu zaštitu od prodora mikroorganizama te zadržavaju intergritet površine mastikatorne sluznice. Fizička, formativna, nutritivna i senzorička funkcija su pojmovi koji u suštini opisuju ulogu parodontnih tkiva [66].

Parodontni ligament je vezivna komponenta parodonta koja se uglavnom sastoji od kolagena tipa I. i fibroblasta. Smješten je u prostoru između cementa zuba i alveolarne kosti, i omogućuje povezivanje cementa zuba s alveolarnom (krestalnom) kosti i gingivom u alveoli zuba pomoću kolagenih vlakana. Osim ostvarivanja potpore i pričvršćivanja zuba u kosti, odgovoran je i za senzorne odnosno proprioceptivne signale koji se šalju u somatosenzorni korteks mozga, čime se izbjegavaju prekomjerne okluzalne sile prilikom žvakanja i govora. Također, parodontni ligament je spremnik stanica koji služe popravku i održavanju homeostaze parodontnih tkiva [66,67].

Cement je mineralizirano, avaskularno tkivo koje prekriva dentin korijena i predstavlja mjesto pričvršćivanja vlakana parodontnog ligamenta [66].

Gingiva je odgovorna za pružanje zaštite i davanje integriteta površini štiteći ostatak parodonta od mehaničkih i bakterijskih utjecaja. Osim epitela, važna je i gingivna sulkusna tekućina, koja se nalazi u gingivnom sulkusu (fiziološkom prostoru između zuba i slobodne gingive), a ima značajnu ulogu u zaštiti dubljih parodontnih struktura od bakterijske invazije. Alveolarna kost sadrži alveole – prostore unutar koštanog tkiva za smještaj zuba te čini svojevrsan ‘kostur’ na koju se sva ostala tkiva vezuju [66,68].

Razina kliničkog pričvrstka (CAL) pokazuje stupanj gubitka potpornih tkiva oko zuba. U slučaju parodontitisa on je povećan.

1.5.2 Parodontne bolesti

Parodontne bolesti su pojam koji obuhvaća sve patološke promjene parodontnih tkiva. Najčešći upalni oblici jesu gingivitis i parodontitis. Gingivitis je reverzibilno upalno stanje dok je parodontitis ireverzibilna upalna promjena vidljiva na svim sastavnicama parodonta, koja utječu i narušavaju estetsku vizuru, remete mastikatornu funkciju, kvalitetu života i samopouzdanje oboljelih pacijenata [69].

1.5.2.1 Gingivitis

Plakom inducirani gingivitis je najčešća forma parodontne bolesti, za koju se smatra da je drugo po učestalosti oralno oboljenje nakon zubnog karijesa. Gingivitis pogađa od 50-90 % odraslih ljudi diljem svijeta, vrlo je čest u dječjoj populaciji i adolescenata te se njegova povećana učestalost nastavlja kroz odrastanje [70,71].

Gingivitis uzrokovan dentobakterijskim plakom je reverzibilna upala gingive koja nastaje kao posljedica akumulacije nespecifičnog dentalnog plaka na površini zuba. Karakterizirana je

hiperemičnom, edematoznom gingivom, crvenkaste do ljubičaste boje koja krvari prilikom provokacije zubnom četkicom ili sondiranja parodontnom sondom. Krvarenje može biti u nekim slučajevima i spontano. Važan je podatak da u slučaju gingivitisa nema gubitka kliničkog pričvrstanih gubitka alveolarne kosti vidljive radiološkom analizom, a svi simptomi nestaju nakon uklanjanja dentalnog biofilma bez posljedica [72,73].

Gingivitis može biti lokaliziran ili generaliziran, pri čemu je kod generalizirane forme krvarenje prisutno na >30 % pregledanih sondiranih mjesta [72].

Gingivitis predstavlja predstadij parodontitisa budući da svaki parodontitis započinje kao gingivitis, međutim nikako nije pravilo da svaki gingivitis postaje parodontitis bez obzira koliko je gingivitis prisutan u dotičnog pacijenta. Da bi se parodontitis očitovao potrebno je uključivanje još nekoliko drugih faktora, ali mikrobiološki izazov kojeg predstavlja gingivitis je svakako jedan od neophodnih [70,73].

1.5.2.2 Parodontitis

Smatra se da oko 700 milijuna ljudi diljem svijeta boluje od parodontitisa, a njegova učestalost neprestano raste [2].

Parodontitis je složene i multifaktorijske prirode, a osim mikrobiološkog izazova koji uključuje specifične parodontne patogene, osjetljivost domaćina, genetska i epigenetska pozadina, pušenje i neke sistemske bolesti poput dijabetesa, reumatoidnog artritisa i osteoporoze mogu pridonijeti većoj učestalosti bolesti za čak 85% [2,73-75]. Dijabetes i pušenje cigareta imaju nepobitan i dokazan utjecaj na razvoj i progresiju parodontitisa, stoga uzimanje u obzir ova dva čimbenika rizika je nezaobilazan korak pri liječenju i prognoziranju ishoda ove bolesti [75].

Parodontitis je upalna bolest potpornih tkiva oko zuba, koja ako se ne liječi dovodi do progresivnog i ireverzibilnog gubitka svih komponenti parodonta što s vremenom dovodi do pomičnosti i gubitka zuba. Gubitak zuba zbog parodontitisa je najčešći uzrok gubitka zuba u svijetu [76-78].

Prema novoj, petoj klasifikaciji parodontnih i periimplantatnih bolesti i stanja iz 2017. godine parodontitis se definira kao kompleksna i višestruko uvjetovana kronična bolest koja je usko povezana s disbiotskim biofilmom [79]. Patogeneza parodontitisa se može najjednostavnije objasniti na način da subgingivne parodontopatogene bakterije uzrokuju pretjeran odgovor (prijemčljivog) domaćina koji unatoč tome ne uspijeva suzbiti povećanje broja patogena što rezultira kroničnom upalom i opsežnim oštećenjem tkiva. Medijatori upale poput enzima matriksne metaloproteinaze - MMP, prostaglandina i interleukina se luče u velikim količinama u cilju suzbijanja upale, no time dovode do destrukcije tkiva koja je nepovratna. Paradoksalno je da upalni odgovor organizma želi suzbiti proliferaciju patogena iz dentobakterijskog plaka, međutim nuspojava cijelog procesa je nepovratno uništenje i gubitak tvrdih i mekih tkiva potpornog aparata zuba [80]. Bolest napreduje kontinuirano s povremenim epizodama egzacerbacija i remisija. Započinje kao upala gingive koja s vremenom, u prijemčivog domaćina, razara epitelni pričvrstak te potom zahvaća parodontni ligament i alveolarnu kost. Dolazi do stvaranja parodontnih džepova, apikalne migracije epitelnog i vezivnog pričvrstka, recesije gingive, gubitka alveolarne kosti, ekspaniranosti račvišta višekorijenskih zuba te povećane pomičnosti i ispadanja zuba kao krajnjeg rezultata neliječene bolesti [75].

Objektivni pokazatelji stanja parodontnih tkiva jesu parodontni indeksi. Najčešće korišteni parodontni indeksi pri detekciji parodontnih bolesti jesu dubina parodontnog džepa (engl. *probing pocket depth* PPD), *full mouth bleeding score* (FMBS), *full mouth plaque score* (FMPS), gingivalna recesija (engl. *gingival recession* GR), mobilnost zuba (engl. *tooth mobility* TM), furkacijski defekt (engl. *furcation defect* FD) i razina kliničkog pričvrstka (engl. *clinical attachment level* CAL).

PPD je udaljenost od caklinsko-cementne granice (CEJ) do dna parodontnog džepa ili dna gingivnog sulkusa (u milimetrima). PPD ukazuje na prisutnost parodontitisa ako dosegne vrijednost ≥ 4 mm [81].

FMBS je broj mjesta zuba na kojima je zabilježeno krvarenje, podijeljen s ukupnim brojem dostupnih mjesta i pomnoženih sa 100 (izraženo kao postotak). Prisutnost ili odsutnost krvarenja bilježi se 30 sekundi nakon mjerenja. FMBS je pokazatelj gingivitisa [81].

FMPS je broj mjesta na zubima na kojima je zabilježen plak, podijeljen s ukupnim brojem dostupnih mjesta i pomnoženih sa 100 (izraženo kao postotak). Parodontna sonda se povlači duž linije gingivnog ruba i bilježi se prisutnost plaka s znakom plusa (+) [81].

GR je udaljenost od CEJ do slobodnog ruba gingive ili do ruba cervikalne restauracije. Izražava se u milimetrima [81].

TM se ocjenjuje pritiskom na zub s dvije drške metalnih stomatoloških instrumenata dok se zub pomiče u bukolingvalnom smjeru. Klasificira se prema Millerovoj ljestvici pokretljivosti zuba: 0, 1, 2 ili 3. Ocjena 0 implicira odsutnost pokretljivosti zuba ili fiziološku pokretljivost; rezultat 1 je pokazatelj pokretljivosti veće od fiziološke; ocjena 2 daje se kada je pokretljivost < 1 mm u vodoravnom smjeru; a ocjena 3 daje se kada je bukolingvalna pokretljivost > 1 mm, povezana s njegovim aksijalnim pomicanjem [82].

FD predstavlja opseg destrukcije alveolarne kosti u furkacijama višekorijenskih zuba. Više je različitih klasifikacijskih sustava, a jedan od najkorištenijih je klasifikacijski sustav prema Hamp-u, Nyman-u i Lindhe-u, koji se odnosi na horizontalni gubitak pričvrstka: 1: horizontalni gubitak pričvrstka < 3 mm ukupne širine područja furkacije; 2: horizontalni gubitak pričvrstka > 3 mm; i 3: destrukcija parodontnog tkiva koja obuhvaća ukupnu širinu područja furkacije [83].

CAL je udaljenost od CEJ do dna gingivnog sulkusa ili parodontnog džepa. Izražava se u milimetrima i opisuje položaj kliničkog pričvrstka u odnosu na njegovu fiziološku poziciju [81,84].

1.5.3 Utjecaj pušenja na parodontna tkiva

Povezanost pušenja i parodontitisa dobro je poznata već nekoliko desetljeća, a veliki broj studija nesumnjivo je pokazao da dim cigareta ima izrazito negativan učinak na parodontna tkiva. Činjenica da je osoba pušač povećava rizik od parodontitisa za 3 do 6 puta odnosu na nepušače [84].

Mlade osobe koje puše (od 19 do 40 godina) bez popratnih komorbiditeta, imaju 2,8 do 3,9 puta veću vjerojatnost da će imati parodontitis u odnosu na nepušače slične dobi. Zabilježen je i povećani rizik za nastanak destrukcije parodontnih tkiva koji je 3 do 14 puta viši [85].

Studije pokazuju da pušači imaju dublje parodontne džepove, veći klinički gubitak pričvrstka, veću recesiju gingive, veću prevalenciju furkacijskih defekata u višekorijenskih zuba, opsežniji gubitak alveolarne kosti i veći broj izgubljenih zuba u usporedbi s nepušačima [3,86,87].

Što je količina cigareta veća, a trajanje pušenja duže, to je i gubitak pričvrstka i alveolarne kosti veći. Također, takozvani “refraktorni” parodontitis (bez adekvatnog odgovora na liječenje) je u 90 % slučajeva češći u pušača, gubitak alveolarne kosti je četiri puta veći, a vjerojatnost gubitka zuba u odnosu na nepušače je viša za 3,5 puta [88].

Osim toga, povećane količine supragingivnih i subgingivnih naslaga kamenca su primjećene u pušača, što upućuje na činjenicu da pušenje cigareta utječe na povećanu akumulaciju dentobakterijskog plaka na zubima i njegovu posljedičnu mineralizaciju [89,90].

Pušenje cigareta utječe na učestalost, sam tijek, ali i progresiju parodontnih bolesti. Međutim, točan mehanizam djelovanja dima na parodont je još uvijek samo hipotetski [2].

Smatra se da uzrok povećane prevalencije parodontitisa kod pušača kombinacija odgovora domaćina, cijeljenja tkiva i učinka parodontnih patogena. Pušenje ima snažan utjecaj na krvožilni, imunološki i upalni sustav [3]. Kod pušača je krvarenje gingive minimalno ili izostaje, a ova činjenica često dovodi u zabludu jer upućuje na odsutnost upale, dok je stvarno stanje u potpunosti suprotno. Pušenje utječe na vazomotilitet krvnih žila, posebice na vazokonstrikciju kod teških i dugotrajnih, ‘kroničnih’ pušača duhana, ometa angiogenezu i smanjuje broj krvnih žila [3,87,90]. Krvarenje gingive ovisi o broju popušanih cigareta, a učinak pušenja doseže svoj plato kod 10-20 konzumiranih cigareta dnevno [90]. Međutim, neke studije daju i oprečne zaključke te nije do kraja razjašnjena razlika između kratkoročnog i dugoročnog učinka nikotina na vazomotilitet krvnih žila parodonta [91,92]. Poremećena i smanjena gingivalna mikrocirkulacija dovodi do potisnute perfuzije i smanjenog potencijala zacjeljivanja zbog ometanja revaskularizacije kosti i mekih tkiva, slabijeg odgovora na parodontnu terapiju te u konačnici lošije prognoze bolesti [3,87,90].

Pušenje kompromitira i ometa mnoge faktore uključene u odgovor imunološkog sustava na provokaciju bakterija. Pušači imaju povećani broj leukocita u krvi, međutim njihova sposobnost migracije u parodontna tkiva je smanjena. Nadalje, polimorfonukleari poput neutrofila i makrofaga, T-limfociti, IgG i NK stanice su smanjenog broja, ali i oslabljene funkcije fagocitoze. Njihova pokretljivost te stvaranje vodika i superoksida te ekspresija integrina i produkcija inhibitora enzima proteaze je promijenjena zbog utjecaja duhanskog dima [93,94]. Neutrofili u pušača imaju smanjenu kemotaksiju, fagocitozu i mogućnost prianjanja uz površinu, a samim time i smanjenu sposobnosti obrane od mikroorganizama. Kašnjenje neutrofila u regrutaciji i migraciji u tkiva dovodi do zakašnjelog akutnog imunološkog odgovora što omogućuje patogenima lakši ulaz u tkivo, rast i razmnožavanje [2,3,95]. Pušenje, odnosno nikotin i njegov metabolit kotinin, imaju štetne posljedice na rast i proliferaciju, ali i funkciju fibroblasta gingive, čime se ometa njihova sposobnost adhezije na površinu cementa korijena. Samim time dolazi do promjena u razini kliničkog pričvrstka, koji se nalazi apikalnije u odnosu na fiziološku razinu. Osim toga, nikotin djeluje stimulatивно na funkciju osteoklasta, njihovu aktivaciju i osteoklastičku aktivnost što dovodi do povećanog gubitka kosti u usporedbi s nepušačima [92,93]. Pri udisanju cigaretnog dima prvu liniju obrane predstavlja upravo sluznica usne šupljine nakon čega slijedi respiratorna mukoza. Sluznica na prvom mjestu predstavlja fizičku barijeru koja štiti ostatak organizma od toksičnih tvari i patogena, bilo putem mukocilijarnog transporta ili sekretornom funkcije stanice - izlučivanjem glikoproteina (citokina, interleukina) i ekspresijom liganda i različitih receptora na površini stanica putem kojih se odvija obrana domaćina. U slučaju prodora ove prve linije obrane, uključuju se domaćinove stanice imunološkog sustava: polimorfonukleari i makrofazi koje fagocitiraju i eliminiraju patogene [56,79,98]. Kao što je već ranije objašnjeno, kaskada nadolazećih aktivnosti je u pušača ometena i kompromitirana što rezultira nepovratnim oštećenjem parodontnih tkiva.

Kontinuirano, kronično udisanje cigaretnog dima s vremenom oslabljuje funkciju barijere epitelnih stanica, remeti mukocilijarni transport, utječe na lučenje citokina i kemokina, oslabljuje i kompromitira fagocitne sposobnosti polimorfonukleara i makrofaga, podržava i pojačava upalne procese ali i uzrokuje obrambeno pojačanu produkciju sluzi na površini tkiva. Zajedno, ti su učinci temeljna patofiziologija mnogih manifestacija bolesti povezanih s pušenjem [56].

Pušenje duhana prepoznato je kao modificirajući čimbenik u novoj, petoj, klasifikaciji parodontnih i periimplantatnih bolesti i stanja koja je donesena u studenom 2017. na Svjetskoj radionici u Chicagu koju su zajednički organizirale Američka akademija za parodontologiju (AAP) i Europska parodontološka federacija (EFP). Nova klasifikacijska shema s 10 glavnih promjena za parodontne i periimplantatne bolesti i stanja, karakterizirana višedimenzionalnim sustavom stupnjevanja i ocjenjivanja putem stadija i razreda je predstavljena kao zaključak ove radionice [79]. Sustavom stadija (I-IV) i razreda (A-C) parodontitis se klasificira prema težini i složenosti liječenja te uzima u obzir različite faktore vezane za pacijenta, njegove navike i bolesti koji su ključni za prognozu i plan liječenja [79]. Nova klasifikacija i njeni zaključci temeljeni su na pregledu i analizi literature, brojnih provedenih presječnih, longitudinalnih i intervencijskih studija, koje nedvojbeno staju u prilog negativnim posljedicama pušenja na parodontna tkiva. Klasifikacija je dala veći značaj pušenju kao okolišnom čimbeniku i dijabetesu kao sustavnoj bolesti, kao faktorima koji modificiraju parodontnu bolest, te su time potvrdili da je veza između pušenja i parodontitisa očita i dokazana. Nova klasifikacija definira pušenje cigareta kao modifikatora razreda parodontitisa i to na način da broj konzumiranih cigareta dnevno pomiče razred napredovanja bolesti čime se posebno naglašava utjecaj koji pušenje ima na brzinu progresije bolesti. Stupanj B podrazumijeva konzumaciju do 10 cigareta dnevno i umjereno napredovanje, a sve iznad te brojke je razred C koji označava brzu progresiju bolesti [79,99].

Prestanak pušenja je potvrđena i učinkovita strategija koja smanjuje rizik od parodontitisa. Bivši pušači imaju tek 1,88 puta više izgleda razviti teže oblike parodontitisa naspram trenutnih pušača gdje je ta vjerojatnost 4,8 puta veća. Prevalencija parodontitisa je gotovo slična u nepušača-25,6 % u odnosu na bivše pušače gdje je prevalencija 29,3%. U trenutnih pušača ona se penje na čak 45,1 %. Izgledi za gubitak zuba i potpunu bezubost su manji u bivših pušača naspram trenutnih i to 1.5 naspram 2,51 veće vjerojatnosti, a smanjujuju se što je vrijeme od prestanka pušenja dulje [100]. Prestanak pušenja poboljšava zdravlje parodonta na način da smanjuje upalu gingive i dubinu sondiranja parodontnih džepova, dok je gubitak kliničkog pričvrstka manji [101,102]. Posljedice prestanka pušenja su vidljive i na alveolarnoj kosti u vidu povećanja razine markera koji utječu na stvaranje kosti i poboljšanje koštane mase, što naglašava reverzibilnost mehanizma gubitka koštanog tkiva [103]. Osim toga, prestanak pušenja ublažava komplikacije povezane s kroničnim zdravstvenim stanjima, smanjuje mogućnost infekcije, lošeg cijeljenja rana i bolova, što u konačnici poboljšava ishode cijeljenja kosti [104,105]. Prestanak pušenja igra ključnu ulogu

u poboljšanju parodontnog zdravlja, promicanju boljih ishoda liječenja i smanjenju rizika od razaranja parodontnog tkiva i gubitka zuba povezanih s pušenjem [98]. Doktori dentalne medicine mogu odigrati ključnu ulogu na putu odvikavanja pacijenata od pušenja cigareta. Savjetovanjem, davanjem podrške i pružanjem važnih i recentnih informacija vezanih za oboljenja usne šupljine koje su direktna posljedica pušenja bi trebala biti integrirana u sustav oralne zdravstvene skrbi [26].

1.6 Mikrobiologija usne šupljine

Tijekom života sve površine ljudskog tijela koloniziraju različite vrste mikroorganizama. Usna šupljina, kao jedna od tih površina, snažno je kolonizirana raznim mikroorganizmima poput bakterija, protozoa, virusa, arheja i gljivica. Njihova heterogenost druga je po raznolikosti i složenosti, nakon debelog crijeva, u ljudskom organizmu [77,106,107]. Identificirano je više od 700 vrsta, od kojih je 400 vrsta pripadnika subgingivne flore iz parodontnih džepova, a preostalih 300 je nađeno na drugim površinama usne šupljine kao što su jezik, karijesne lezije, oralna sluznica i periapikalne lezije nastale iz infekcije zubne pulpe [76]. Mikrobiom usne šupljine, koji se definira kao 'zajednica svih mikroorganizama koji se mogu naći u usnoj šupljini do krajnje granice koji predstavlja distalni dio ezofagusa', neprestano se nadograđuje i mijenja, ali skladno koegzistira sa svojim ljudskim domaćinom [108]. Meka tkiva usne šupljine neprestano se ljušte i na taj način se kontrolira brojnost bakterija na takvim površinama. Tvrde površine poput zuba nemaju tu sposobnost, pa su pogodno mjesto za pričvršćivanje i razmnožavanje mikroorganizama i stvaranje dentalnog plaka (biofilma) [98].

1.6.1 Zubni plak i parodontopatogeni mikroorganizmi

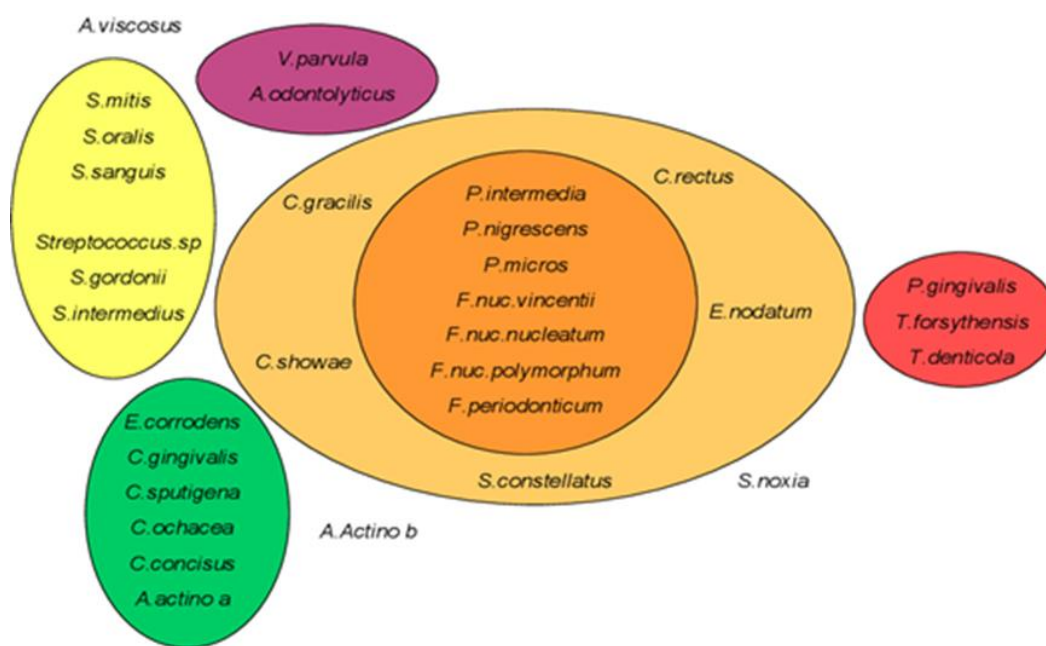
Zubni plak (biofilm) je složena i jako dobro organizirana zajednica bakterija koji se nalazi na zubima i koji je specifičan za usnu šupljinu. Biofilmovi se sastoje od jedne ili više populacija bakterija uloženi u matriks ili glikokaliks. Matriks se najvećim dijelom sastoji od vode i vodenih

otopina te egsopolisaharida. Procjenjuje se da u debljim plakovima broj bakterija prelazi brojku od 300 milijuna [98,109]. Upravo ta mogućnost bakterije da pripada većoj, multibakterijskoj zajednici joj omogućuje pričvršćivanje za podlogu, rast i razmnožavanje i izmjenu informacija koje ostvaruje takozvanim „quorum sensing-om“. „Quorum sensing-om“ se primjerice prenose informacije o rezistenciji na antibiotike. Sve te prednosti pojedine bakterijske vrste ne bi mogle ostvariti da su samostalne [110]. Upravo je nakupljanje bakterija na površini zuba odgovorno za dvije najčešće oralne bolesti u čovjeka – zubni karijes i parodontitis [77,78,111].

Disbioza u ovoj specifičnoj mikrobnjoj zajednici s obzirom na njen raspored, organizaciju i funkciju unutar dentalnog plaka omogućuje patogenim bakterijama da izraze svoje čimbenike virulencije i patogenosti i očituju svoj potencijal u progresiji parodontitisa. Za nastanak parodontitisa potreban je parodontni patogen, ali taj patogen mora biti u interaktivnoj suradnji i jedinstvu s drugim disbiotičkim mikrobima koji se nalaze u zubnom plaku [72,78,106]. Kao što je već spomenuto, parodontitis je multifaktorijalna bolest i za njegovu pojavu potrebno je zadovoljiti još nekoliko dijelova „slagalice“ osim prisutstva mikroorganizama [98,110,112]. Dentalni plak se može nalaziti iznad ili ispod gingivnog ruba, pa prema njegovoj lokalizaciji razlikujemo supragingivni i subgingivni plak. Supragingivni plak sadrži široku raznolikost bakterijskih taksona uključujući uglavnom aerobne bakterije kao što su *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Actinomyces sp.*, *Streptococcus sp.* i *Lactobacillus sp.* kao najdominantnije [113-115]. Subgingivni plak je anaerobno stanište i obiluje striktnim anaerobnim i proteolitičkim Gram pozitivnim bakterijama [116]. Osim tvrde stijenke - površine korijena zuba, subgingivni plak je vezan i na meku stijenku - stanice epitela parodontnog džepa te sadrži uglavnom spirohete i Gram negativne bakterije kao i plak vezan na tvrdu stijenku [117]. Razvojem patologije parodontnih tkiva, sastav subgingivnog plaka polako i postupno mijenja svoj kvalitativni i kvantitativni ustroj te postaje bogatiji uobičajenim parodontopatogenim bakterijama poput *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter* i drugih. Ove bakterije rijetko se nalaze u zdravlju, ali njihov broj polagano raste i kod pacijenata s gingivitisom, ukazujući da je gingivitis predstadij budućeg, mogućeg, parodontitisa [118].

Stvaranjem parodontnih džepova, kao znaka parodontitisa, sastav subgingivnog plaka prelazi u složeniju, napredniju i nadograđeniju zajednicu nakupljenu na površini korijena zuba. Međuovisnost i složenost unutar subgingivnog mikrobioma poznata je desetljećima. Socransky i

sur. su 1998. predstavili koncept bakterijskih kompleksa kodiranih bojom prema njihovoj ulozi u stvaranju zubnog plaka [6]. Plavi, žuti, zeleni i ljubičasti kompleksi rani su kolonizatori, dok se crveni i narančasti nalaze u zrelijim biofilmovima i povezuju s parodontitisom. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola* su pripadnici crvenog kompleksa, glavni i nezamjenjivi su uzročnici parodontitisa. Pripadnici narančastog kompleksa, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* sp. i *Parvimonas micra* također se često nalaze i povezani su s mikrobnim kompleksima u subgingivnom plaku osoba oboljelih od parodontitisa [6]. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotip b, *Selenomonas noxia* i *Actinomyces viscosus* nisu dio nijednog od poznatih bakterijskih kompleksa, niti su povezani međusobno ili s drugim kompleksima, no nastanjuju subgingivna mjesta u slučajevima kliničke parodontne bolesti (Slika 2) [119]. Pušenje kao važan čimbenik rizika za parodontitis ima znatan utjecaj na sastav subgingivne mikrobne zajednice [3].



Slika 2. Dijagram povezanosti bakterijskih vrsta između i unutar mikrobnih kompleksa

Preuzeto i prilagođeno iz: [119]

1.7 Utjecaj aerosola grijanog duhana na usnu šupljinu i oralni mikrobiom

1.7.1 Sastavnice aerosola emitiranog iz uređaja za zagrijavanje duhana

Aerosol emitiran iz uređaja za zagrijavanje duhana sadrži sličan broj štetnih i potencijalno štetnih sastojaka u odnosu na običnu cigaretu. Nikotin, katran, ugljikov monoksid, amonijak su i dalje prisutni u aerosolu, ali su koncentracije tih sastojaka prema nekim autorima ipak nešto niže u odnosu na koncentracije nađene u dimu klasične cigarete. Prema jednom istraživanju razine katrana i nikotina su apsolutno jednake u klasičnih cigareta i u uređaja za zagrijavanje duhana [24,28]. IQOS prema navodu PMI ne proizvodi katran zbog korištenja tehnologije grijanja, a ne sagorjevanjaduhana [37].

Studije ukazuju da je 62% manja koncentracija toksina nađena u aerosolu uređaja za zagrijavanje duhana dok je razina čestica (engl. *particulate matter*) bila do 75 % niža u odnosu na dim konvencionalne cigarete. Razine katrana i nikotina su približno jednake u odnosu na običnu cigaretu prema jednim autorima, dok je razina amonijaka, NAB-a i karbonila do 80% manja nego u dimu konvencionalne cigarete [28]. Prema jednom istraživanju aerosol IQOS-a sadrži najviše koncentracije nikotina i štetnih i potencijalno štetnih sastojaka u odnosu na druge uređaje za zagrijavanje duhana poput Glo i iFuse [120]. PMI u svojim izvješćima navodi da IQOS sadrži 40 od 93 štetnih i potencijalno štetnih sastojaka koji su navedeni na FDA listi. Međutim, status i razina za preostala 53 sastojka od kojih je 50 kancerogeno nije navedeno niti spomenuto. Osim toga, mjerenja su pokazala da postoji još 57 sastojaka koji nisu na FDA-inom popisu štetnih i potencijalno štetnih sastojaka, a od njih 57, razina čak 56 sastojaka je bila veća nego u običnim cigaretama. Razine su bile dvostruko više za 22 spoja i 7 puta više za 10 komponenti u odnosu na klasičnu cigaretu [120,121].

Prema ovim podacima, čini se da uređaji za zagrijavanje duhana, u ovom slučaju IQOS, izlaže konzumenta nižim koncentracijama nekih tvari, ali i povećava izloženost nekim drugim tvarima, za koje toksičnost i kancerogenost nije u potpunosti ispitana [24]. Primjerice, acenaften je nađen u koncentracijama koje su 295% više nego u konvencionalnim cigaretama, a učinak na ljudsko zdravlje još nije ispitan niti je poznat [24,121].

Osam hlapljivih organskih spojeva, trinaest policikličkih aromatskih ugljikovodika i ugljikov monoksid su nađeni u aerosolu IQOS-a. Ovi sastojci su produkt pirolize i termogene razgradnje duhana, te je zanimljivo da su detektirani i u aerosolu IQOS-a iako je temperatura grijanja duhana u IQOS-u (350°C) niža od konvencionalne cigarete (684°C) [121]. Njihove koncentracije jesu niže u aerosolu IQOS-a u odnosu na običnu cigaretu, ali se ipak ne smije zanemariti njihov postojeći kancerogeni i toksični potencijal. PMI je u jednoj usporedbi duhanskog umetka THS-a naspram obične cigarete ukazao da je razina štetnih i potencijalno štetnih kemikalija u duhanskom umetku za gotovo sve kemikalije manja od 95% (Slika 3)._Većina provedenih istraživanja koja daje zaključke o manjoj štetnosti THS uređaja s osvrtom na toksikologiju aerosola, su naručene od velikih tvrtki duhanske industrije poput PMI i BAT (20 od 31 studija) dok je nezavisnih studija jako malo. Takve studije uglavnom potvrđuju navode PMI vezano za sastav aerosola poput razine nikotina, ugljikovog monoksida i dr. Međutim, toksikologija i istraživanja utjecaja aerosola na ljudski organizam i evidentnost štetnih posljedica su malobrojne ili ih nema [24].

Štetni i potencijalno štetni sastojci (ŠPŠS)	Ref. cigareta	THS	Smanjenje ŠPŠS u THS vs ref. cigareta	KARCINOGEN	PLUĆNI TOKSIN	KARDIO-VASKULARNI TOKSIN	RAZVOJNI I REPRODUKTIVNI TOKSIN	ADIKTIVAN
ACETALDEHID	1641	215	86.9%	+	+			+
AKROLEIN	156	11.8	92.4%		+	+		
BENZEN	81.1	0.533	99.3%	+		+	+	
BENZO(A)PIREN	15	0.621	95.9%	+				
1,3-BUTADIEN	98.5	0.233	99.8%	+	+		+	
UGLJIKOV MONOKSID	30.2	0.447	98.5%				+	
FORMALDEHID	85.2	8.89	89.6%	+	+			
NNK	264	8.72	96.7%	+				
NNN	283	12.3	95.7%	+				

Slika 3. Prikaz odnosa toksičnih tvari iz obične cigarete naspram duhanskog umetka IQOS-a izražen postotkom i načinom koji djeluje na ljudsko zdravlje. Preuzeto i prilagođeno iz: [122]

1.7.2 Utjecaj aerosola grijanog duhana na usnu šupljinu i parodont

Usna šupljina i polimikrobne oralne zajednice koje se nalaze na njenim površinama prve dolaze u kontakt prilikom inhalacije duhanskog dima i aerosola pa je logično za pretpostaviti da svi potencijalni negativni ili pozitivni učinci će prvo biti vidljivi na oralnoj sluznici i oralnom mikrobiomu kao što je već spomenuto ranije [123,124].

Prema dostupnim podacima, aerosol IQOS-a je manje toksičan za oralne stanice u usporedbi s tradicionalnim cigaretama. Dim klasične cigarete smanjuje vitalnost, proliferaciju i migraciju oralnih stanica te proizvodnju upalnih medijatora, zaustavlja stanični ciklus i inicira apoptozu. Studija Pagana, Negri-ja i sur. zaključuje da je IQOS manje štetan za oralne fibroblaste i keratinocite te da ima utjecaja na smanjenu apoptozu ljudskih keratinocita [124]. Potencijal cijeljenja rana pod utjecajem 2,5 i 5% ekstrakta cigaretnog dima iz aerosola THS i dima klasične cigarete ispitan je *in vitro* na životinjskom modelu (stanica mišjeg fibroblasta L929) nakon postave dentalnih implantata. Analize su pokazale da aerosol THS i u nižim koncentracijama od 2,5% može biti toksičniji od dima obične cigarete, te se može smatrati čimbenikom rizika koji bi mogao ugroziti cijeljenje tkiva uz zubne implantate [125]. Laboratorijski testovi potvrđuju prisutnost kancerogenih i upalnih biomarkera u konzumentata THS-a i električnih cigareta što ide u prilog štetnom utjecaju ovakvih sustava na potporni aparat zuba i periimplantantnu mukožu [126,127].

Uporaba grijanih duhanskih proizvoda je povezana s određenom većom učestalosti parodontitisa u ispitanika u usporedbi s onima koji ih nikada nisu konzumirali. Međutim, bivši korisnici, pušači običnih, klasičnih cigareta i korisnici koji kombiniraju više različitih duhanskih proizvoda su pokazali istu tendenciju prevalencije ove bolesti kao i korisnici THS-a. Može se zaključiti da konzumacija bilo kakvih duhanskih proizvoda povećava učestalost parodontitisa u odnosu na nepušače [128,129].

Nekoliko je intervencijskih studija koje su provedene na korisnicima THS-proizvoda a koje analiziraju odgovor parodontnih tkiva nakon provedene inicijalne parodontne terapije. Rezultati ukazuju na umjereno štetan učinak aerosola THS proizvoda u odnosu na dim cigarete i aerosol e-cigarete mjerljiv parodontnim indeksima, dok je razina upalnih citokina bila na srednjim razinama

u odnosu na ostale skupine [130]. Prema studiji Pouly i sur. učinak inicijalne parodontne terapije u pušača cigareta i THS korisnika je jednak, te se zaključuje da povoljni učinci terapije mogu biti ostvareni jedino u slučaju modificiranja čimbenika rizika za parodontitis kojeg predstavlja pušenje [131]. Osim intervencijskih studija, provedeno je i nekoliko opažajnih istraživanja, poput ono Kuzniak i sur. koje sugerira da konzumenti THS proizvoda imaju veću učestalost i ozbiljnije oblike parodontitisa u odnosu na nepušače [132].

Opažajnih (opservacijskih) istraživanja koja su fokusirana isključivo na striktno pušače cigareta, striktno konzumente THS proizvoda i striktno nepušače prije bilo kakvih terapijskih intervencija nema. Istraživanja o dugoročnim učincima IQOS-a na zdravlje parodonta su još uvijek u tijeku, s proturječnim nalazima koji proizlaze iz različitih studija. Dok japanska studija ima za cilj ukazati na povoljne promjene vidljive kroz parodontne indekse kod pacijenata s kroničnim parodontitisom (dijagnoza prema klasifikaciji parodontnih bolesti iz 1999.) koji prijeđu na korištenje THS proizvoda u usporedbi s nastavkom pušenja [133], studija iz Ukrajine sugerira da uporaba sustava za zagrijavanje duhana poput IQOS-a može dovesti do lošije oralne higijene korisnika, smanjene otpornosti na karijes i povećanog intenziteta karijesa te veće prevalencije parodontnih bolesti [134].

Duhan i sve vrste različitih duhanskih proizvoda dostupnih na tržištu imaju štetan učinak na ljudsko zdravlje. SZO i Europsko respiratorno društvo (engl. *European Respiratory Society*, ERS) navode da su svi duhanski proizvodi bez iznimke, pa tako i oni grijani, štetni. Grijani duhanski proizvodi također stvaraju ovisnost te prema provedenim studijama imaju kancerogeni potencijal po ljudske stanice, štetni su za pluća i ljudsko zdravlje baš poput običnih cigareta [135,136].

1.7.3 Utjecaj dima cigarete i aerosola uređaja za zagrijavanje duhana na oralni mikrobiom

Mikrobiološka raznolikost površine bukalne sluznice je pod snažnim utjecajem duhanskog dima. Naime, cigaretni dim mijenja njenu alfa raznolikost, kvalitativan sadržaj, pa obzirom na takav utjecaj na mikroorganizme sluznice, možemo pretpostaviti da se nešto slično može dogoditi i u zubnom biofilmu [137]. Studija iz 2020. koja je istraživala prevalenciju parodontnih patogena u

zdravih mladih odraslih pušača cigareta otkrila je da su razine *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium nucleatum* u pušača i nepušača zapravo vrlo slične [138]. Prevalencija parodontnih patogena u gingivnim sulkusima zdravih ljudi koji puše usko je povezana s količinom cigareta kao i pušačkim statusom. Što je dulje razdoblje pušenja i veća konzumacija cigareta, to je veća količina prisutnih parodontnih patogena [3,138]. Crveni i narančasti kompleksi mikroorganizama prisutniji su u subgingivnom području pušača koji boluju od parodontitisa, nego kod bivših pušača ili onih koji nikad nisu pušili. Također, rodovi *Prevotella*, *Campylobacter*, *Aggregatibacter* i *Haemophilus* bili su rjeđi u pušača. Zanimljivo je da je *Neisseria elongata* češća kod nepušača, dok je kod pušača u većim količinama pronađeno 5 drugih rodova *Neisseria* [139,140].

Kod pacijenata koji boluju od agresivnog parodontitisa (dijagnoza prema klasifikaciji parodontnih bolesti iz 1999.) – koji se danas povezuje s dijagnozom parodontitisa tipa kutnjak-sjekutić iz „nove klasifikacije“ - pušenje cigareta ima izravan učinak na kemotaksiju i funkciju polimorfonuklearnih stanica (PMN) i makrofaga, smanjenje razine IgG i T-limfocita i NK stanica. Dim obične cigarete potencira rast parodontnih patogenih vrsta kroz takve modifikacije i manipulacije imunološkog sustava [95].

Studije o utjecaju THS aerosola na oralni ili subgingivni mikrobiom do sada nisu dovoljno istražene. Velika većina studija koje su istraživale utjecaj alternativnih duhanskih proizvoda na usnu šupljinu uglavnom se odnosi na e-cigarete, dok su studije o sustavu zagrijavanja duhana oskudne. Pušenjem sustava za zagrijavanje duhana smanjuje se broj rezidentne mikroflore plaka uzete s cervikalnih rubova zuba, dok se istovremeno povećava broj oportunističkih bakterija. Osim toga, aerosol takvih uređaja utječe i na kvalitativan i kvantitativan sastav rezidentne mikroflore u vidu povećane raznolikosti u odnosu na pušače. *Corynebakterije*, *Neisserie* i oportunistički streptokoki imaju veći stupanj kolonizacije u odnosu na druge bakterije. *Candida albicans* je češće nađena u pušača THS nego u nepušača što može predstavljati potencijalnu opasnost od razvoja oralne kandidijaze u te skupine pušača [141].

1.8 Analiza subgingivnog mikrobioma

Istraživanje subgingivalnog mikrobioma započelo je još krajem 19. i početkom 20. stoljeća. Godina 1975. je bila ključna za razumijevanje povezanosti parodontitisa i subgingivnih bakterija. Naime, tada su Page i Schroeder predstavili svoj model parodontne bolesti koji je podrazumijevao invaziju bakterija i imunološki odgovor domaćina. Istraživanja su se nastavila 1970-ih i 1980-ih te se utvrdilo da su specifične bakterije poput *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia* u direktnoj vezi s parodontitisom. [142-144].

Početkom 2010. godine metoda sekvenciranja nove generacije (engl. *Next generation sequencing* - NGS) počela se koristiti u svrhu istraživanja utjecaja subgingivnog mikrobioma na parodontna tkiva i njihova oboljenja. Ova molekularna metoda omogućila je detaljniju analizu mikrobioma i identifikaciju kompleksnih bakterijskih zajednica u subgingivnom plaku nego što je to bilo moguće s prethodnim metodama, poput kultivacije bakterija, koje su davale zbunjujuće, kontadiktorne i ograničene rezultate [145,146]. Rezultati sekvenciranja slijedeće generacije ne samo da su dali uvid u veći broj parodontopatogenih bakterija već su i olakšale razumijevanje interakcija unutar dentalnog biofilma [147,148]. Istraživanja koja koriste ovakvu metodu sekvenciranja s vremenom su postala ekonomski dostupnija, vremenski gledano brža i detaljnija, obzirom na činjenicu da se neke bakterijske vrste ne mogu kultivirati ili je kultivacija vrlo teška [148]. Dva su osnovna pristupa istraživanju mikrobioma: korištenjem marker gena kao što je 16S rRNA gena ili komparacija sekvenci dobivenih *whole genome shotgun* sekvenciranjem s referentnim sekvencama [149].

Zbog činjenice da brojne bakterijske vrste, kao što je već navedeno, nisu kultivabilne ili je njihova kultivacija teška, sekvenciranje 16S rRNA gena je metoda izbora u slučajevima detekcije specifičnih bakterija u većim zajednicama poput dentalnog plaka [149,150].

1.8.1 Metoda sekvenciranja nove generacije (engl. *Next generation sequencing*-NGS)

Sekvenciranje je metoda u genetici kojim se utvrđuju slijedovi nukleotida u lancu DNA (deoksiribonukleinska kiselina). Metode nove generacije sekvenciranja razvile su se 2005. godine kako bi uklonile nedostatke prve generacije, a koje se najviše odnose na vrijeme i cijenu sekvenciranja [151]. Osnovne prednosti novih generacija sekvenciranja prvenstveno su brzina i mogućnost paralelnog čitanja više milijuna sekvenci u odnosu na prvu generaciju koja je mogla čitati najviše 300-1200 parova baza (pb). Relativno niski troškovi i manja količina DNA koja je potrebna u odnosu na prvu, Sangerovu metodu, su dodatni aduti ove metode. Koristan su alat u kliničkoj dijagnostici, prognozi i terapiji nasljednih bolesti, karcinoma i infektivnih bolesti [152].

Liječenje parodontitisa korištenjem ovakvog molekularnog alata omogućuje točno 'iskrojene' i isplanirane, individualno osmišljene terapijske planove za određenog pacijenta pri čemu se uzimaju u obzir genetski faktori, okolišni čimbenici, način života i informacije dobivene konvencionalnim medicinskim pregledom [153].

Nedostaci i ograničenja sekvenciranja slijedeće generacije jesu velika količina dobivenih podataka čija je analiza dugotrajna i zahtjeva bioinformatičke softvere za analizu podataka kao i educiranu osobu koja će provesti bioinformatičku analizu te interpretirati dobivene podatke. Oprema za analizu je cjenovno izazovna jer potražuje i brze računalne sustave koji mogu obraditi veliku količinu podataka [148,154].

Svaka od tehnologija NGS ima svoj princip funkcioniranja i sekvenciranja. Metodološke razlike između tih osnovnih koraka, koje se mogu naći, su specifične za određenu platformu [112].

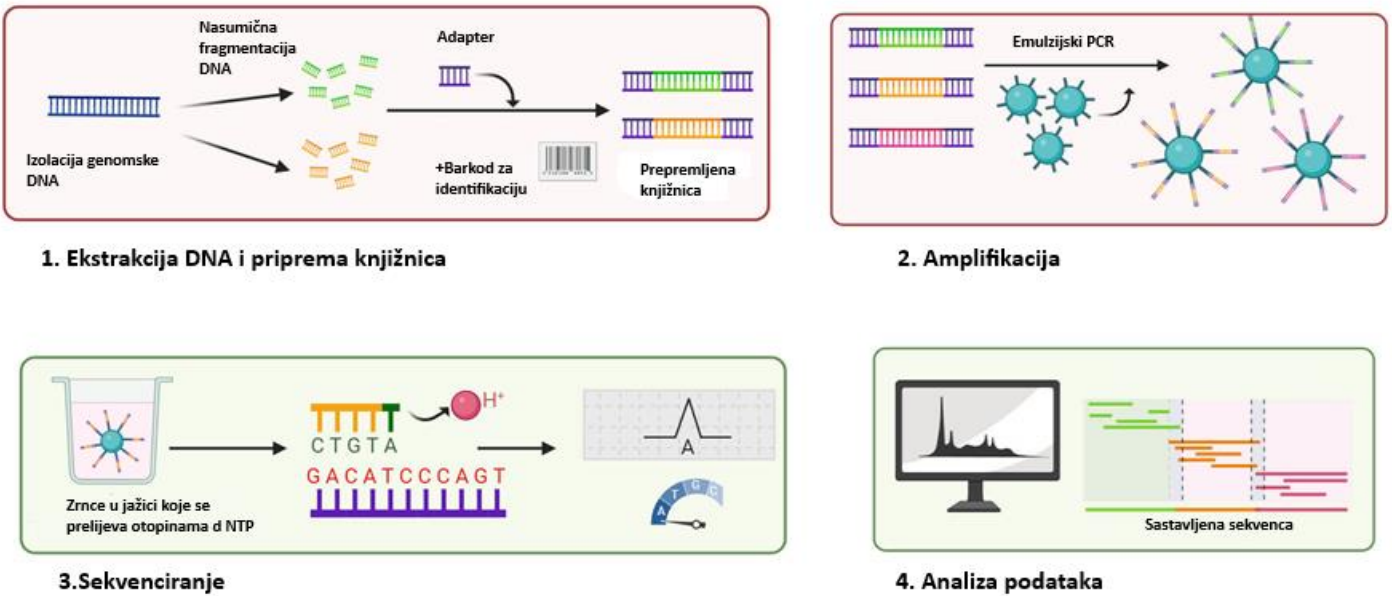
1.8.2 Ion Torrent tehnologija

Ion Torrent tehnologija sekvenciranja nove generacije (Thermo Fischer Scientific) je jedna od metoda koja se bazira na tehnologiji semikonduktorskih čipova i detekciji promjene pH tijekom inkorporacije pojedinog nukleotida u novi lanac DNA. Fragmentirana molekula DNA sa

specifičnim adapterskim sekvencama pričvršćena je na magnetna zrnca - *Ion sphere Particles* (ISP). Klonalna amplifikacija odvija se putem emulzijske PCR (engl. *emulsion polymerase chain reaction*) na ISP zrcima. Zrnca potom sjedaju u mikrojažice na semikonduktorskom čipu, prelijevaju se otopinama različitih nukleotida te se prilikom ugradnje pojedine baze u lanac otpušta vodikov ion. Time dolazi do promjene pH na senzoru na dnu jažice, te se kemijski signal prevodi u digitalni. Ova tehnologija ima sposobnost direktnog prevođenja nukleotidnog niza u digitalnu informaciju na semikonduktorskom čipu (Slika 4). Vrijeme izvođenja je kratko (2-7 sati) i u usporedbi s drugima ta je tehnologija brža, jednostavnija i jeftinija [151,155]. Glavni nedostatak je teškoća u tumačenju nizova homopolimera koji imaju više od 6 parova baza što dovodi do pogreški u insercijama i delecijama (indel) sa stopom od otprilike 1%, taj nedostatak se zaobilazi pojedinačnom kontrolom diskutabilnih homopolimernih sekvenci [155].

Pregled metodologije i Ion Torrent tehnologije- ključni koraci za analizu mikrobioma plaka:

1. Prikupljanje i pohrana uzoraka
2. Izolacija (ekstrakcija) bakterijske DNA
3. Amplifikacija hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena
4. Priprema knjižnica
8. Priprema *template*-a
9. Sekvenciranje knjižnica
10. Računalno sastavljanje sekvence
11. Bioinformatička analiza



Slika 4. Prikaz koraka Ion Torrent tehnologije sekvenciranja

Preuzeto i prilagođeno iz: [156]

1.8.3 Prikupljanje i pohrana uzoraka

Prvi, osnovni i važan korak je adekvatno prikupiti uzorak a da se pritom molekula DNA ili RNA (ribonukleinska kiselina) ne ošteti. DNA je stabilna molekula i nema posebno strogo definiranih pravila što se pohranjivanja tiče, međutim njena izolacija je uspješnija ako se sačuva u vodenoj otopini (fiziološka otopina, Tris-EDTA pufer (tris(hidroksimetil)aminometan - etilen-diamin-tetraoctena kiselina), Tris-HCL (tris(hidroksimetil)aminometan-hidroklorid)) [150,157]. Nakon prikupljanja, uzorke je potrebno ili odmah analizirati ili pohraniti na određenim temperaturama u za to predviđenim hladnjacima (-20 °C ili -80 °C). Ono najbitnije je da uzorke nije dopušteno odmrzavati te ponovno zamrzavati zbog opasnosti od degradacije molekule DNA [150].

1.8.4 Izolacija (ekstrakcija) bakterijske DNA

Izolacija nukleinskih kiselina može se provoditi manualno ili automatizirano u za to prikladnim robotiziranim aparatima. Obje metode imaju svoje prednosti i nedostatke.

DNA sadrži genetski materijal koji se nalazi u staničnoj jezgri svih živih bića. Dovoljne su vrlo male količine molekule DNA da bi se ista mogla analizirati. Može se izolirati iz različitih tkiva, seruma, kosti, zuba, sline, briseva bukalne sluznice, nazofarinksa, uzoraka supragingivnog i subgingivnog plaka [149].

Postupak izolacije DNA podrazumijeva nekoliko koraka [158]:

1. LIZA STANICE: Staničnu stijenku bakterija potrebno je lizirati jednom ili kombinacijom više metoda (mehaničkom obradom, kemijskom i/ili enzimskom). Liza stanice se najčešće odvija upotrebom detergenata (Tween 20, natrijev dodecil sulfat (SDS), lizirajućih pufer (npr. Tris- HCL-a) i /ili enzima (lizozim i Proteinaza K) te EDTA (etilen diamin tetraoctena kiselina) [157].
2. ISPIRANJE NEČISTOĆA I PRECIPITACIJA DNA: Ovako pripremljena pročišćena otopina koja sadrži uzorak DNA, se u različitim vremenskim intervalima inkubira na temperaturama od 37-60 °C [157,158]. Slijedi precipitacija DNA molekule upotrebom hladnog apsolutnog etanola (99,6%, *pro analisi ethanol*), koja omogućuje spiralizaciju i taloženje molekule DNA [159].

Nakon izolacije DNA, provjerava se njezina čistoća te koncentracija spektrofotometrom što je neophodno za kasniji korak amplifikacije hipervarijabilnih regija 16S rRNA i sekvenciranja [159].

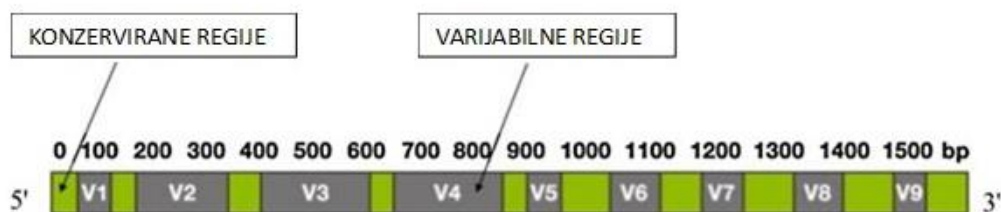
Komercijalno dostupni kitovi za ekstrakciju nukleinskih kiselina sadrže sve potrebne reagense i materijale za izolaciju DNA iz različitih bioloških uzoraka, poput krvi, tkiva, bakterija, virusa, biljaka itd. Oni su dizajnirani za olakšavanje i standardizaciju postupka izolacije nukleinskih kiselina (uključuju detaljne protokole), čime se postiže visoka čistoća i kvaliteta izoliranog

materijala [160]. Usporedbom modificiranih protokola izolacije i standardnih protokola komercijalno dostupnih kitova, dobiveni su uspješniji rezultati modificiranih protokola u vidu većeg prinosa DNA od komercijalnih [161].

1.8.5 Analiza 16S rRNA gena

16S ribosomska RNA (ribosomalna ribonukleinska kiselina) je neizmjereno važna u identifikaciji bakterija [162]. 16S rRNA gen je dugačak otprilike 1500 pb i najčešće je korišten marker za taksonomiju bakterija. Ovi geni su prisutni u gotovo svih prokariota te su najmanje varijabilni unutar bakterijskog genoma. Sastoje se od naizmjeničnih hipervarijabilnih i nevarijabilnih (konzerviranih) regija i dovoljno su raznoliki da dozvoljavaju razlikovanje pojedinačnih bakterijskih vrsta [162].

Bakterijski gen za 16S rRNA sadrži devet hipervarijabilnih regija označenih kao V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 i V9 koje se koriste u taksonomiji bakterija na razini roda ili vrste u multibakterijskim uzorcima kao primjerice u dentalnom plaku (Slika 5) [163,164].



Slika 5. Ilustracija regija unutar 16S rRNA gena

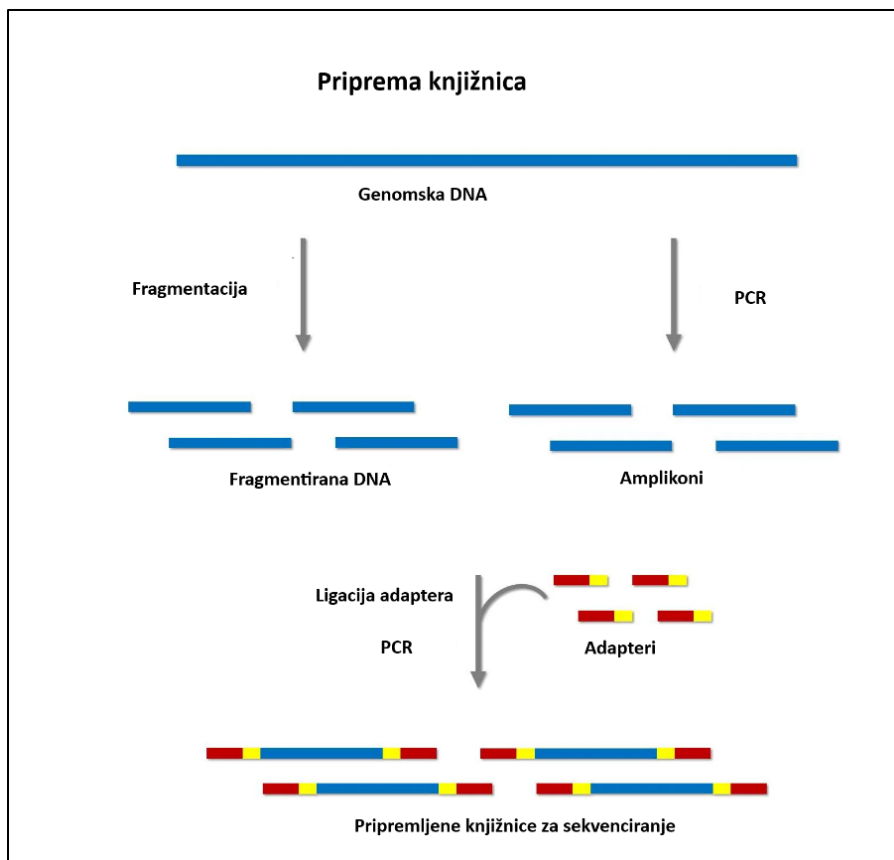
Preuzeto i prilagođeno iz: [165]

Izbor hipervarijabilne regije koja će se amplificirati PCR (lančana reakcija polimerazom, engl. *polymerase chain reaction*) metodom ovisi o cilju istraživanja. V1 regija daje najbolje rezultate u razlikovanju *Staphylococcus aureus*, V2 i V3 regije najprikladnije su za analizu svih bakterijskih vrsta do razine roda, osim u blisko srodnih enterobakterija. V6 regija može dati uvid u razlikovanje većine bakterijskih vrsta osim *Enterobacteriaceae*. Ostale regije – V4, V5, V7 i V8, ako su uključene same ne daju dovoljno dobre rezultate [166]. Zbog velikog broja različitih bakterija, nužno je uzeti veći broj hipervarijabilnih regija u obzir kako bi osigurali pouzdanost i točnost dobivenih rezultata [167].

Sekvenciranje 16S rRNA najčešće se koristi za identifikaciju sojeva, patogena neobičnog fenotipa, koje je teško ili nije moguće identificirati prema biokemijskom profilu ili konvencionalnim fenotipskim metodama, za detekciju vrsta koje rijetko povezujemo s bolestima u ljudi te za sporo rastuće i nekultivabilne uzročnike.

1.8.6 Amplifikacija hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena i priprema knjižnica

Faze amplifikacije (umnožavanja) hipervarijabilnih regija 16S rRNA i kreiranje knjižnica predstavljaju pripremne radnje za sekvenciranje. Postupak pripreme barkodiranih knjižnica podrazumijeva ligiranje univerzalnih adaptera i barkodova na krajeve jednolančanih fragmenta DNA koji završavaju parom nukleotidnih baza (Slika 6). DNA „barkod“ je kratka sekvenca DNA (500 – 1000 pb) koja je specifična i jedinstvena za određeni uzorak te omogućuje njegovo razlikovanje od ostalih, unutar istog sekvenciranja. Tijekom bioinformatičke analize, softver koristi ove barkodove za ispravno razvrstavanje sekvenci. Svrha i cilj pripreme knjižnica jest postizanje što bolje konzistentnosti i reproducibilnosti s minimalnim varijacijama [168,169].

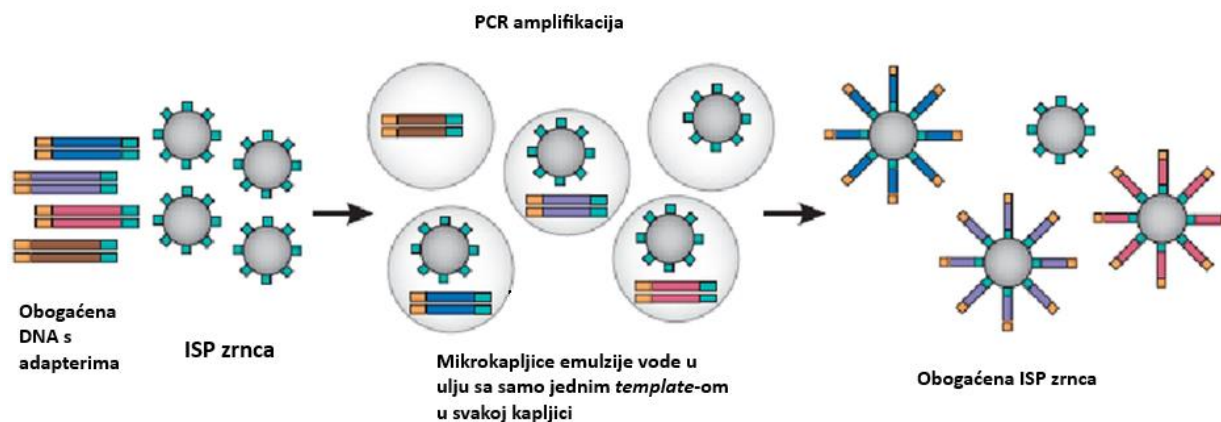


Slika 6. Prikaz pripreme knjižnica

Preuzeto i prilagođeno iz: [170]

1.8.7 Priprema *template*-a

Pripremljene knjižnice kod Ion Torrent tehnologije se klonalno amplifiraju emulzijskim PCR-om (engl. *Emulsion polymerase chain reaction*) sve dok ISP magnetno zrnce nije puno identičnih jednolančanih fragmenata DNA. Emulzijski PCR odvija se u mikrokapljici. 1 mL ulja PCR reakcije, uz korištenje posebnog aparata, raspršuje se u tisuće mikro kapljica. Rezultat je PCR produkt amplificiran od jedne molekule iz knjižnice. Takva zrnca se nazivaju monoklonskim obogaćenim zrcima jer sadrže milijune klonova oligonukleotidnih sekvenci samo jedne molekule DNA (Slika 4, Slika 7) [148,171].



Slika 7. Emulzijski PCR

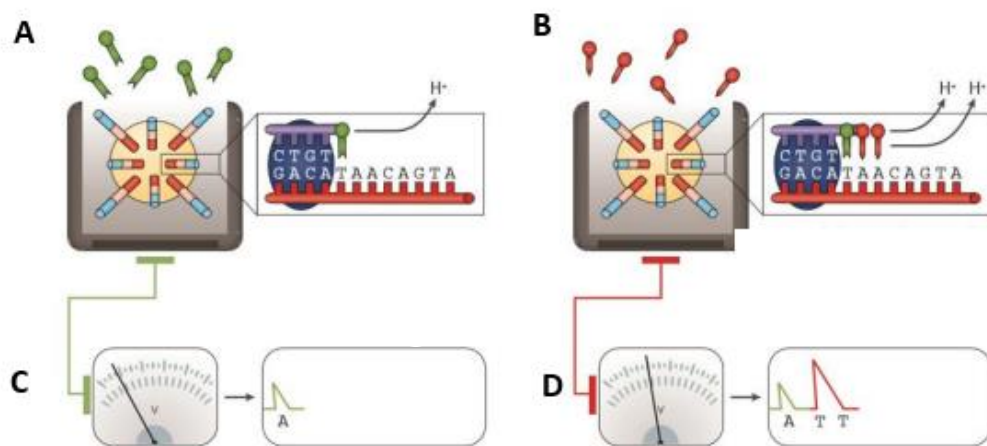
Preuzeto i prilagođeno iz: [172]

Amplikone (umnožene hipervarijabilne regije bakterijskog genoma) koji su dobiveni emulzijskim PCR-om, potrebno je pročitati, kvantificirati i sekvencirati [173].

1.8.8 Sekvenciranje i računalno sastavljanje sekvence

Sekvenciranje kod Ion Torrent platforme se vrši na način da dobiveni fragmenti knjižnice djeluju kao *template* preko koje se vrši sinteza novog DNA fragmentnog lanca. Magnetna zrnca ISP s klonalnim DNA fragmentima sjedaju u milione jažica na semikonduktorskom čipu, prelijevaju se reagensima za sekvenciranje suspenzijom DNA polimeraze i jednog po jednog nukleotida A(adenin), T(timin), C(citozin) ili G(guanin) [155]. Kada odgovarajući nukleotid prepozna svoju komplementarnu bazu i ugradi se u lanac DNA, dolazi do oslobađanja protona-vodikovog iona, čime dolazi do promjene pH i promjene voltaže. Tu promjenu pH detektira senzor koji ga prevodi u digitalni signal A, T, C ili G, odnosno dolazi do čitanja ciljne sekvence. Kada se u dva susjedna nukleotida inkorporira isti nukleotid iz prelijevajuće otopine, dolazi do oslobađanja dva vodikova

iona te se tada voltaža udvostruči (Slika 8) [148,154,171]. Dobiveni podaci se tada bioinformatičkom obradom i analizom uspoređuju s sekvencama hipervarijabilnih regija koje su pohranjene u javnim bazama podataka poznatih organizama kao što su NCBI (National Center for Biotechnology Information), RDP (Ribosomal Database Project), Silva i druge [174,175].



Slika 8. Ion Torrent sekvenciranje

Preuzeto i prilagođeno iz [211].

1.8.9 Bioinformatička analiza (Analiza i obrada dobivenih podataka sekvenciranjem)

Bioinformatičku analizu vrši posebno educirano osobe koje je kvalificirano raditi s sofisticiranim bioinformatičkim softverima. Bioinformatička analiza podrazumijeva korištenje bioinformatičkih platformi - skupa različitih programa i alata poput QIIME 2, Ion reporter software, Mothur, RDP i drugih, kako bi generirali i interpretirali dobivene rezultate dobivene sekvenciranjem 16S rRNA gena [154,171,176-178]. Software kao konačni rezultat daje prikaz OTU/ASV tablice (engl. *operational taxonomic unit /amplicon sequence variants*), tablicu svojstava (engl. *FeatureTable[Frequency]*) i reprezentativne sekvence (engl. *FeatureData[Sequence]*) koji se dalje mogu analizirati. Taksonomska klasifikacija, određivanje mikrobne raznolikosti te statistička

obrada su daljnji koraci u ovom procesu analize [179,180]. Taksonomska klasifikacija daje prikaz željene taksonomske razine ili pak prevalenciju specifične taksonomske grupe. Distribucija evolucijski udaljenih vrsta u uzorcima vidljiva je kroz prikaz filogenetičke raznolikosti, odnosno alfa i beta raznolikosti [179-181]. Alfa i beta raznolikost se prikazuju Faithovom filogenetičkom raznolikosti, Shannonovim indeksom, *evennes* i *observed* OTUs/ASVs metrikom, a beta raznolikost prikazuje se Jaccard, Bray-Curtis te UniFrac distancom koja može biti težinska (engl. *weighted*) ili netežinska (engl. *unweighted*) [179,180]. Beta raznolikost generira analizu glavnih koordinata (engl. *Principal Coordinates Analysis plot* (PCoA)) - trodimenzionalnu vizualizaciju koja pruža informaciju o sličnosti uzoraka [179–181].

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi:

1. Utvrditi i usporediti parodontni status, putem parodontnih indeksa PPD (*engl. Probing Pocket Depth*, hrv. dubina sondiranja parodontnog džepa), opseg krvarenja u ustima FMBS (*engl. Full mouth bleeding score*), opseg plaka u ustima FMPS (*engl. Full mouth plaque score*), GR (*engl. Gingival Recession*, hrv. recesija gingive), TM (*engl. Tooth Mobility*, hrv. mobilnost zuba), FD (*engl. Furcation Defect*, hrv. furkacijski defekt), CAL (*engl. Clinical Attachment Level*, hrv. razina kliničkog pričvrstka) između skupina nepušača, pušača cigareta i pušača bezdimnih cigareta (IQOS).
2. Analizirati mikrobiološki profil subgingivne flore nepušača, pušača cigareta i pušača bezdimnih cigareta (IQOS) na razini bakterijske vrste (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Prevotella intermedia, Parvimonas micra, Campylobacter rectus, Fusobacterium nucleatum, Treponema denticola, Eubacterium nodatum*) kao i odrediti i usporediti ukupno bakterijsko opterećenje u sve tri skupine.

Specifični ciljevi:

1. Ispitati jesu li parodontopatogene bakterije crvenog i narančastog kompleksa češće prisutne u pušača običnih cigareta s parodontitisom nego kod korisnika bezdimnih cigareta s parodontitisom i nepušača s parodontitisom
2. Istražiti je li prisutvo parodontopatogena u zdravih pušača IQOS-a veće u usporedbi s zdravim nepušačima, ali manje u odnosu na zdrave pušače običnih cigareta
3. Procijeniti utječe li grijani duhan na smanjenu brojnost i raznolikost subgingivnog mikrobioma u odnosu na pušače običnih cigareta i nepušače

Hipoteze istraživanja:

1. Subgingivno bakterijsko opterećenje parodontopatogenim bakterijskim vrstama je manje u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače klasičnih cigareta, ali više nego u nepušača
2. Vrijednost dubine sondiranja parodontnog džepa (PPD) je manja u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače klasičnih cigareta, ali veća ili jednaka nepušačima
3. Opseg krvarenja u ustima (FMBS) je veća u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače cigareta, i veća ili jednaka nepušačima
4. Vrijednost recesija gingive (GR) je manja u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače klasičnih cigareta, ali veća ili približno jednaka nepušačima
5. Mobilnost zuba (TM) je manja u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače cigareta, ali veća ili jednaka nepušačima
6. Opseg plaka u ustima (FMPS) je manji u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače klasičnih cigareta, ali veći ili jednak nepušačima
7. Pušači cigareta imaju više furkacijskih defekata (FD) u odnosu na pušače bezdimnih cigareta i nepušače
8. Razina kliničkog pričvrstka (CAL) je veća u pušača klasičnih cigareta u odnosu na pušače bezdimnih cigareta i nepušače

Svrha istraživanja je dokazati da novi način konzumacije duhana zagrijavanjem u sustavu THS-a ne utječe štetno na parodontna tkiva kao što to čini duhan koji izgara prilikom konzumacije obične cigarete, te da je mikrobiom u pušača THS-a drugačiji u odnosu na pušače cigareta, odnosno da postoji razlika u ukupnom bakterijskom opterećenju i količini specifičnih parodontopatogena. Očekuje se da je ukupno bakterijsko opterećenje manje u pušača THS-a kao i brojnost specifičnih parodontopatogena.

3 ISPITANICI I METODE

Istraživanje je dizajnirano kao presječno opažajno bez intervencije i provedeno je na Odjelu za parodontologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka (KBC) i Katedri za parodontologiju Fakulteta dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci u razdoblju od 1. lipnja 2022. godine do 1. lipnja 2023. godine. Ispitanici koji su pristali sudjelovati u istraživanju ispunili su i potpisali obrazac informiranog pristanka. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške Deklaracije i odobreno od Etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka (2170-29-02/1-23-2) 6. ožujka 2023. i Fakulteta dentalne medicine (2170-137-006-01-23-60) 4. travnja 2023. Istraživanje je registrirano u međunarodnoj bazi kliničkih istraživanja ClinicalTrials.org pod rednim brojem NCT06480877.

3.1 Ispitanici

Ovo istraživanje sa stratifikacijom uzorka prema izloženosti duhanu i prisutnosti parodontitisa inicijalno je obuhvatilo 66 pacijenata koji su došli na prvi pregled na jedan od šest Odjela Klinike. Odjeli koji su bili uključeni u ovo istraživanje su: Odjel za parodontologiju, Odjel za oralnu medicinu, Odjel za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju, Odjel za stomatološku protetiku, Odjel za ortodonciju i Odjel za oralnu kirurgiju. Formirane su tri skupine ispitanika (svaka N=22): I) ispitanici koji puše obične (klasične) cigarete, II) korisnici uređaja za zagrijavanje duhana (THS) i III) nepušači.

Prvo je formirana skupina korisnika THS-a, budući da su manje brojni, a zatim uparena prema dobi i spolu s nepušačima i pušačima cigareta.

Ispitanici su na temelju parodontološkog pregleda i dijagnostike dalje razvrstani u podskupine onih s parodontitisom (P) i onih bez parodontitisa.

Uključujući faktori

Kriteriji za uključivanje u studiju su dobro opće zdravstveno stanje, zdrava sluznica usne šupljine (odsustvo bilo kakvih lezija ispod, u razini i iznad razine oralne sluznice), sanirano zubalo i prisustvo minimalno 20 zuba u usnoj šupljini. U istraživanje su uključeni pušači običnih cigareta, pušači bezdimnog sustava za zagrijavanje duhana IQOS i nepušači. Pušači su morali ispuniti kriterij pušačkog staža od najmanje 3 godine (obične cigarete ili THS uređaj) i dnevne konzumacije koja ne smije biti manja od 5 cigareta ili 5 duhanskih umetaka THS uređaja (HeetStick ili HEETS) po danu. Odabrani ispitanici I. skupine su isključivo i samo pušači cigareta dok je isto pravilo vrijedilo za THS korisnike kao skupinu II. III. skupina je kontrolna skupina koju čine subjekti koji nikada nisu pušili ni klasične cigarete niti su koristili THS sustav, odnosno imaju status nepušača.

Isključujući faktori

Maloljetnici, trudnice, ispitanici koji koriste oralne probiotike, ispitanici koji su bili pod antibiotskom terapijom u zadnjih šest (6) mjeseci, ispitanici koji svakodnevno koriste oralnu terapiju antisepticima na bazi klorheksidina, osobe pod imunosupresivnom terapijom, ispitanici pod bilo kojom medikamentoznom terapijom i ispitanici koji su bili na prethodnoj parodontnoj terapiji nisu uključeni u istraživanje.

Kriteriji isključenja koji su uzeti u obzir modifikatori su supragingivalnog i/ili subgingivalnog mikrobiološkog profila, te kao takvi mogu utjecati i na netočne rezultate mjerenja nekih od parodontoloških indeksa (PPD, FMBS) kao i na uzorkovani mikrobiom.

Gestacijski hormoni u trudnoći djeluju kao faktori rasta za *Prevotellu intermediu*, te je dokazano da je udio te vrste u džepovima trudnica do 55 puta veći nego kod žena koje nisu trudne [3].

Terapija klorheksidinskim (bisbigvanidni antiseptik) preparatima djeluje bakteriostatski a u određenim dozama i baktericidno, dok terapija oralnim probioticima može povećati populaciju i broj probiotičkih bakterija a zaustaviti ili ometati razmnožavanje patogenih vrsta [182,183].

Neke sistemske bolesti poput nekontroliranog diabetesa melitusa dovodi do dominacije pojedinih parodontopatogenih vrsta- *Capnocytophaga*, *P. Intermedia*, *Campylobacter Rectus*, *Porphiromonas Gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcommitans* [3].

Odustajanje ispitanika (engl. *drop-out*)

Četiri ispitanika kontrolne skupine i dva ispitanika iz skupine pušača običnih cigareta nisu bili u potpunosti obrađeni. Tri ispitanika kontrolne skupine naknadno su povukla svoj pristanak za NGS sekvenciranje. Tri uzorka NGS sekvenciranja nije pokazalo rezultate.

Konačno je NGS- om obrađeno 60 ispitanika kada su se isključili oni koji su odustali, dok je statistička obrada ispitanika koja je uključivala parodontne indekse i analizu ispunjenog upitnika uzela u obzir svih 66 ispitanika.

3.2 Metode

Obrada svakog ispitanika uključivala je prikupljanje podataka o općem zdravstvenom stanju, kratki anamnestički razgovor, klinički parodontološki pregled uz uzimanje parodontnih indeksa i brisa iz gingivnih sulkusa ili parodontnih džepova te analizu ortopantomograma. Svi ispitanici ispunili su kratki upitnik o oralno-higijenskim navikama i navikama pušenja (Privitak 1) te su na kraju potpisali obrazac informiranog pristanka.

3.2.1.1 Prikupljanje podataka o općem zdravstvenom stanju, ispunjavanje upitnika o pušačkim navikama i parodontnom zdravlju

Svi pacijenti koji dolaze na Kliniku za dentalnu medicinu KBC Rijeka ispunjavaju anamnestički obrazac prema Svjetskoj stomatološkoj federaciji (engl. *FDI World Dental Federation*) iz 1998; Privitak 2.)

Kratak anamnestički razgovor se provodio pri prvom pregledu pacijenata kada se vršio odabir potencijalnih ispitanika. Uključivao je pitanja u svrhu određivanja pušačkog statusa potencijalnih ispitanika. Ako je odgovor na prvo pitanje : „Pušite li trenutno?“, bio potvrđan , daljnja selekcija potencijalnih ispitanika je slijedila postavljanjem pitanja: „ Što pušite?“, „Koliko cigareta ili duhanskih štapića/umetaka konzumirate kroz jedan dan?“, „Koliko dugo pušite?“. Ispitanici koji su odgovorili potvrdno na prvo pitanje, a daljnji odgovori su se uklapali u potvrdne okvire nužne za zadovoljenje osnovnih kriterija studije - uključeni su u istraživanje i svrstani u određenu grupu konzumenata duhana. Ako je odgovor na pitanje „Pušite li?“ bio negativan, slijedeće pitanje koje odlučuje o ulasku ispitanika u istraživanje je „ Da li ste ikada pušili?“. Ako je odgovor negativan, takav ispitanik je uključen u kontrolnu skupinu ispitanika.

3.2.1.2 Ispunjavanje upitnika o oralno-higijenskim navikama i navikama pušenja

Svaki ispitanik je ispunio kratki upitnik prije kliničkog parodontološkog pregleda. Navike oralne higijene, iskustvo pušenja i dnevna konzumacija duhanskih umetaka ili cigareta procijenjeni su upitnikom koji se sastojao od 6 pitanja. Pitanja su imala jedan ili više mogućih odgovora (Privitak 1).

3.2.1.3 Klinički parodontološki pregled

Klinički parodontološki pregled provodio se na stomatološkoj stolici uz standardno osvjetljenje pomoću stomatološkog ogledalca i parodontne sonde.

Kliničkim pregledom pregledani su svi zubi osim trećih kutnjaka. Milimetarski graduirana parodontna sonda PCP-15 UNC (Hu-Friedy, Chicago, IL, SAD) korištena je za bilježenje parodontnih indeksa: PPD, FMBS, FMPS, GR, TM, FD i CAL. Mjerenja PPD i GR mjerena su na 6 mjesta po zubu (mezio-bukalno, sredina bukalne površine, disto-bukalno, disto-oralno, sredina oralne površine, mezio-oralno).

Klinički postupci potrebni za dijagnosticiranje parodontitisa napravljeni su u skladu s novom klasifikacijom Parodontnih i periimplantatnih bolesti iz 2017 [184].

Prisutnost gubitka alveolarne kosti procjenom gubitka koštane mase putem panoramskih dentalnih radiografija, prisutnost interdentalnog CAL-a na više od jednog zuba koji nisu susjedni te vestibularna ili oralna gingivna recesija s PPD većim od 3 mm su znakovi parodontitisa [221]. Digitalne ortopantomogram snimke (Planmeca ProMax, ProMax 3D Plus, proizvođač: Planmeca OY, Helsinki, Finska) su učinjene te je korištena verzija softvera Planmeca Romexis 5.30.1015.28.03.19 (Planmeca Oy, Helsinki, Finska).

3.2.1.4 Prikupljanje uzoraka subgingivnog dentalnog plaka

Uzorci subgingivnog plaka prikupljeni su u jutarnjim satima, između 8.00 i 10.00 sati. Ispitanici su dobili upute da na dan uzorkovanja ne četkaju zube ujutro, dok su večer prije, između 20.00 i 22.00, trebali četkati zube. Na taj način osigurana je podjednaka zrelost prikupljenih uzoraka subgingivnog dentalnog plaka.

Uzorci subgingivnog dentalnog plaka prikupljeni su koristeći jednokratne rukavice od lateksa, sterilnu pincetu, sterilne papirnate štapiće (Roeko #45 Dental Paper Point, Coltene Whaladent, Cuyahoga Falls, OH, US) i sterilne 1.5 mL Eppendorf epruvete. Nakon uzorkovanja na svaku je epicu vodootpornim markerom napisan broj protokola ispitanika.

Postupak uzorkovanja proveden je uzimanjem briseva za mikrobiološku analizu papirnatim štapićima iz pet (5) odabranih gingivnih sulkusa ili parodontnih džepova pet (5) odabranih zuba. Odabrani parodontni džepovi bili su najdublji pronađeni kod ispitanika s parodontitisom. Zubi su izolirani u suhom radnom polju (stavljanjem pamučnih smotuljaka uz izlazne kanale velikih žlijezda slinovnica i aspiratora sline ispod jezika) kako bi se spriječila kontaminacija papirnatih štapića slinom, a potom su zubi dodatno osušeni komprimiranim zrakom. Supragingivni biofilm očišćen je s područja uzorkovanja sterilnom pamučnom vaticom, jedan papirnati štapić veličine 45 (Roeko #45 Dental Paper Point, Coltene Whaladent, SAD) po zubu umetnut je u gingivni sulkus ili parodontni džep na 30 sekundi i zatim prenesen u praznu Eppendorf epicu. Eppendorf epica je odmah pohranjena na -20 °C. Uzorci su pohranjeni na -20 °C do izolacije bakterijske DNA [185,186]. Izolacija bakterijske DNA provedena je unutar 48 sati od prikupljanja.

Eksperimentalni dio ove doktorske disertacije proveden je u Laboratorijima Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci i Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Uzorci subgingivnog biofilma na papirnatim štapićima bili su pohranjeni u hladnjacima laboratorija Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Fakulteta dentalne medicine, Sveučilišta u Rijeci.

3.2.1.5 Izolacija DNA iz uzoraka subgingivnog dentalnog plaka

DNA je izolirana iz papirnatih štapića veličine 45 koji sadrže subgingivni plak pomoću komercijalno dostupnog kita Nucleospin Tissue (Macherey Nagel, Duren, Njemačka) prema modificiranom protokolu za bakterije prema preporukama proizvođača koji smo prilagodili našim ciljevima i uvjetima rada (Slika 9).

Protokol izolacije DNA pomoću komercijalno dostupnog kita Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel, Njemačka, kat broj 740952.50):

Prilikom otvaranja novog kita za izolaciju potrebno je pripremiti reagense prema uputama proizvođača. Dodano je 48 mL 96-100% etanola u posudu za B5 pufer te 1.35 mL proteinaznog pufera u posudu s proteinazom K. Označen je datum kada su pripremljeni. Proteinaza K se potom pohranila na +4 °C. Temperatura termo-bloka je postavljena na 56°C. Elucijske 1.5mL Eppendorf epice su pripremljene i označene za svaki pojedini uzorak. U epice gdje se nalaze papirnati štapići s uzorcima, otpipetirano je 200 µL G+ lizirajućeg pufera (otopina 20mM Tris/HCL, 2 mM EDTA i 1 % Triton X-100- pH 8), te 40 µL svježe pripremljenog lizozima i kratko vorteksirano.

Epice su inkubirane na termomikseru 45 minuta pri temperaturi od 37°C uz miješanje od 850 rpm. Dodano je 200 µL B3 pufera te 40 µL proteinaze K i kratko vorteksirano. Epice su potom ponovno inkubirane u termomikseru 45 minuta na temperaturi od 56 °C uz miješanje od 850 rpm. Epice su tada ostavljene da se ohlade. Nakon hlađenja, dodano je 400 µL ohlađenog 96-100% etanola i vorteksirano 10-ak sekundi. Pripremljene su i označene *tissue* kolonice po jedna za svaki uzorak. Polovica sadržaja iz pojedine epice prebačena je u adekvatno označenu kolonicu. Slijedi centrifugiranje 1 minutu na 11000 rpm. Tekućina koja se skupila u donjem dijelu epice je izlivena, nakon čega je kolonica vraćena natrag u tubicu. Ostatak sadržaja iz pojedine epice prebačen je u

adekvatno označenu kolonicu. Slijedi centrifugiranje 1 minutu na 11000 rpm. Tekućina koja se skupila u donjem dijelu tubice je izlivena, nakon čega je kolonica vraćena natrag u tubicu. U svaku kolonicu otpipetirano je 500 μ L pufera BW i centrifugirano 1 minutu na 11000 rpm. Tekućina skupljena u donjem dijelu tubice je izlivena i kolonica se vratila natrag u tubicu. Otpipetirano je 600 μ L pufera B5 i centrifugirano 1 minutu na 11000 rpm. Tekućina koja se skupila u donjem dijelu epice je izlivena te se kolonica ponovno vratila natrag u tubicu. Kolonica se potom sušila centrifugiranjem 1 minutu na 11000 rpm. Epruveta s elucijskim puferom BE je potom zagrijana na 70 °C. Nakon sušenja, kolonice su prebačene u pripremljene i označene 1.5 mL Eppendorf epruvete Low bind tubice. U svaku je otpipetirano 50 μ L BE pufera (zagrijanog na 70 °C) i inkubirano na 3 minute pri sobnoj temperaturi. DNA je eluirana centrifugiranjem 1 minutu na 11000 rpm. Po jedna Qubit epica s reagensom za mjerenje QubitDNA Broad range po ispitaniku je pripremljena prema uputama proizvođača. Koncentracije izoliranih DNA molekula su izmjerene pomoću Qubit fluorometra i pohranjene na +4°C (Tablica 1).

NucleoSpin® Tissue		
1	Priprema uzorka	Podijeliti 25mg na manje dijelove
2	Pre-liza uzorka	180 μ L T1 25 μ L Proteinaza K 56 °C, 1–3 h
3	Liza uzorka	200 μ L B3 70 °C, 10 min
4	Prilagođavanje uvjeta vezivanja DNA	210 μ L 96–100% etanol
5	Vezivanje DNA na silikatnu membranu	Napuniti sve komponente 11,000 x g, 1 min
6	Ispiranje silikatne membrane	1 ispiranje 500 μ L BW 2 ispiranje 600 μ L B5 11,000 x g, 1 min
7	Sušenje silikatne membrane	11,000 x g, 1 min
8	Eluiranje čiste DNA	100 μ L BE RT, 1 min 11,000 x g, 1 min

Slika 9. Protokol izolacije DNA Nucleo Spin Tissue Kitom

Preuzeto i prilagođeno iz: [158]

Tablica 1. Koncentracije izoliranih DNA u uzorcima subgingivnog dentalnog plaka

Uzorak	Koncentracija DNA ng/mL	Uzorak	Koncentracija DNA ng/mL
1	5,8	31	2,72
2	11,8	32	5,28
3	16,3	33	18,2
4	13,0	34	15,6
5	3,03	35	7,6
6	17,8	36	22,4
7	14,6	37	5,2
8	20,8	38	3,75
9	8,36	39	20,4
10	18,6	40	12,6
11	12,9	41	14
12	18,3	42	16
13	4,76	43	8,04
14	3,85	44	21,6
15	7,48	45	22,4
16	15,6	46	6,56
17	19,5	47	14,6
18	4,84	48	4,68
19	19,6	49	50,8
20	15,8	50	8,56
21	3,04	51	14,6
22	7,92	52	15,8
23	21,6	53	20,8
24	6,88	54	14,5
25	8,28	55	7,08
26	20,8	56	13,5
27	5,36	57	17,3

Uzorak	Koncentracija DNA ng/mL	Uzorak	Koncentracija DNA ng/mL
28	23,3	58	18,7
29	11,6	59	1,88
30	24,0	60	11,3

3.2.1.6 Amplifikacija i sekvenciranje nove generacije hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena

Sekvenciranje nove generacije za analizu uzoraka subgingivnog dentalnog plaka uključuje slijedeće proceduralne korake:

1. AMPLIFIKACIJA HIPERVARIJABILNIH REGIJA 16S rRNA GENA

- Spajanje *poolova* PCR produkata istog ispitanika
- Pročišćavanje PCR produkata
- Analiza koncentracije i kvalitete pročišćenog PCR produkta

2. PRIPREMA KNJIŽNICA

- *End-repair* i pročišćavanje amplikona
- Ligacija, *nick-repair* i pročišćavanje knjižnica sa ligiranim adapterima
- Određivanje koncentracija pripremljenih knjižnica

3. PRIPREMA TEMPLATE-A

- Emulzijski PCR
- ISP obogaćivanje (engl. *enrichment*)

4. SEKVENCIRANJE KNJIŽNICA

3.2.1.7 Amplifikacija hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena

Amplifikacija hipervarijabilnih regija 2-9 gena 16S rRNA provedena je s Ion 16S Metagenomics kitom (ThermoFisher, Waltham, MA, US), prema uputama proizvođača.

Upotrijebljeno je ukupno 3 ng svakog izoliranog uzorka DNA u amplifikaciji hipervarijabilnih regija V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 i V9 16S rRNA gena. Prema uputama proizvođača za svaki uzorak pripremljena su 2 seta reakcija (Primer set V2-4-8 i Primer set V3-6, 7-9) te je amplifikacija provedena u 25 ciklusa.

Reakcijska mješavina za PCR:

2X Environmental Master Mix: 15 μ l

16S Primer Set (Primer set V2-4-8 ili Primer set V3-6, 7-9): 3 μ l

Uzorak DNA (3 ng): 1 μ l

H₂O: 11 μ l

Ukupno: 30 μ l

Pripremljene reakcijske mješavine stavljene su u PCR-uređaj na programe:

95°C	10 min	
95°C	30 s	} 25 ciklusa
58°C	30 s	
72°C	20s	
72°C	7 min	
4°C		

- **Spajanje *poolova* pojedinog ispitanika i pročišćavanje PCR produkata:**

U posebno pripremljene Low bind Eppendorf epice za svakog ispitanika, otpipetirano je po 20 μ l PCR produkta obje PCR reakcije i 72 μ l Agencourt AMPure XP *paramagnetic beads* (hrv. magnetne kuglice) reagensa na sobnoj temperaturi. Agencourt Ampure XP kuglice vorteksirane su 30-tak sekundi prije pipetiranja.

Epice s ovom mješavinom postavljene su na magnetski stalak 2-4 min (da se otopina potpuno razbistri), a supernatant je pažljivo uklonjen (bez zamućenja peleta). U idućem koraku dodaje se 500 μ l 70% etilnog alkohola u epice te se otopina inkubira 30 sekundi tijekom kojih je epice potrebno dva puta okrenuti na magnetnom postolju, za 180 stupnjeva, kako bi se Agencourt AMPure XP kuglice (na kojima su vezani amplikoni hipervarijabilnih regija bakterijskog 16S rRNA gena) pomicala kroz 70% etilni alkohol. Alkohol odstranjuje ostatke PCR reakcija i ostale nečistoće. Nakon što se otopina razbistrila, supernatant je uklonjen pipetom. Postupak ispiranja kuglica u 70 % etanolu ponovljen je još dva puta. Nakon zadnjeg ispiranja pažljivo je uklonjen supernatant, a otvorena epruveta je ostavljena na magnetskom stalku da se pelet osuši na zraku (2-4 min). Oprez je potreban zbog mogućeg presušenja peleta. U epice je potom dodano 15 μ l *nuclease-free* vode te su otopine vorteksirane kako bi se kuglice resuspendirale. U ovom postupku vezani pročišćeni amplikoni eluirani su sa Agencourt kuglica. Nakon pulsog centrifugiranja epice su vraćene na magnetni stalak kako bi se kuglice separirale od supernatanta koji sadrži eluiranu DNA, odnosno pročišćene amplikone hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena dobivenih u PCR reakcijama. Dobiveni supernatant pipetom je prebačen u 1.5 ml Eppendorf LoBind tubicu.

Kvantifikacija dobivenih pročišćenih PCR produkata provedena je na Agilent 2100 Bioanalyzer uređaju pomoću Agilent softwarea i Agilent High Sensitivity DNA kita (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD) prema uputama proizvođača. Uređaj funkcionira na temelju fragmentne analize, elektroforeze, i odvajanja fragmenata -amplikona po veličini i kvantifikaciji amplikona u odnosu na standard. Za analizu je upotrijebljeno 2 μ l svakog amplikona razrijeđenog sa 8 μ l vode. Količina (koncentracija) (Tablica 2) i veličina fragmenata dobiveni su nakon analize Agilent 2100 Bioanalyzer uređajem (Slika 10).

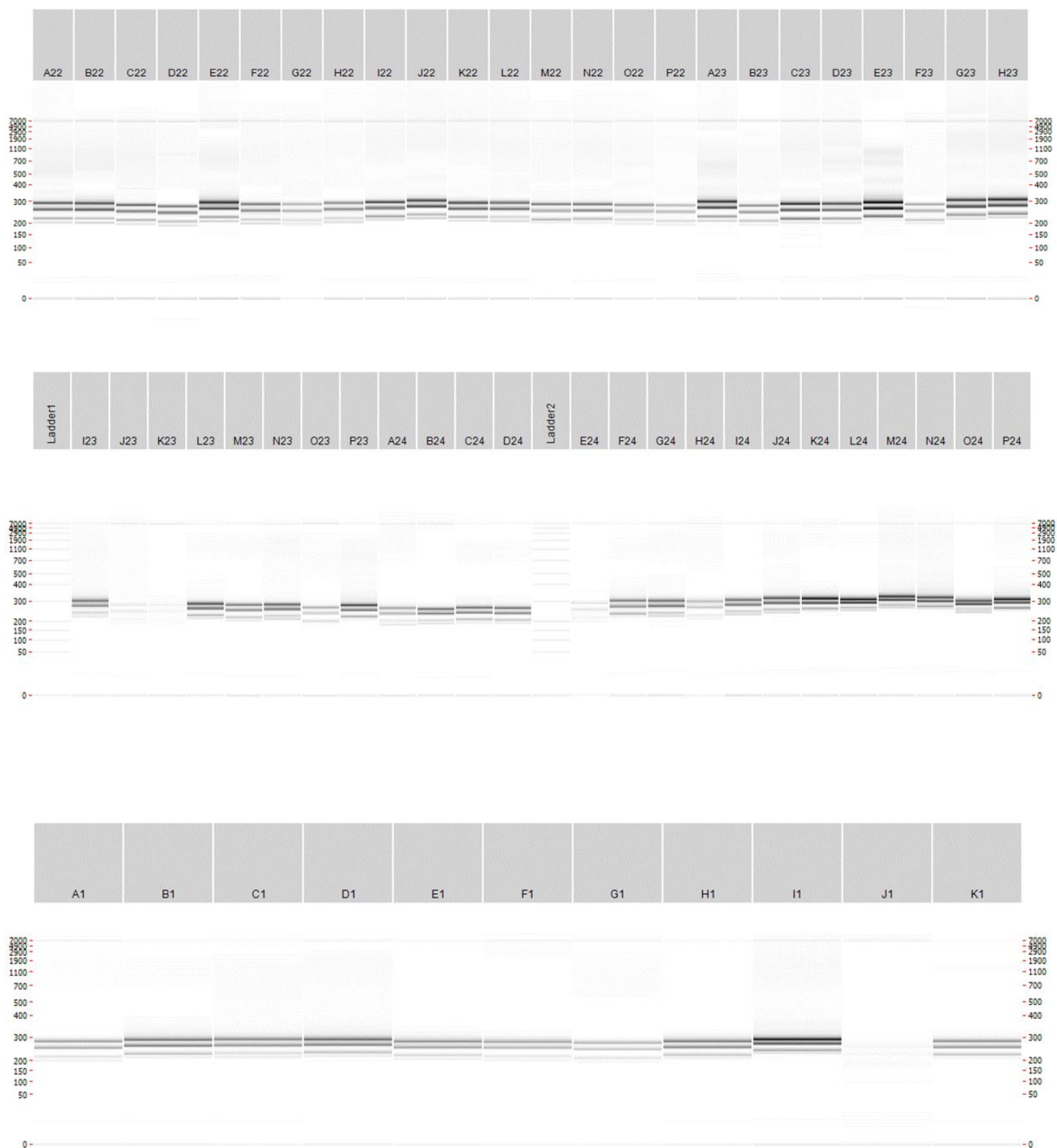
- **Analiza koncentracije i kvalitete pročišćenog PCR produkta**

Tablica 2. Prikaz koncentracije pročišćenog PCR produkta

	Oznaka jažice	Ukupna konc. (ng/ul)	Regija[170-400] Konc. (ng/ul)	Konc. nerazrijeđenih [ng/uL]	Vol. za 150 ng [uL]	Vol. vode [uL]
1	A22	9.69	8.46	42.3	3.5	75.5
2	B22	8.17	7.27	36.4	4.1	74.9
3	C22	6.74	6.1	30.5	4.9	74.1
4	D22	15.92	14.28	71.4	2.1	76.9
5	E22	10.94	9.97	49.9	3.0	76.0
6	F22	6.65	6.18	30.9	4.9	74.1
7	G22	10.29	9.47	47.4	3.2	75.8
8	H22	6.8	6.47	32.4	4.6	74.4
9	I22	19.58	18	90.0	1.7	77.3
10	J22	10.53	9.66	48.3	3.1	75.9
11	K22	10.76	10.22	51.1	2.9	76.1
12	L22	9.89	8.93	44.7	3.4	75.6
13	M22	10.69	10.26	51.3	2.9	76.1
14	N22	17.57	15.82	79.1	1.9	77.1
15	O22	11.74	10.55	52.8	2.8	76.2
16	P22	6.37	5.98	29.9	5.0	74.0
17	A23	10.99	9.83	49.2	3.1	75.9
18	B23	5.96	5.76	28.8	5.2	73.8
19	C23	9.99	9.44	47.2	3.2	75.8
20	D23	7.8	6.79	34.0	4.4	74.6
21	E23	44.59	39.14	195.7	0.8	78.2

	Oznaka jažice	Ukupna konc. (ng/ul)	Region[170- 400] Konc. (ng/ul)	Konc. nerazrijeđenih [ng/uL]	Vol. za 150 ng [uL]	Vol. vode [uL]
22	F23	4.11	3.93	19.7	7.6	71.4
23	G23	13.73	11.9	59.5	2.5	76.5
24	H23	12.54	11.33	56.7	2.6	76.4
25	I23	12.62	11.01	55.1	2.7	76.3
26	J23	2.08	1.68	8.4	17.9	61.1
27	K23	1.08	1	5.0	30.0	49.0
28	L23	16.41	14.93	74.7	2.0	77.0
29	M23	17.85	16.5	82.5	1.8	77.2
30	N23	12.09	10.08	50.4	3.0	76.0
31	O23	4.84	4.34	21.7	6.9	72.1
32	P23	20.86	17.64	88.2	1.7	77.3
33	A24	7.14	6.5	32.5	4.6	74.4
34	B24	7.5	7.25	36.3	4.1	74.9
35	C24	27.95	23.93	119.7	1.3	77.7
36	D24	19.8	17.27	86.4	1.7	77.3
37	E24	3.78	3.36	16.8	8.9	70.1
38	F24	42.78	41.89	209.5	0.7	78.3
39	G24	10.75	9.23	46.2	3.3	75.7
40	H24	5.53	4.76	23.8	6.3	72.7
41	I24	23.06	22.47	112.4	1.3	77.7
42	J24	11	9.05	45.3	3.3	75.7
43	K24	8.34	7.29	36.5	4.1	74.9
44	L24	22.29	21.73	108.7	1.4	77.6
45	M24	7.91	6.4	32.0	4.7	74.3
46	N24	11.01	8.47	42.4	3.5	75.5

	Oznaka jažice	Ukupna konc. (ng/ul)	Region[170- 400] Konc. (ng/ul)	Konc. nerazrijeđenih [ng/uL]	Vol. za 150 ng [uL]	Vol. vode [uL]
47	O24	10.16	9.82	49.1	3.1	75.9
48	P24	11.83	10.07	50.4	3.0	76.0
49	A1	7.48	7.03	35.2	4.3	74.7
50	B1	21.26	19.64	98.2	1.5	77.5
51	C1	14.19	11.47	57.4	2.6	76.4
52	D1	14.27	11.86	59.3	2.5	76.5
53	E1	14.33	11.31	56.6	2.7	76.3
54	F1	9.38	8.54	42.7	3.5	75.5
55	G1	7.56	6.27	31.4	4.8	74.2
56	H1	49.94	49.6	248.0	0.6	78.4
57	I1	7.74	6.61	33.1	4.5	74.5
58	J1	1.49	0.92	4.6	32.6	46.4
59	K1	25.48	22.22	111.1	1.4	77.6
60	E3	9.16	9.01	45.05	3.3	75.7



Slika 10. Kapilarna elektroforeza amplicona hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena dobivena Agilent 2100 Bioanalyzer uređajem

Nakon amplifikacije, spajanja amplicona i pročišćavanja, 150 ng svakog od skupljenih amplicona upotrijebljeno je za izradu knjižnica s barkodovima pomoću kompleta Ion Plus Fragment Library (ThermoFisher, Waltham, MA, SAD), prema uputama proizvođača.

3.2.1.8 Priprema knjižnica

- *End-repair* amplicona i pročišćavanje etanolom
 - Ligacija, *nick-repair* i pročišćavanje knjižnica sa ligiranim adapterima
 - Određivanje koncentracija pripremljenih knjižnica
-
- ***End-repair* amplicona i pročišćavanje etanolom**

Za pripremu knjižnica korišten je Ion Plus Fragment Library kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Cilj ovog koraka je modificiranje krajeva amplicona (djelomična digestija primera) da bi se formiralo mjesto za vezanje barkod adaptera.

Reakcijske smjese za *end-repair* otpipetirane su u 1.5 ml Eppendorf LoBind tubicama po niže prikazanoj uputi.

Komponente i volumen reakcije *end-repair*-a :

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

Sadržaj svake epice je resuspendiran i inkubiran na sobnoj temperaturi 20 minuta. U epice je dodano 180 μl Agencourt AMPure XP reagensa te je sadržaj vorteksiran, pulsno centrifugiran i

inkubiran na sobnoj temperaturi kroz 5 min. Otopina je ponovno pulsno centrifugirana i postavljena na magnetski stalak na 3 minute dok se nije razbistrila. Supernatant je uklonjen pipetom, a u epice je dodano 500 μ l 70% etilnog alkohola. Dva puta je proveden postupak čišćenja rotacijom tubica na magnetnom stalku kao što je već opisano u postupku pročišćavanja PCR produkata. Nakon čišćenja i sušenja Agencourt kuglica na magnetnom stalku, u epice je dodano 25 μ l Low TE reagensa te su kuglice resuspendirane vorteksiranjem. Po završetku pulsno centrifugiranja, epice su vraćene na magnetski stalak da bi se kuglice izdvojile iz otopine. Nakon 1 minute odvojeni supernatant koji sadrži eluiranu DNA prebačen je u 1.5 ml Eppendorf LoBind tubicu.

- **Ligacija, *nick-repair* i pročišćavanje amplikona s ligiranim adapterima**

U ovom koraku, na prethodno pripremljene amplikone djelomično digestiranih krajeva (*end repair*), vrši se ligacija univerzalnih primera i barkod adaptera (Tablica 3).

Reakcije ligacije i *nick repair*-a rađene su u 0.2 ml PCR tubicama u koje je otpipetiran sadržaj prema navedenoj uputi:

DNA (pročišćeni, <i>end repair</i> amplikoni)	25 μ l
10X Ligirajući pufer	10 μ l
Ion P1 Adapter	2 μ l
Ion Xpress Barcode X*	2 μ l
dNTP mix	2 μ l
<i>Nuclease-free</i> voda	49 μ l
DNA ligaza	2 μ l
<i>Nick repair</i> polimeraza	8 μ l
Ukupno	100 μl

*X označava broj barkoda koji se pridružuje svakom pojedinom uzorku

Epice su zatim postavljene u termalni cycler prema slijedećem programu : 25° C -15 min, 72° C - 5 min, i 4° C do postizanja temperature.

Nakon ligacije i *nick repair*-a ponovljen je postupak pročišćavanja amplikona etanolom. U pripremljene uzorke dodano je 140 µl Agencourt AMPure XP reagensa te su otopine vorteksirane, pulsno centrifugirane i ostavljene na sobnoj temperaturi kroz 5 minuta radi inkubacije.

Pročišćavanje amplikona sa ligiranim barkod adapterima je potom provedeno na jednaki način kao i nakon *end repair*-a.

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

Tablica 3. : Barkodovi ligirani na pripadajući uzorak amplikona hipervarijabilnih regija 16S rRNA subgingivnog dentalnog plaka

Barkod	Oznaka uzorka	Količina DNA za <i>end repair</i>	Broj ciklusa amplifikacije
IonXpress_016	Sample 1	3.5	5
IonXpress_017	Sample 2	4.1	5
IonXpress_018	Sample 3	4.9	5
IonXpress_021	Sample 4	2.1	5
IonXpress_022	Sample 5	3	5
IonXpress_023	Sample 6	4.9	5
IonXpress_024	Sample 7	3.2	5
IonXpress_025	Sample 8	4.6	5
IonXpress_026	Sample 9	1.7	5
IonXpress_027	Sample 10	3.1	5

Barkod	Oznaka uzorka	Količina DNA za <i>end repair</i>	Broj ciklusa amplifikacije
IonXpress_028	Sample 11	2.9	5
IonXpress_029	Sample 12	3.4	5
IonXpress_030	Sample 13	2.9	5
IonXpress_031	Sample 14	1.9	5
IonXpress_032	Sample 15	2.8	5
IonXpress_050	Sample 16	5	5
IonXpress_051	Sample 17	3.1	5
IonXpress_052	Sample 18	5.2	5
IonXpress_053	Sample 19	3.2	5
IonXpress_054	Sample 20	4.4	5
IonXpress_056	Sample 21	0.8	5
IonXpress_057	Sample 22	7.6	5
IonXpress_059	Sample 23	2.5	5
IonXpress_060	Sample 24	2.6	5
IonXpress_061	Sample 25	2.7	5
IonXpress_062	Sample 26	13	5
IonXpress_063	Sample 27	13	5
IonXpress_064	Sample 28	2	5
IonXpress_065	Sample 29	1.8	5
IonXpress_066	Sample 30	3	5
IonXpress_067	Sample 31	6.9	5
IonXpress_068	Sample 32	1.7	5
IonXpress_069	Sample 33	4.6	5
IonXpress_070	Sample 34	4.1	5
IonXpress_071	Sample 35	1.3	5
IonXpress_072	Sample 36	1.7	5
IonXpress_073	Sample 37	8.9	5

Barkod	Oznaka uzorka	Količina DNA za <i>end repair</i>	Broj ciklusa amplifikacije
IonXpress_074	Sample 38	0.7	5
IonXpress_075	Sample 39	3.3	5
IonXpress_076	Sample 40	6.3	5
IonXpress_078	Sample 42	3.3	5
IonXpress_079	Sample 43	4.1	5
IonXpress_080	Sample 44	1.4	5
IonXpress_081	Sample 45	4.7	5
IonXpress_082	Sample 46	3.5	5
IonXpress_083	Sample 47	3.1	5
IonXpress_084	Sample 48	3	5
IonXpress_085	Sample 49	4.3	5
IonXpress_086	Sample 50	1.5	5
IonXpress_087	Sample 51	2.6	5
IonXpress_088	Sample 52	2.5	5
IonXpress_089	Sample 53	2.7	5
IonXpress_090	Sample 54	3.5	5
IonXpress_091	Sample 55	4.8	5
IonXpress_092	Sample 56	0.6	5
IonXpress_093	Sample 57	4.5	5
IonXpress_094	Sample 58	13	5
IonXpress_095	Sample 59	1.4	5
IonXpress_096	Sample 60	3.3	5

- **Određivanje koncentracija pripremljenih knjižnica**

Određivanje optimalne koncentracije knjižnica nužno je prije pripreme *template*-a. Prerazrijeđene knjižnice dati će mnoštvo praznih magnetnih zrnaca -Ion Sphere Particles (ISP) i mali broj očitavanja, dok će nedovoljno razrijeđene knjižnice rezultirati nastajanjem poliklonalnih ISP-ova u reakciji emulzijskog PCR-a.

Prije određivanja koncentracija, knjižnice su amplificirane pomoću komponenti Ion Plus Fragment Library kita (TermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača. Volumen od 20 µl od svake pripremljene knjižnice pomiješan je s 5 µl Low TE reagensa. Potom je u 1.5 ml Eppendorf LoBind epice otpipetirana PCR reakcija s komponentama navedenog volumena :

Platinum PCR SuperMix High Fidelity:	100 µl
Library Amplification Primer Mix:	5 µl
Neamplificirana knjižnica (razrijeđena sa Low TE reagensom):	25 µl
Ukupno:	130 µl

Reakcijski volumen od 130 µl je podijeljen na pola, te je po 65 µl otpipetirano u 0,2 µl PCR epice. Epice su postavljene u *thermal cycler* i provedena je reakcija PCR po slijedećem programu:

	Korak	Temperatura	Vrijeme
5 ciklusa	Denaturacija	95°C	5 min
	Denaturacija	95°C	15s
	Aneliranje	58°C	15s
	Ekstenzija	70°C	1 min
			4°C

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

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

Koncentracija pripremljenih amplificiranih i pročišćenih knjižnica određena je na Agilent 2100 Bioanalyzer uređaju pomoću Agilent softwera i Agilent High Sensitivity DNA kita (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD).

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

Prema rezultatima analize pripremljena su konačna potrebna razrjeđenja knjižnica (40 pM) koja su se koristila u idućem koraku za pripremu *template*-a. Pripremljena razrjeđenja su bila pohranjena na -20°C. Rezultati i izračuni potrebnih volumena barkodiranih i pročišćenih knjižnica za pripremu *template*-a prikazani su u Tablici 4. , dok je kapilarna elektroforeza knjižnica prikazana na Slici 11.

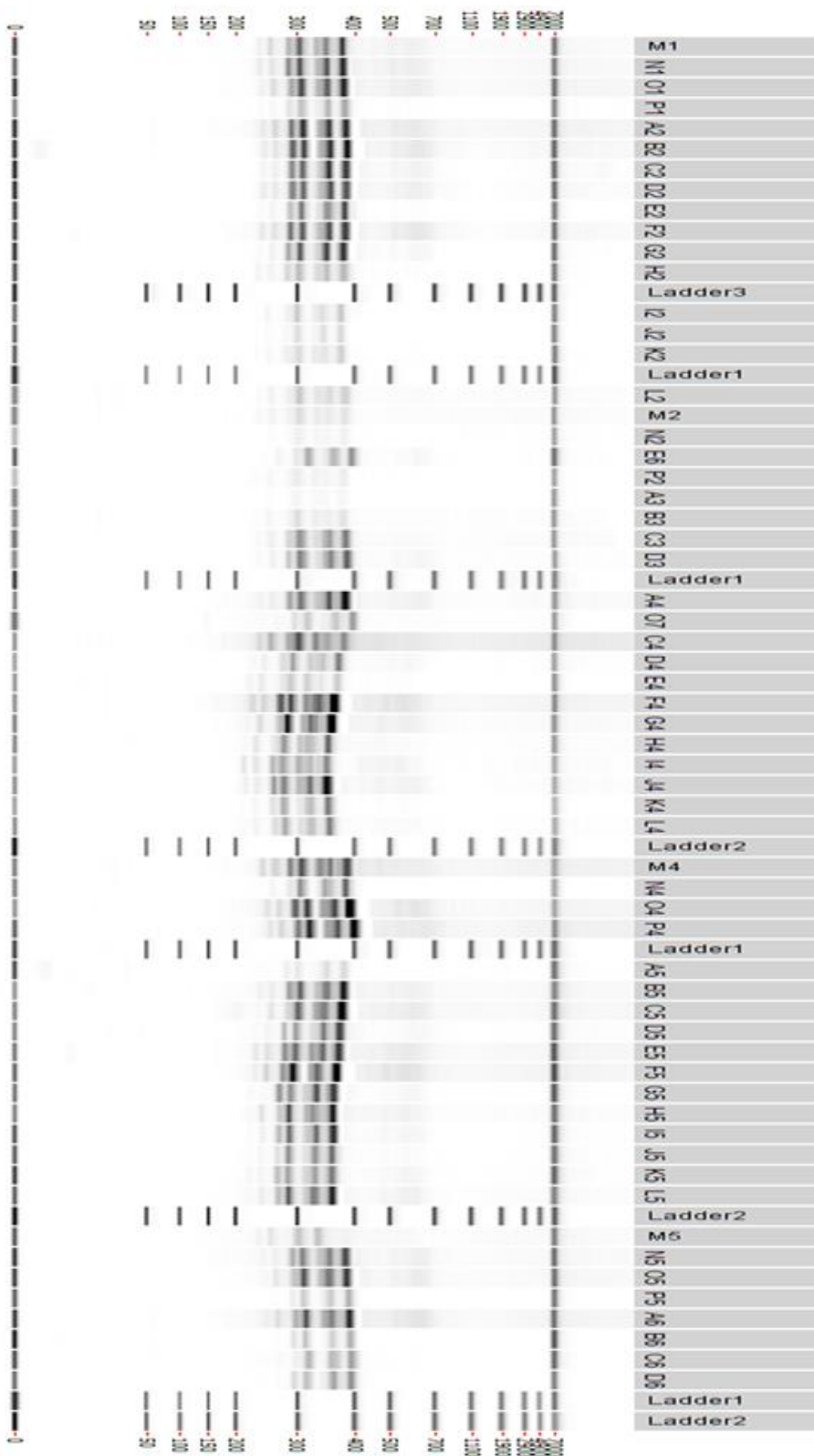
Tablica 4. Rezultati i izračuni potrebnih volumena barkodiranih i pročišćenih knjižnica za pripremu *template-a*

Redni broj	Barkod	Oznaka jažice	Ukupna koncentracija (ng/ul)	Koncentracija regije [200-500] (nmol/l)	Konc. nerazrijeđenih knjižnica [pM]	Konc. 30x razrijeđenih knjižnica [pM]	Faktor razrjeđenja za 40 pM [uL]	Vol. 30x razrijeđene knjižnice [uL]	Volumen H ₂ O [uL]
1	IonXpress_01 6	M01	1,97	8,12	40600	1353,3	33,8	2	66
2	IonXpress_01 7	N01	2,37	9,67	48350	1611,7	40,3	2	79
3	IonXpress_01 8	O01	2,36	8,37	41850	1395,0	34,9	2	68
4	IonXpress_02 1	P01	0,87	3,99	19950	665,0	16,6	2	31
5	IonXpress_02 2	A02	2,23	9,23	46150	1538,3	38,5	2	75
6	IonXpress_02 3	B02	2,51	9,06	45300	1510,0	37,8	2	74
7	IonXpress_02 4	C02	1,89	7,75	38750	1291,7	32,3	2	63
8	IonXpress_02 5	D02	2,06	8,56	42800	1426,7	35,7	2	69
9	IonXpress_02 6	E02	1,48	6,55	32750	1091,7	27,3	2	53
10	IonXpress_02 7	F02	2,23	9,28	46400	1546,7	38,7	2	75
11	IonXpress_02 8	G02	1,86	7,41	37050	1235,0	30,9	2	60
12	IonXpress_02 9	H02	0,96	4,63	23150	771,7	19,3	2	37
13	IonXpress_03 0	I02	0,58	2,78	13900	463,3	11,6	2	21
14	IonXpress_03 1	J02	0,41	1,89	9450	315,0	7,9	2	14
15	IonXpress_03 2	K02	0,51	2,41	12050	401,7	10,0	2	18

Redni broj	Barkod	Oznaka jažice	Ukupna koncentracija (ng/ul)	Koncentracija regije [200-500] (nmol/l)	Konc. nerazrijeđenih knjžnica [pM]	Konc. 30x razrijeđenih knjžnica [pM]	Faktor razrjeđenja za 40 pM [uL]	Vol. 30x razrijeđene knjžnice [uL]	Volumen H2O [uL]
16	IonXpress_05 0	L02	1,3	5,38	26900	896,7	22,4	2	43
17	IonXpress_05 1	M02	0,75	4	20000	666,7	16,7	2	31
18	IonXpress_05 2	N02	0,3	1,73	8650	288,3	7,2	2	12
19	IonXpress_05 3	E06	1,05	4,43	22150	738,3	18,5	2	35
20	IonXpress_05 6	P02	0,46	3,04	15200	506,7	12,7	2	23
21	IonXpress_05 4	A03	0,11	1,06	5300	176,7	4,4	2	7
22	IonXpress_05 7	B03	0,69	3,34	16700	556,7	13,9	2	26
23	IonXpress_05 9	C03	2,67	12,16	60800	2026,7	50,7	2	99
24	IonXpress_06 0	D03	3,4	14,71	73550	2451,7	61,3	2	121
25	IonXpress_06 1	A04	2,83	11,97	59850	1995,0	49,9	2	98
26	IonXpress_06 2	O07	1,06	4,81	24050	801,7	20,0	2	38
27	IonXpress_06 3	C04	2,97	12,27	61350	2045,0	51,1	2	100
28	IonXpress_06 4	D04	1,63	8,22	41100	1370,0	34,3	2	67
29	IonXpress_06 5	E04	1,16	4,52	22600	753,3	18,8	2	36
30	IonXpress_06 6	F04	3,59	15,82	79100	2636,7	65,9	2	130
31	IonXpress_06 7	G04	3,17	15,58	77900	2596,7	64,9	2	128
32	IonXpress_06 8	H04	1,7	8,44	42200	1406,7	35,2	2	68

Redni broj	Barkod	Oznaka jažice	Ukupna koncentracija (ng/ul)	Koncentracija regije [200-500] (nmol/l)	Konc. nerazrijeđenih knjžnica [pM]	Konc. 30x razrijeđenih knjžnica [pM]	Faktor razrjeđenja za 40 pM [uL]	Vol. 30x razrijeđene knjžnice [uL]	Volumen H2O [uL]
33	IonXpress_06 9	I04	2,42	11,55	57750	1925,0	48,1	2	94
34	IonXpress_07 0	J04	3,43	16,06	80300	2676,7	66,9	2	132
35	IonXpress_07 1	K04	1,75	8,58	42900	1430,0	35,8	2	70
36	IonXpress_07 2	L04	1,68	8,08	40400	1346,7	33,7	2	65
37	IonXpress_07 3	M04	3,87	15,1	75500	2516,7	62,9	2	124
38	IonXpress_07 4	N04	1,9	9	45000	1500,0	37,5	2	73
39	IonXpress_07 5	O04	4,76	20,35	101750	3391,7	84,8	2	168
40	IonXpress_07 6	P04	3,49	13,22	66100	2203,3	55,1	2	108
41	IonXpress_07 7	A05	0,37	1,8	9000	300,0	7,5	2	13
42	IonXpress_07 8	B05	2,52	9,77	48850	1628,3	40,7	2	79
43	IonXpress_07 9	C05	2,3	9,36	46800	1560,0	39,0	2	76
44	IonXpress_08 0	D05	1,77	7,26	36300	1210,0	30,3	2	59
45	IonXpress_08 1	E05	2,28	9,84	49200	1640,0	41,0	2	80
46	IonXpress_08 2	F05	2,7	11,33	56650	1888,3	47,2	2	92
47	IonXpress_08 3	G05	1,8	8,32	41600	1386,7	34,7	2	67
48	IonXpress_08 4	H05	2,12	9,65	48250	1608,3	40,2	2	78
49	IonXpress_08 5	I05	1,81	8,14	40700	1356,7	33,9	2	66

Redni broj	Barkod	Oznaka jažice	Ukupna koncentracija (ng/ul)	Koncentracija regije [200-500] (nmol/l)	Konc. nerazrijeđenih knjžnica [pM]	Konc. 30x razrijeđenih knjžnica [pM]	Faktor razrjeđenja za 40 pM [uL]	Vol. 30x razrijeđene knjžnice [uL]	Volumen H2O [uL]
50	IonXpress_08 6	J05	1,36	6,27	31350	1045,0	26,1	2	50
51	IonXpress_08 7	K05	1,38	6,1	30500	1016,7	25,4	2	49
52	IonXpress_08 8	L05	2,39	10,86	54300	1810,0	45,3	2	89
53	IonXpress_08 9	M05	0,91	3,19	15950	531,7	13,3	2	25
54	IonXpress_09 0	N05	2	7,93	39650	1321,7	33,0	2	64
55	IonXpress_09 1	O05	2,16	8,37	41850	1395,0	34,9	2	68
56	IonXpress_09 2	P05	0,64	2,75	13750	458,3	11,5	2	21
57	IonXpress_09 3	A06	2,46	8,71	43550	1451,7	36,3	2	71
58	IonXpress_09 4	B06	0,51	2,14	10700	356,7	8,9	2	16
59	IonXpress_09 5	C06	0,83	3,74	18700	623,3	15,6	2	29
60	IonXpress_09 6	D06	1,16	5,09	25450	848,3	21,2	2	40



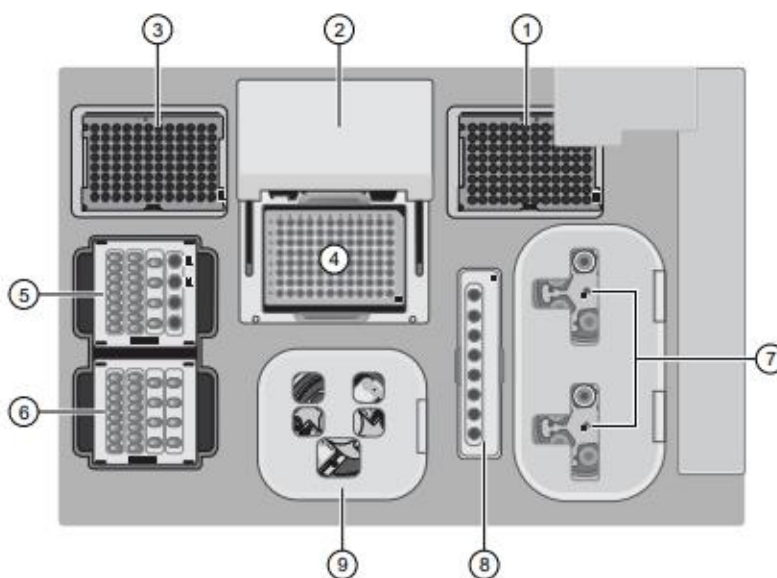
Slika 11. Kapilarna elektroforeza barkodiranih i pročišćenih knjižnica za pripremu *template*-a dobivena Agilent 2100 Bioanalyzer uređajem

3.2.1.9 Priprema *template*-a

Priprema *template*-a i punjenje Ion 530TM čipa učinjeno je u Ion Torrent Ion Chef uređaju pomoću Ion PGM Hi-Q View Chef Kita prema uputama proizvođača.

Ion Chef je uređaj koji omogućuje automatiziran i pojednostavljen postupak pripreme *template*-a i punjenja čipova za sekvenciranje (Slika 12).

Priprema *template*-a uključuje i reakciju emulzijskog PCR-a koji koristi ISP. Završetkom emulzijskog PCR-a slijedi obogaćivanje ISP-ova (engl.*enrichment*), čiji je cilj ispiranje praznih ISP-ova bez vezanih amplikona. Komplementarni lanac amplikona (koji su vezani na ISP) se potom odvaja da bi se mogao koristiti kao predložak za sekvenciranje.



1-Mjesto za odlaganje iskorištenih vrhova pipeta, 2-Automatizirani grijani poklopac, 3-Mjesto nekorištenih vrhova pipeta, 4-Thermal cycler, 5-Postaja za reagense, 6- Postaja za otopine, 7- Recovery centrifuges, 8- Postaja za obogaćivanje (engl. *enrichment*), 9-Centrifuga za punjenje čipova

Slika 12. Prikaz unutarnjih karakteristika Ion Torrent Ion Chef uređaja

Preuzeto i prilagođeno iz: [187].

Radni protokol pri korištenju IonChef uređaja:

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

1. Kreiranje radnog programa na Ion Chef uređaju pomoću Ion Torrent Ion Suite software-a

Odabir željenog radnog programa kreira se odabirom potrebnih kitova i čipova za pripremu *templete*-a u padajućim izbornicima. Osim kitova i čipova nužno je odabrati i željeni uređaj za sekvenciranje. Ion Torrent Ion 530 Kit–Chef , Ion 530TM čip i Ion PGM system su odabrani za potrebe ovog istraživanja. Dodatno, osim već navedenog, potrebno je odabrati i broj protoka (*flows*), broj korištenih barkodova u knjižnicama i imenovati svaki barkod prema nazivu odgovarajućeg uzorka. Za potrebe ovog istraživanja odabran je Chef Protocol – 400 bp (850 protoka) a broj barkodova je bio 60.

2. Priprema razrjeđenja knjižnica

Volumen od 25 µl je oduzet od prethodno pripremljenih razrijeđenja knjižnica (40pM) i udružen u jedan zajednički uzorak (engl. *pooled sample*). Pripremljena su i razrijeđenja kontrolnih knjižnica Human CEPH Control 200 library i E. Coli Control 400 Library prema uputama proizvođača.

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

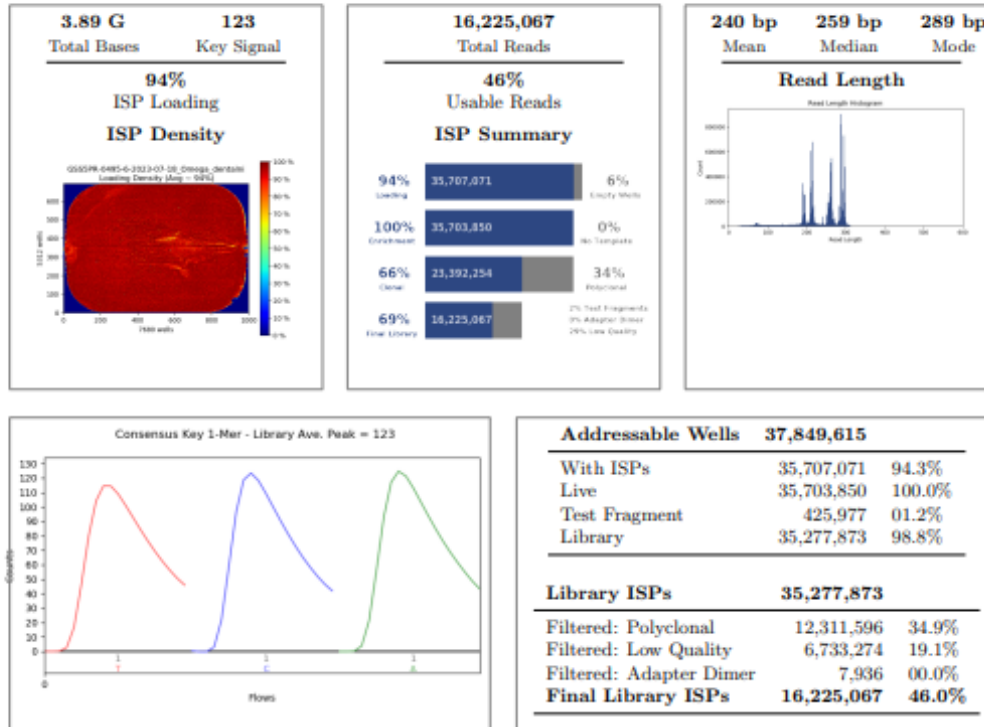
Ion Torrent Ion 530 Kit–Chef set i Ion 530™ čip postavljeni su u Ion Chef uređaj prema uputama proizvođača. Nakon završetka planiranog programa, čip je pažljivo uklonjen iz uređaja i pohranjen u poseban spremnik na +4 °C.

3.2.1.10 Sekvenciranje knjižnica metodom sekvenciranja nove generacije (NGS)

Sekvenciranje knjižnica koje se nalaze na Ion 530™ čipu učinjeno je pomoću Ion S5 Ion GeneStudio S5 System uređaja.

Analiza dobivenih rezultata provedena je pomoću softvera IonReporter 5.20. (Slika 13).

Run Summary

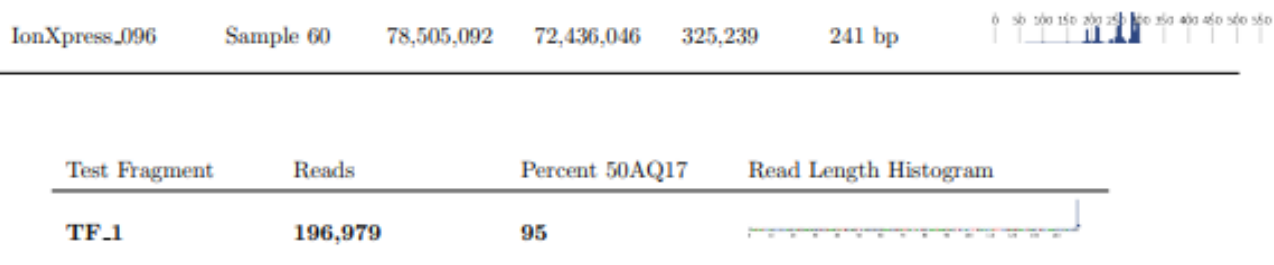


Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length	Read Length Histogram
No barcode	none	93,819,692	82,182,386	399,008	235 bp	
IonXpress_016	Sample 1	61,792,470	56,679,896	261,862	235 bp	
IonXpress_017	Sample 2	50,956,292	46,776,232	215,401	236 bp	
IonXpress_018	Sample 3	88,830,715	81,367,814	365,583	242 bp	
IonXpress_021	Sample 4	86,274,031	79,639,668	361,209	238 bp	
IonXpress_022	Sample 5	121,462,192	111,664,076	510,752	237 bp	
IonXpress_023	Sample 6	123,484,189	113,671,961	521,228	236 bp	
IonXpress_024	Sample 7	107,217,851	99,175,272	445,127	240 bp	

IonXpress_025	Sample 8	73,950,583	68,007,923	311,965	237 bp	
IonXpress_026	Sample 9	78,886,821	72,740,322	331,017	238 bp	
IonXpress_027	Sample 10	93,280,934	86,692,923	388,898	239 bp	
IonXpress_028	Sample 11	116,071,218	107,792,814	479,434	242 bp	
IonXpress_029	Sample 12	47,469,555	43,686,190	198,655	238 bp	
IonXpress_030	Sample 13	67,115,777	61,522,521	286,689	234 bp	
IonXpress_031	Sample 14	50,891,183	46,672,088	213,083	238 bp	
IonXpress_032	Sample 15	55,052,728	50,582,479	230,080	239 bp	
IonXpress_050	Sample 16	32,821,803	30,328,697	137,850	238 bp	
IonXpress_051	Sample 17	23,117,368	21,286,521	97,744	236 bp	
IonXpress_052	Sample 18	46,097,712	42,441,846	193,865	237 bp	
IonXpress_053	Sample 19	67,747,126	62,254,898	284,965	237 bp	
IonXpress_054	Sample 21	26,911,410	24,795,447	111,050	242 bp	
IonXpress_056	Sample 20	32,731,553	30,300,858	136,347	240 bp	
IonXpress_057	Sample 22	31,782,639	29,043,783	135,793	234 bp	
IonXpress_059	Sample 23	34,659,058	31,866,909	146,577	236 bp	
IonXpress_060	Sample 24	42,873,743	39,532,323	180,620	237 bp	
IonXpress_061	Sample 25	54,020,025	49,686,488	219,749	245 bp	
IonXpress_062	Sample 26	63,512,340	58,030,498	264,335	240 bp	
IonXpress_063	Sample 27	43,620,387	40,175,963	185,178	235 bp	
IonXpress_064	Sample 28	33,789,522	31,114,019	140,014	241 bp	
IonXpress_065	Sample 29	17,594,774	16,142,345	73,572	239 bp	
IonXpress_066	Sample 30	50,404,944	46,447,804	209,021	241 bp	
IonXpress_067	Sample 31	48,760,802	44,706,437	203,227	239 bp	
IonXpress_068	Sample 32	48,376,056	44,585,505	198,932	243 bp	
IonXpress_069	Sample 33	31,640,825	29,107,548	131,652	240 bp	

IonXpress_070	Sample 34	45,561,569	41,868,113	186,263	244 bp	
IonXpress_071	Sample 35	45,579,741	42,229,359	187,815	242 bp	
IonXpress_072	Sample 36	42,167,345	38,976,806	172,890	243 bp	
IonXpress_073	Sample 37	53,231,815	48,680,041	223,932	237 bp	
IonXpress_074	Sample 38	34,081,409	31,427,532	141,995	240 bp	
IonXpress_075	Sample 39	41,206,130	38,056,775	171,319	240 bp	
IonXpress_076	Sample 40	57,293,158	52,670,149	238,137	240 bp	
IonXpress_077	Sample 41	173,492,153	159,082,981	723,508	239 bp	
IonXpress_078	Sample 42	82,459,091	76,362,463	343,107	240 bp	
IonXpress_079	Sample 43	92,668,191	84,781,918	377,140	245 bp	
IonXpress_080	Sample 44	74,827,170	69,102,471	303,067	246 bp	
IonXpress_081	Sample 45	70,589,496	64,675,508	293,695	240 bp	
IonXpress_082	Sample 46	80,266,300	73,754,671	337,095	238 bp	
IonXpress_083	Sample 47	80,507,209	74,152,742	330,158	243 bp	
IonXpress_084	Sample 48	59,810,756	54,978,976	249,944	239 bp	
IonXpress_085	Sample 49	76,502,846	70,528,038	313,419	244 bp	
IonXpress_086	Sample 50	64,833,062	59,619,039	269,414	240 bp	
IonXpress_087	Sample 51	75,548,606	69,557,633	314,421	240 bp	
IonXpress_088	Sample 52	68,201,387	62,502,849	284,417	239 bp	
IonXpress_089	Sample 53	29,281	26,668	124	236 bp	
IonXpress_090	Sample 54	64,171,713	59,054,850	263,972	243 bp	
IonXpress_091	Sample 55	80,072,660	73,672,641	333,440	240 bp	
IonXpress_092	Sample 56	98,893,708	91,390,006	410,490	240 bp	
IonXpress_093	Sample 57	70,300,270	64,563,609	292,649	240 bp	
IonXpress_094	Sample 58	70,376,024	64,803,801	297,831	236 bp	
IonXpress_095	Sample 59	64,362,665	59,224,865	268,111	240 bp	

iontorrent
by Thermo Fisher Scientific



Slika 13. Izveštaj za sekvenciranje DNA za što je korištena Ion Torrent platforma (Run Report for Auto user GSS5PR-0495-6-2023-07-18 Omega dentalni 162)

3.2.2 Statistička obrada podataka

Za izračun veličine uzorka korišten je G*Power 3.1.9.4 softver (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Njemačka) na temelju prethodnih istraživanja rezultata analize subgingivnog mikrobioma nepušača i pušača cigareta, THS sustav i e-cigarete [186].

Analiza snage također je pokazala da je za učinak $f = 0,4$, s testnom snagom od 0,8 i razinom značajnosti od 0,05 minimalne veličine uzorka za istraživanje je 66 ispitanika (22 po skupini). Izračun je napravljen u G*Poweru, 3.1.9.4 softver (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Njemačka).

Statistička obrada podataka provedena je koristeći komercijalni softver SPSS IBM 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, SAD). Rezultati su interpretirani na razini statističke značajnosti $P < 0,05$ a svi intervali pouzdanosti su bili na 95% - tnoj razini.

Učestalosti među skupinama uspoređivane su χ^2 i Fisherovim egzaktnim testom. Z-test za proporcije s Bonferronijevom korekcijom korišten je za višestruke usporedbe nakon χ^2 testa. Budući da je bilo manje od 30 sudionika po skupini, a kontinuirane varijable nisu imale normalnu distribuciju, što je provjereno provjereno Shapiro-Wilkovim testom, korištena je neparametrijska statistika. Središnja tendencija s disperzijom prikazana je medijanima i interkvartilnim rasponom.

Kontinuirane varijable analizirane su pomoću Kruskal–Wallisovog i Mann–Whitneyjevog testa s Bonferronijevom korekcijom p vrijednosti za višestruke usporedbe.

Veličina učinka za χ^2 i Fisherov test kvantificirana je Cramerovim V, formulom $\epsilon^2 = H/[(n^2 - 1)/(n + 1)]$ za Kruskal–Wallis, i formulom $r = Z/\sqrt{N}$ za Mann–Whitney test. Za tumačenje su korišteni Cohenovi kriteriji: $r = 0,25-0,3 =$ mala veličina učinka, $0,3-0,5 =$ umjerena, $0,5-0,7 =$ velika i $>0,7 =$ vrlo velika. Za interpretaciju Cramerovog V korišteni su isti kriteriji, dok su za ϵ^2 korištene kvadratne vrijednosti r. Za analizu prediktora parodontitisa korištena je logistička regresija. Linearna regresija korištena je za analizu prediktora broja parodontopatogenih vrsta.

4 REZULTATI

4.1 Rezultati istraživanja o utjecaju dima cigarete i aerosola IQOS-a na parodontni status mjeren parodontnim indeksima

4.1.1 Osnovna obilježja ispitanika i analiza Upitnika o parodontnom zdravlju

Ispitanici su bili stari između 26-56 godina (medijan 38; interkvartilni raspon 34-54), a 42/66 (64%) bile su žene. Analizom upitnika kojeg su ispunjavali pacijenti zaključuje se da nije bilo velikih razlika u protokolima oralne higijene ili učestalosti pranja zuba između tri skupine. Svi ispitanici koristili su četkicu za zube, 23/66 (35%) koristilo je konac, 20/66 (30%) interdentalnu četkicu, a 17/66 (26%) vodicu za ispiranje usta. Sudionici su uglavnom prali zube dva puta dnevno (48/66 (73%)) ili $\geq 3 \times$ (12/66 (18%)).

Dnevna uporaba cigareta i duhanskih umetaka bila je slična (≥ 10 dnevno 18/22 (53%) u skupini IQOS i 16/22 (47%) u skupini pušača cigareta.

Pušači cigareta imali su dulje iskustvo pušenja od korisnika IQOS općenito, s umjerenom veličinom učinka (≥ 5 godina 91% naspram 47%; $p = 0,034$; $V = 0,367$) (Tablica 5).

Tablica 5. Usporedba sociodemografskih varijabli, pušenja i oralne higijene među skupinama.

	Nepušači	IQOS	Pušači cigareta	<i>p</i>
Dob^b	38.5 (33.0– 44.5)	37.0 (33.8– 44.3)	38.0 (34.0– 44.8)	0.998 ^a
Spol (udio žena)	14/22	14/22	14/22	1.000 ^c
Dugotrajnost pušenja (≥5 years)	-	13/22	20/22	0.034 ^d
Dnevna potrošnja (≥10 cigareta/duhanski umetak)	-	18/22	16/22	0.721 ^d
Učestalost četkanja zuba (≥3×)	4/22	5/22	3/22	0.737 ^c
Upotreba zubne svile	7/22	10/22	6/22	0.420 ^c
Upotreba međuzubnih četkica	7/22	9/22	4/22	0.256 ^c
Upotreba vodica za ispiranje usta	5/22	6/22	6/22	0.924 ^c

^a Kruskal-Wallisov test, ^b Medijani s interkvartilnim rasponom (IQR) u zagradama, ^c χ^2 test, ^d Fisherov egzaktni test

4.1.2 Usporedba ispitanika na temelju pušačkog statusa u odnosu na parodontne indekse

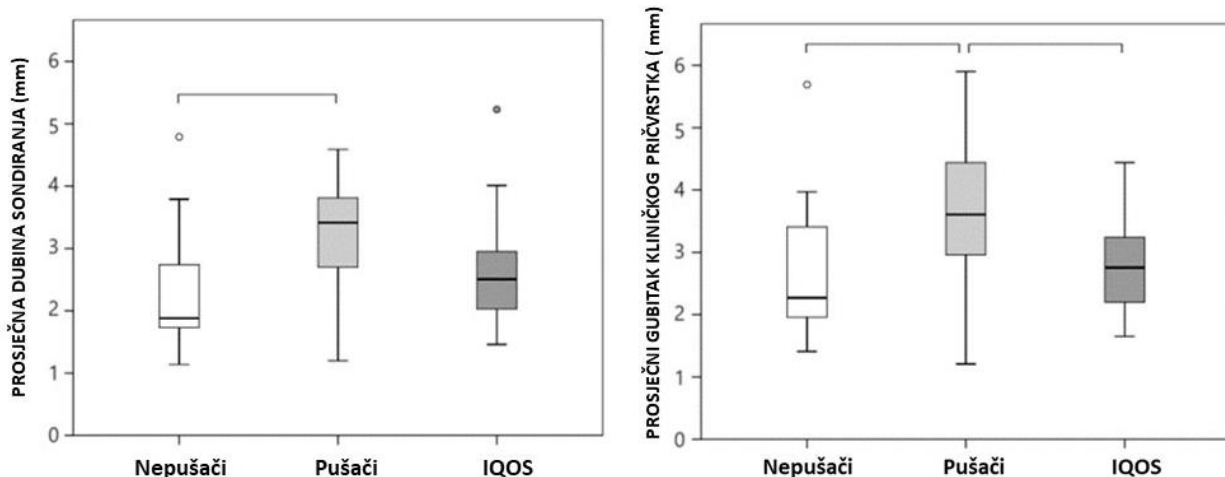
Parodontitis je imalo ukupno 30 ispitanika (50,8%). Svi ispitanici su imali parodontitis stadija III i razreda B osim pušača, koji su imali stadij III i razred C.

Tri skupine ispitanika razlikovale su se samo u prosječnom CAL-u i PPD-u ($p \leq 0,002$), s umjerenom veličinom učinka ($\epsilon^2 = 0,214$ za PD i $0,185$ za CAL). Pušači cigareta imali su najviše, a nepušači najniže vrijednosti, s velikom veličinom učinka za PPD i umjerenom za CAL ($r = 0,524$ i $0,467$; $p \leq 0,002$; (Tablica 6 i Slika 14.). Korisnici IQOS-a imali su niže vrijednosti od pušača, pri čemu su razlike bile značajne samo za CAL, s umjerenom veličinom učinka ($r = 0,383$; $p = 0,011$). Skupina IQOS je imala lošije stanje parodontnih tkiva u odnosu na nepušače mjerljivo indeksima CAL i PPD, ali nije dosegla razinu statističke značajnosti (Tablica 6).

Tablica 6. Parodontni indeksi u odnosu na status pušenja

	Nepušači	IQOS	Pušači cigareta	<i>p</i>^a
Broj NZ ^{b,c}	1 (0–3)	2 (0–3)	2 (0–7)	0.211
PPD	1.88 (1.72–2.80)	2.51 (2–3.06)	3.42 (2.66–3.82)	0.001
GR	0.31 (0.01–0.46)	0.24 (0.1–0.47)	0.34 (0.11–0.82)	0.408
FD	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.751
TM	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–1.03)	0.266
FMPS	57.85 (35.79–62.49)	57.14 (41.54–72.11)	63.39 (49.04–76.78)	0.408
FMBS	57 (31.10–82.96)	50.78 (35.43–69.92)	67.44 (47.5–100)	0.210
CAL	2.27 (1.96–3.42)	2.75 (2.19–3.24)	3.6 (2.9–4.47)	0.002

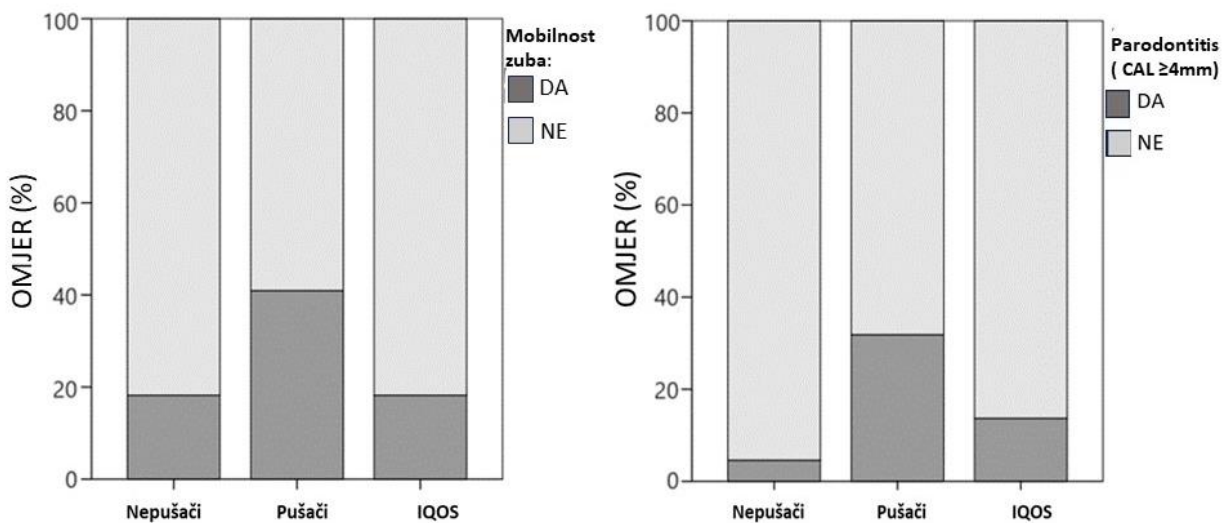
^a Kruskal-Wallisov test. ^b Broj NZ, broj zuba koji nedostaju Medijani s interkvartilnim rasponom, IQR u zagradama prikazani su za sve varijable.



*Kružići predstavljaju izuzetke, dok vodoravne linije povezuju skupine koje se značajno razlikuju.

Slika 14. Usporedba prosječne dubine sondiranja i gubitka kliničkog pričvrstka između skupina izloženih nikotinu.

Kad je parodontitis definiran kao prosječni $CAL \geq 4$ mm, njegova se prevalencija razlikovala među skupinama, s umjerenom veličinom učinka ($p = 0,047$; $V = 0,304$) (96). Prosječni $CAL \geq 4$ mm bio je zastupljeniji u skupini pušača cigareta (7/22; 32%) nego kod korisnika IQOS (3/22; 14%) i nepušača (1/22; 5%). Razlika između posljednje dvije skupine nije bila značajna. Skupine se nisu značajno razlikovale u pogledu pokretljivosti zuba, no najveću prevalenciju pokretljivosti imali su pušači klasičnih cigareta, dok su nepušači i pušači IQOS-a imali istu prevalenciju (Slika 15). Prevalencija parodontitisa među skupinama izloženim duhanu raste sljedećim redoslijedom: IQOS (41%) < nepušači (44%) < pušači cigareta (68%), ali bez statistički značajnih razlika među skupinama (Tablica 7).

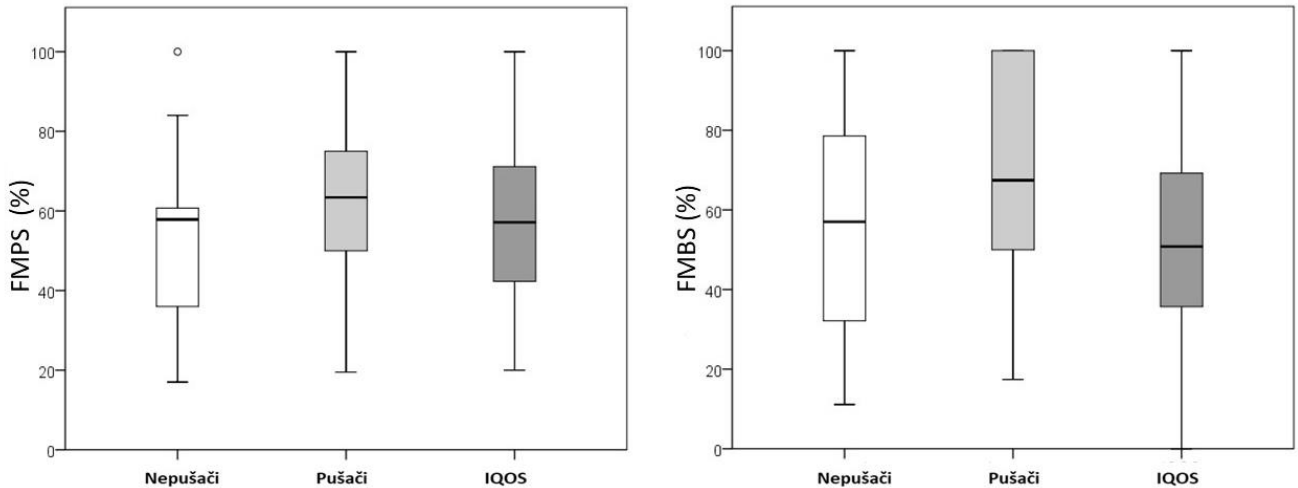


Slika 15. Prevalencija pomičnih zuba i prisustva parodontitisa među skupinama.

Tablica 7. Distribucija parodontitisa između kontrolne skupine (nepušači - NP), korisnika IQOS-a i klasičnih pušača (P).

Prisustvo parodontitisa			
Izloženost duhanu	Bez parodontitisa	Parodontitis	Ukupno
NP (N (%))	10 (55.6%)	8 (44.4%)	18 (100%)
IQOS (N (%))	13 (59.1%)	9 (40.9%)	22 (100%)
P (N (%))	6 (31.6%)	13 (68.4%)	19 (100%)
Total (N (%))	29 (49.2%)	30 (50.8%)	59 (100%)

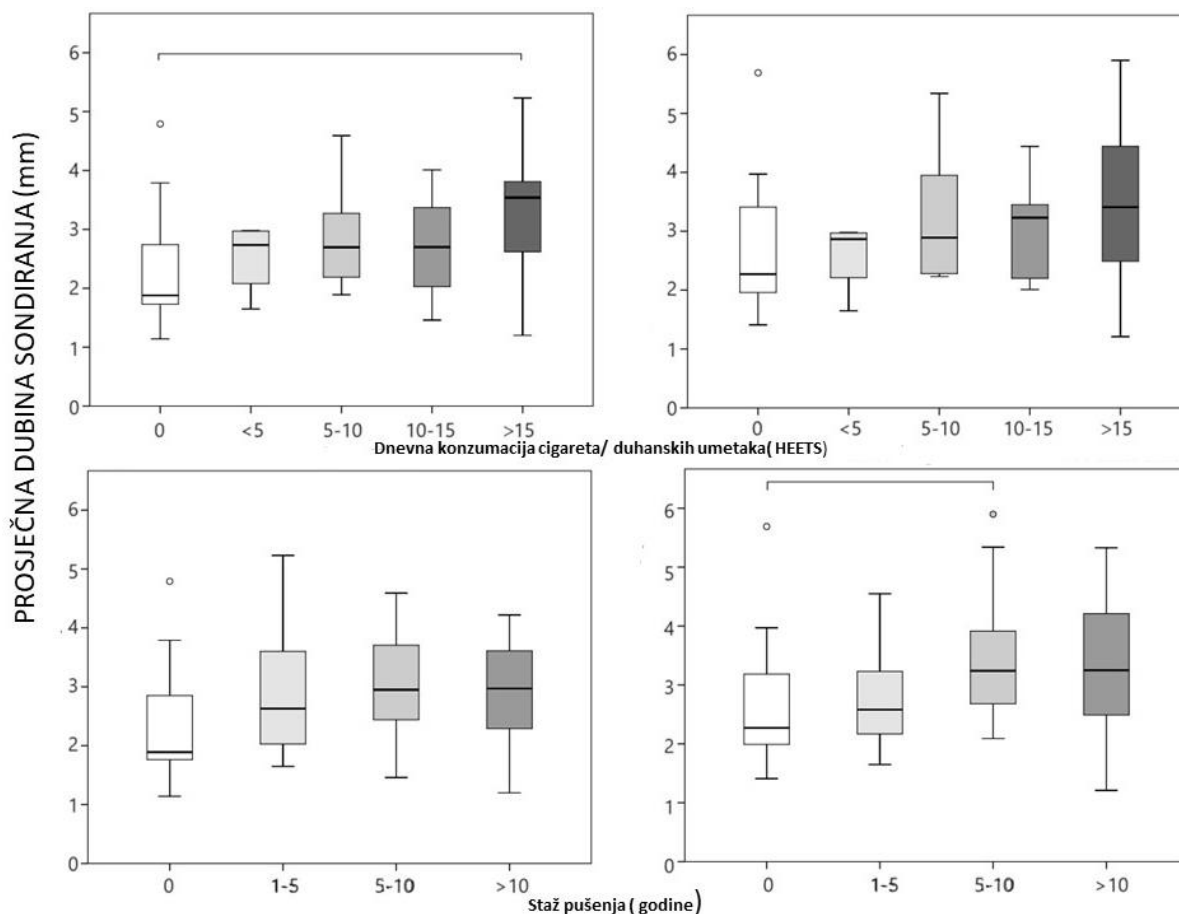
Opseg nakupljanja plaka i gingivitisa bio je najveći kod pušača, a najmanji kod korisnika IQOS, ali razlike nisu bile statistički značajne (Slika 16).



*Kružići predstavljaju izvanredne vrijednosti.

Slika 16. Opseg nakupljanja plaka i opseg gingivitisa između skupina

PPD se značajno razlikovao između kategorija dnevne izloženosti nikotinu ($p = 0,011$), ali statistički značajno samo između skupina nepušača i onih koji su pušili ≥ 15 cigareta/duhanskih umetaka dnevno ($p = 0,004$; $r = 0,521$; Slika 17). CAL i PD razlikovali su se između kategorija pušačkog iskustva ($p \leq 0,030$), međutim višestruke usporedbe otkrile su samo razliku u CAL-u između nepušača i onih koji su pušili 5-10 godina ($p = 0,045$; $r = 0,418$; Slika 17). Kad su kategorije dihotomizirane (pušački staž ≥ 5 godina i dnevna konzumacija nikotina ≥ 10 cigareta/duhanskih umetaka), otkrivene su značajne razlike među skupinama ($p \leq 0,012$; $r = 0,309-0,503$), s lošijim uvjetima kada je pušačko iskustvo bilo ≥ 5 godina, a dnevna konzumacija nikotina bila je ≥ 10 cigareta/duhanski umetak. Nisu otkriveni značajni odnosi između iskustva pušenja, dnevne konzumacije nikotina i drugih parodontnih pokazatelja.



*Kružići predstavljaju izuzetke, dok vodoravne linije povezuju skupine koje se značajno razlikuju.

Slika 17. Odnos između dnevne izloženosti nikotinu i duljine pušenja s dubinom sondiranja i gubitkom pričvrstka.

U univarijantnoj analizi (Fischerov egzakti test), parodontitis je bio povezan s pušenjem običnih cigareta ($p = 0,033$; $V = 0,287$; OR 4,7; 95% CI 1,2–18,3) i dnevnom konzumacijom nikotina (dihotomizirano s ograničenjem ≥ 10 cigareta/IQOS) ($p = 0,045$; $V = 0,271$; OR 5,4; 95% CI 1,1–27,3). Nije bilo povezanosti sa spolom, dobi (dihotomizirano s ograničenjem ≥ 41 godina), pušenjem općenito, pušenjem IQOS-a, iskustvom pušenja (dihotomizirano s ograničenjem ≥ 5 godina), korištenjem interdentalne četkice, zubne svile ili vodice za ispiranje usta ili učestalošću dnevnog korištenja četkice. Kada su korisnici IQOS-a s duljinom pušenja do 5 godina ($N = 9$) i više od 5 godina ($N = 13$) uspoređeni prema PPD i CAL kao markera parodontitisa, također nije

bilo statističke značajnosti. Međutim, nije bilo razlika niti statističke značajnosti niti u drugim parametrima (FMPS, FMBS, TM, GR, FD).

U višestrukoj logističkoj regresiji ispitani su slijedeći parametri: spol (0 = Ž; 1 = M), dob ($0 \leq 40$; $1 \geq 41$ godina), pušenje IQOS (0 = ne; 1 = da), klasično pušenje cigareta (0 = ne; 1 = da), dnevna konzumacija nikotina ($0 \leq 9$ cigareta/IQOS duhanski umeci; $1 \geq 10$), iskustvo pušenja ($0 \leq 4$ godine; $1 \geq 5$ godina), učestalost dnevnog pranja zuba ($0 \leq 2\times$; $1 \geq 3\times$), korištenje interdentalne četkice (0 = ne; 1 = da), korištenje zubne svile (0 = ne; 1 = da) i korištenje tekućine za ispiranje usta (0 = ne; 1 = da). Korišteno je nekoliko pristupa (stupnjeviti hijerarhijski, naprijed i unatrag). Model koji je uključivao značajne varijable iz univarijantnih analiza (pušenje cigareta i dnevna konzumacija nikotina) nije bio značajan (Model 1; Tablica 8). Pristup korak po korak prema naprijed pokazao je da je najbolji model bio onaj koji je imao samo pušenje cigareta kao prediktor parodontitisa (prosječni gubitak pričvrstka ≥ 4 mm), s omjerom izgleda (OI) od 4,7 (95% interval pouzdanosti 1,2-18,3; $p = 0,027$). Model je ispravno klasificirao 83% slučajeva s Negelkerkeovim pseudo $R^2 = 0,126$ (Model 2, Tablica 8).

Tablica 8. Prediktor parodontitisa u logističkoj regresiji (prosječni gubitak pričvrstka ≥ 4 mm).

Model	Varijabla	B	SE	p	OI (95% IP)
Model 1	Pušenje cigareta	1.2	0.7	0.094	3.4 (0.8–14.0)
	Dnevna potrošnja duhanskog proizvoda (≥ 10 cigareta/duhanski umetak)	1.4	0.9	0.110	3.9 (0.7–21.1)
	Konstanta	-3.1	0.8		
Model 2	Pušenje cigareta	1.5	0.7	0.027	4.7 (1.2–18.3)
	Konstanta	-2.3	0.5		

B—logistički koeficijent, SE—standardna pogreška, OI—omjer izgleda, p—razina značajnosti, IP—interval pouzdanosti.

4.1.3 Usporedba ispitanika na temelju pušačkog statusa u odnosu na subgingivni mikrobiom

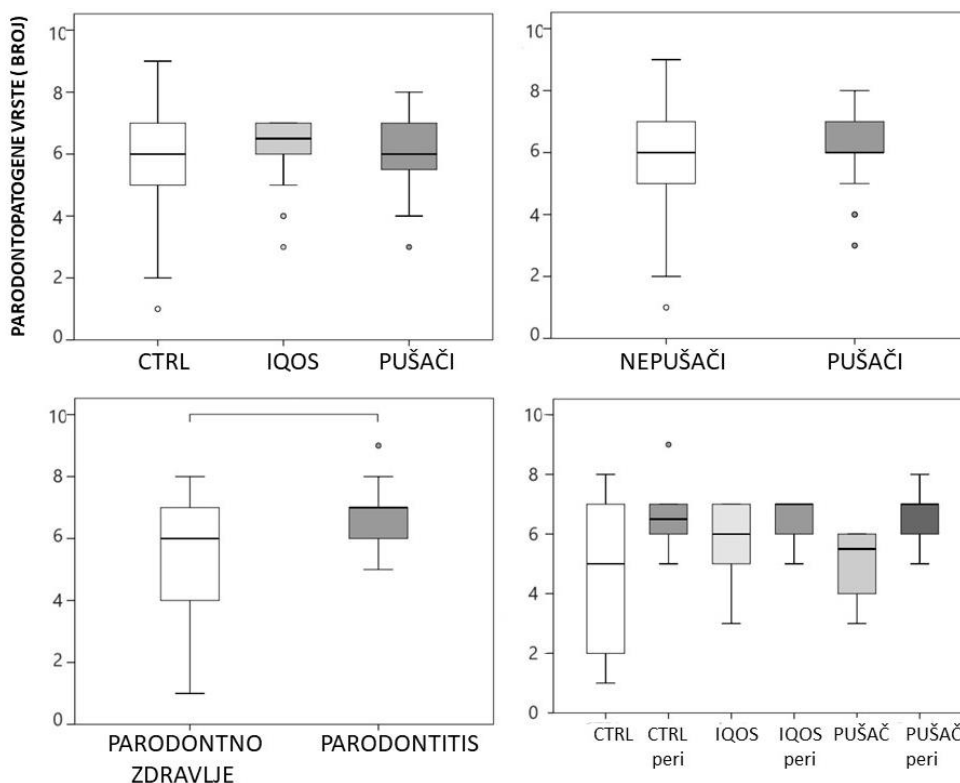
Broj parodontopatogenih vrsta (ljestvica 0-9 vrsta) bio je sličan u sve tri skupine (nepušači (medijan 6 vrsta) = pušači (medijan 6 vrsta) < IQOS (medijan 6,5 vrsta), a sličan u pušača i nepušača (oba medijan 6).

Broj parodontopatogenih vrsta je značajno viši u onih s parodontitisom nego bez bolesti s umjerenom veličinom učinka (7 naspram 6; $p=0,005$; $r=-0,368$; Slika 18).

Kada se kombinira izloženost dimu/aerosolu i parodontni status, svaka izložena skupina imala je više parodontopatogenih vrsta od nepušača: nepušači bez parodontitisa (medijan 5 vrsta) < pušači bez parodontitisa (5,5) < IQOS bez parodontitisa (6); nepušači s parodontitisom (6,5) < IQOS s parodontitisom (7) = pušači s parodontitisom (7), međutim, razlike nisu dosegle statističku značajnost.

Broj parodontopatogenih vrsta nije bio povezan s dobi, spolom ili FMPS-om.

U višestrukoj linearnoj regresiji parodontitis je bio jedini prediktor broja parodontopatogenih vrsta (ovisna varijabla), kada se kontrolira učinak konzumiranja gorućeg i grijanog duhana, spola, dobi i oralne higijene (prilagođeni $R^2=0,163$; $p=0,012$). Parodontitis, pušenje i grijani duhan, dob, spol i FMPS bili su nezavisne varijable.



*Brkata kutija (engl. Box and whisker plot) predstavlja interkvartilni raspon, medijan vodoravne linije, brkovi (engl.whiskers) minimalne i maksimalne vrijednosti a kružići izvanredne vrijednosti i ekstreme. Horizontalna linija povezuje grupe koje se bitno razlikuju.

Slika 18. Broj parodontopatogenih vrsta u skupinama formiranim prema izloženosti duhanu, prisutnosti parodontitisa i njihovoj kombinaciji.

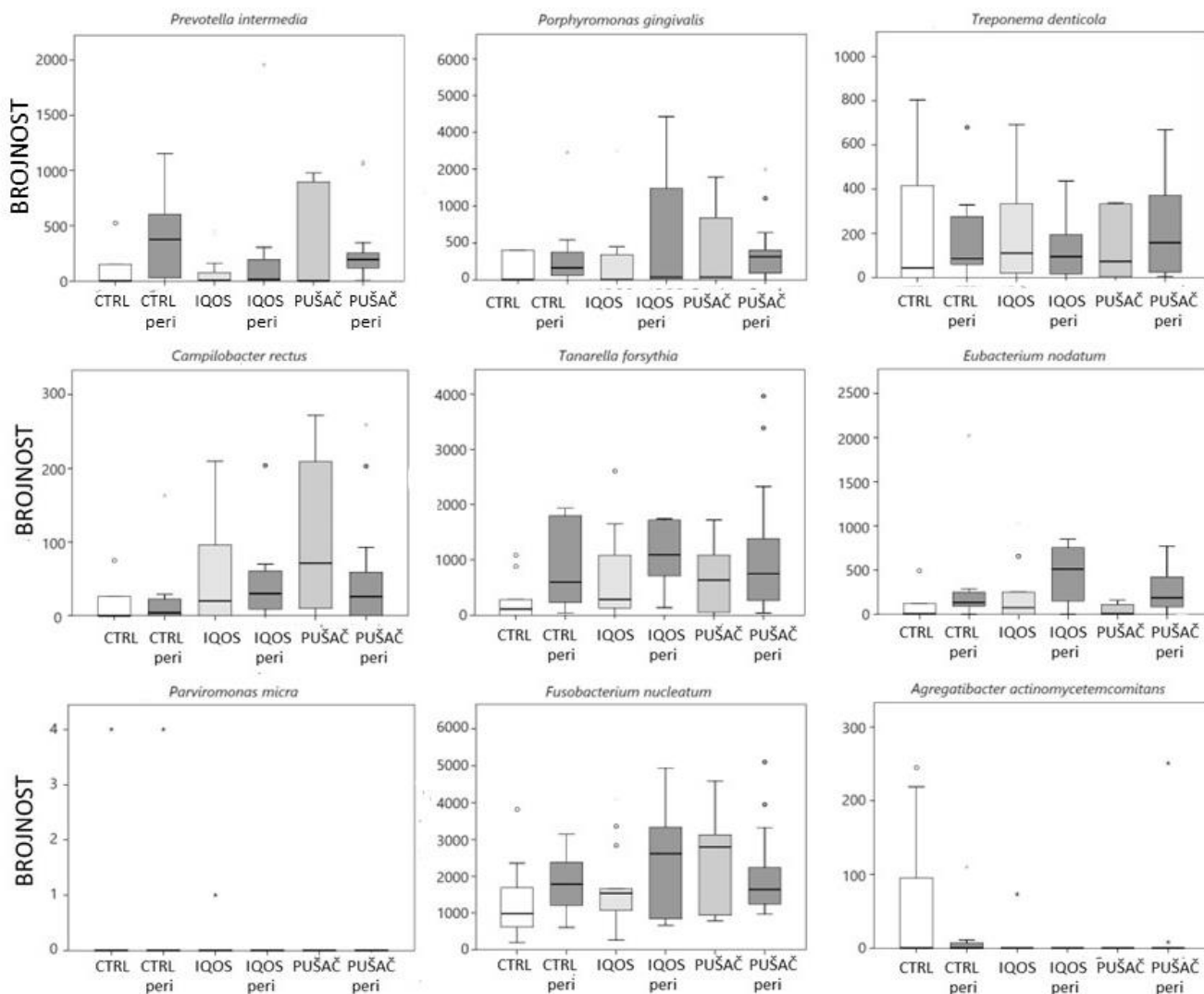
Medijan omjera parodontopatogenih vrsta u biofilmu u cijelom uzorku bio je <7%, pri čemu je *F. nucleatum* bio najzastupljeniji (4%), a slijede ga *T. forsythia* (3%), *P. gingivalis* (0,3%), *E. nodatum* (0,03%) i *T. denticola* (0,02%), dok je udio ostalih manji od 0,01%.

Razlike između pušača, nepušača i IQOS-a u omjeru parodontopatogenih vrsta bile su prisutne samo kod *A. actinomycetemcomitans* ($p=0,013$) gdje su nepušači imali najveći, a IQOS najmanji omjer.

Uspoređujući sve vrste pušača s nepušačima, razlikovali su se u omjeru *A. actinomycetemcomitans* i *C. rectus* ($p\leq 0,047$) pri čemu *A. actinomycetemcomitans* ima veći omjer kod nepušača, dok *C. rectus* kod pušača.

Ispitanici s parodontitisom imali su veći omjer *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* i *E. nodatum* nego oni bez parodontitisa ($p\leq 0,039$), s najvećim omjerom u slučaju *T. forsythia* (2 naspram 0,1%; $p=0,009$). Prema izloženosti duhanu, najviše razine *C. rectus* i *F. nucleatum* zabilježene su u skupini pušača, dok je *F. nucleatum* bila najdominantnija bakterija u IQOS skupini.

A. actinomycetemcomitans bio je najzastupljeniji u kontrolnoj skupini (CTRL). Uspoređujući skupine s izloženošću duhanu i parodontitisom, *P. intermedia* imala je najveću brojnost u kontrolnoj skupini s parodontitisom (CTRL Peri), dok su *P. gingivalis* i *T. denticola* bile najdominantnije u pušača s parodontitisom (S peri). *T. forsythia* i *E. nodatum* iskazale su najviše razine u skupini konzumentata IQOS-a s parodontitisom (IQOS Peri) (Slika 19).

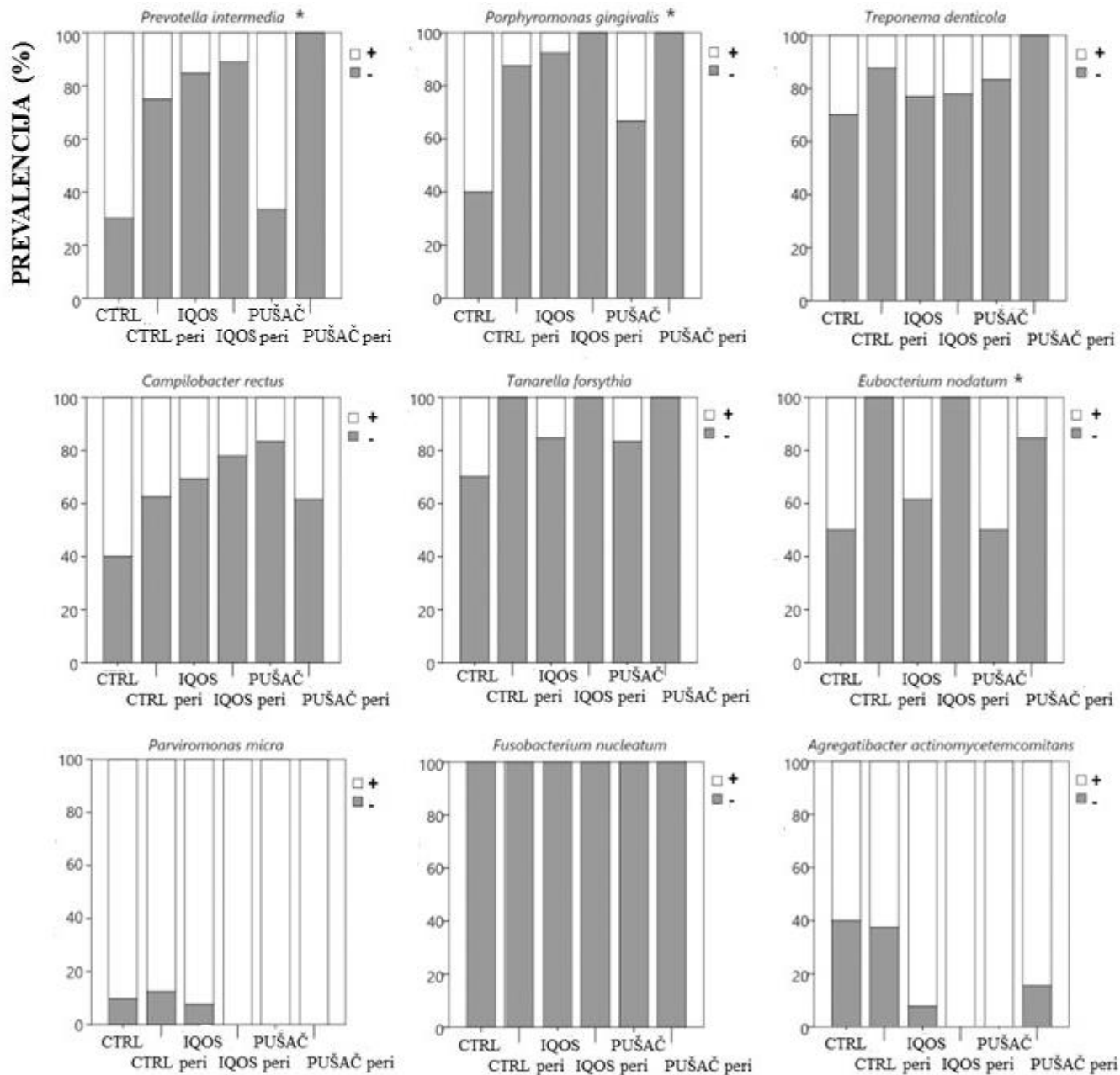


*Okvir predstavlja interkvartilni raspon, medijan vodoravne linije, brkovi minimalne i maksimalne vrijednosti, kružići i zvjezdice izvanredne vrijednosti i ekstreme.

Slika 19. Brojnost parodontopatogenih vrsta prema izloženosti duhanu i prisutnosti parodontitisa.

Svi pušači običnih cigareta s parodontitisom (S peri) uvijek su imali prisutne *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* i *F. nucleatum* u subgingivnom zubnom plaku.

Kod korisnika IQOS-a s parodontitisom *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. nodatum* i *F. nucleatum* su najčešći nalaz, dok su u skupini nepušača s parodontitisom (CTRL Peri) to bili *T. forsythia*, *E. nodatum* i *F. nucleatum* (Slika 20).



*Zvezdicama su označene bakterije čija se prevalencija značajno razlikovala između skupina.

+/- Pristutstvo ili odsutstvo bakterije

Slika 20. Prevalencija parodontopatogenih vrsta prema izloženosti nikotinu i prisutnosti parodontitisa.

4.1.4 Utjecaj ekspozicije duhana i prisutstva parodontitisa na mikrobiološki sastav subgingivnog biofilma

Za sastav bakterijske flore dob nije relevantna prema ovom istraživanju. *P. intermedia* bila je zastupljenija u muškaraca nego u žena (medijan 305 naspram 6; $p=0,003$; $r=-0,385$), ali za druge bakterije nije nađena razlika u odnosu na prisustvo u određenog spola. Oralna higijena, procijenjena FMPS-om, korelirala je samo sa *P. gingivalis* ($r=0,280$; $p=0,032$), *T. forsythia* ($r=0,365$; $p=0,005$) i *E. nodatum* ($r=0,290$; $p=0,002$).

Prevalencija parodontopatogenih bakterija u skupini formiranoj prema izloženosti nikotinu prikazana je u Tablici 9. , dok u skupini formiranoj prema prisutnosti parodontitisa u Tablici 10. Prema Tablici 9. možemo zaključiti da je najveća prevalencija bakterija u pušača bila s *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *T. denticola* i *P. gingivalis*. U IQOS konzumenata su to bili *F. nucleatum*, *P. gingivalis* i *T. forsythia* dok je u nepušača najviša prevalencija zabilježena za *F. nucleatum*, *T. forsythia* i *T. denticola*.

Tablica 9. Prevalencija parodontopatogenih bakterija u kontrolnoj skupini (nepušači - NS), korisnici IQOS-a i obični pušači (S).

Bakterija	S (N (%))	IQOS (N (%))	NS (N (%))	p*	V
<i>Prevotella intermedia</i>	15/19 (79%)	19/22 (86%)	9/18 (50%)	0.028	0.348
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	17/19 (90%)	21/22 (96%)	11/18 (61%)	0.010	0.393
<i>Treponema denticola</i>	18/19 (95%)	7/22 (77%)	14/18 (78%)	0.257	0.215
<i>Campylobacter rectus</i>	13/19 (68%)	16/22 (73%)	9/18 (50%)	0.297	0.203
<i>Tannerella forsythia</i>	18/19 (95%)	20/22 (91%)	15/18 (83%)	0.507	0.152
<i>Eubacterium nodatum</i>	14/19 (74%)	17/22 (77%)	13/18 (72%)	0.930	0.050
<i>Parvimonas micra</i>	0	1/22 (5%)	2/18 (11%)	0.303	0.201
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	19/19 (100%)	22/22 (100%)	18/18 (100%)	-	-
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	2/19 (11%)	1/21 (5%)	7/18 (39%)	0.010	0.393

*Hi-kvadrat test

Tablica 10. ukazuje na povećanu prevalenciju *T. forsythia*, *P. gingivalis* te *E. nodatum* u pacijenata oboljelih od parodontitisa. U pacijenata bez parodontitisa također je najviša prevalencija zabilježena za *T. forsythiu* ali u nešto nižem postotku (79 %). Slijede *T. denticola* i *P. gingivalis*.

Tablica 10. Prevalencija parodontopatogenih bakterija u ispitanika s i bez parodontitisa

Bakterija	Parodontitis	Bez parodontitisa	p*	V
<i>Prevotella intermedia</i>	27/30 (90%)	16/29 (55%)	0.003	0.392
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	29/30 (97%)	20/29 (69%)	0.005	0.369
<i>Treponema denticola</i>	27/30 (90%)	22/29 (76%)	0.148	0.188
<i>Campylobacter rectus</i>	20/30 (67%)	18/29 (62%)	0.712	0.048
<i>Tannerella forsythia</i>	30/30 (100%)	23/29 (79%)	0.001	0.342
<i>Eubacterium nodatum</i>	28/30 (93%)	16/29 (55%)	0.011	0.438
<i>Parvimonas micra</i>	1/30 (3%)	2/29 (7%)	0.533	0.081
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	30/30 (100%)	29/29 (100%)	-	-
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5/30 (17%)	5/29 (17%)	0.958	0.008

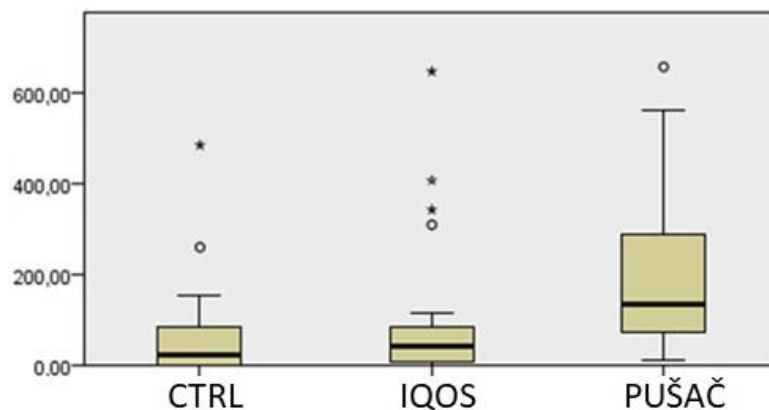
*Hi-kvadrat test

4.2 Kanonička diskriminacijska funkcija

Univarijantnim analizama ukupno je analizirano 235 bakterijskih vrsta, od toga ih se 6 razlikovalo između tri grupe (nepušač, pušač, IQOS). Korišten je Kruskal-Wallisov test, a kod post-hoc usporedbe parova korištena je Bonferronijeva korekcija.

Actinomyces dentalis

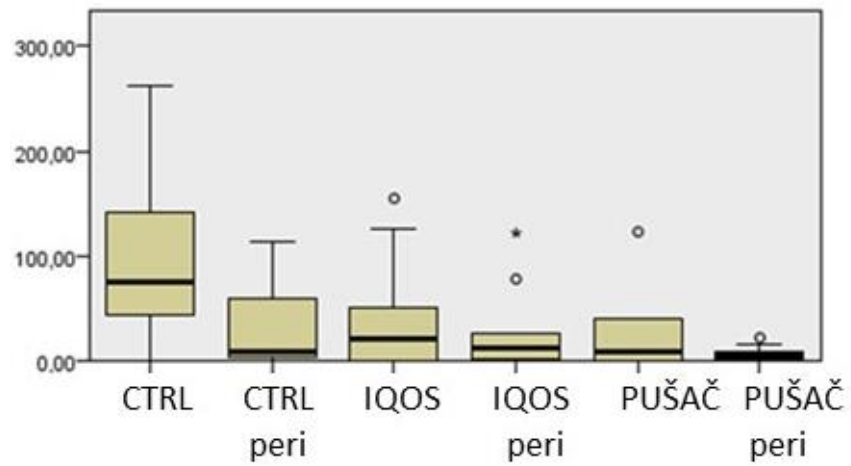
Za bakteriju *Actinomyces dentalis* je utvrđeno da je njena brojnost znatno različita između grupa temeljenih na izloženosti duhanu ($p=0,005$). U grupi pušača klasičnih cigareta zabilježena je znatno veća brojnost nego u nepušača ($p=0,006$) i u grupi IQOS-a naspram pušača ($p=0,036$) (Slika 21).



Slika 21. Brojnost *A. dentalis* u skupinama izloženih duhanu

Actinomyces massiliensis

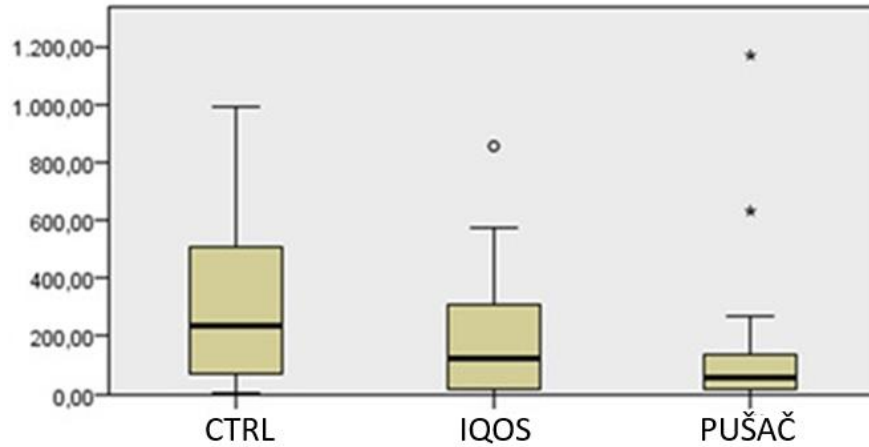
Za *A. massiliensis* je nađena znatna razlika između tri grupe ($p=0,032$) i onda kada su se usporedile vrijednosti skupina pušača cigareta i nepušača ($p=0,026$) (Slika 22).



Slika 22. Brojnost *A. massiliensis* u skupinama izloženih duhanu

Actinomyces naeslundii

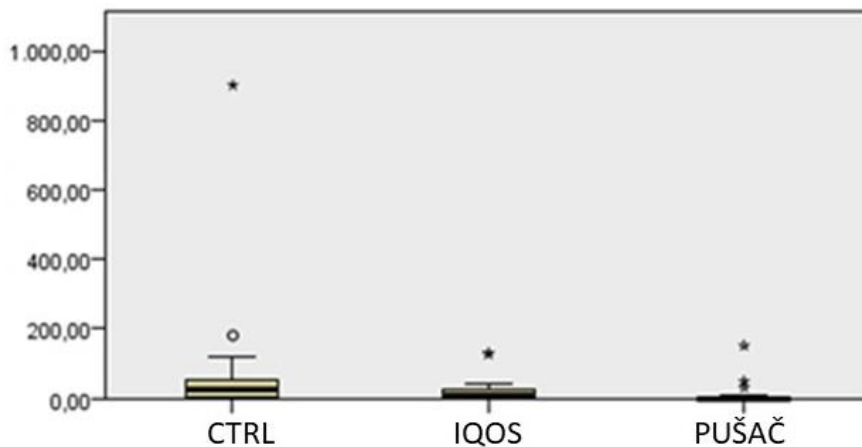
Brojnost *Actinomyces naeslundii* se statistički značajno razlikovala između skupina izloženih duhanu $p=0,037$, ali je zabilježena i značajna razlika kada su uspoređeni pušači cigareta i nepušači ($p=0,036$) (Slika 23).



Slika 23. Brojnost *A. naeslundii* u skupinama izloženih duhanu

Capnocytophaga sputigena

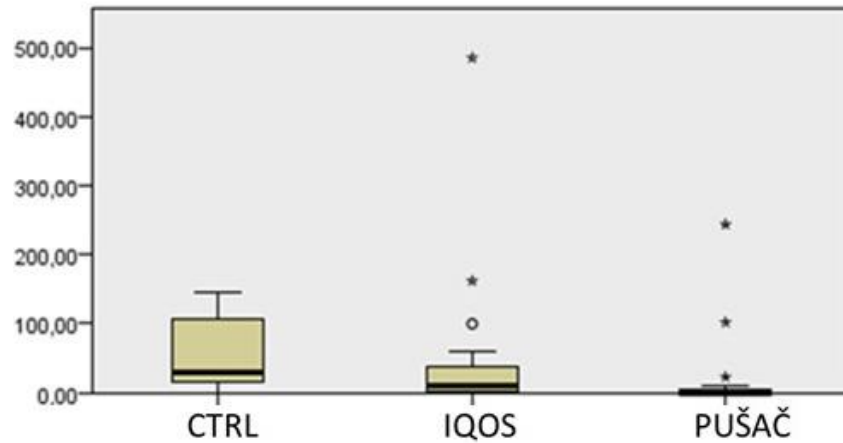
Capnocytophaga sputigena se značajno razlikovala između skupina ($p=0,008$) dok je značajnost također nađena između pušača cigareta i kontrolne skupine-nepušača ($p=0,006$) (Slika 24).



Slika 24. Brojnost *C. sputigena* u skupinama izloženih duhanu

Leptotrichia goodfellowii

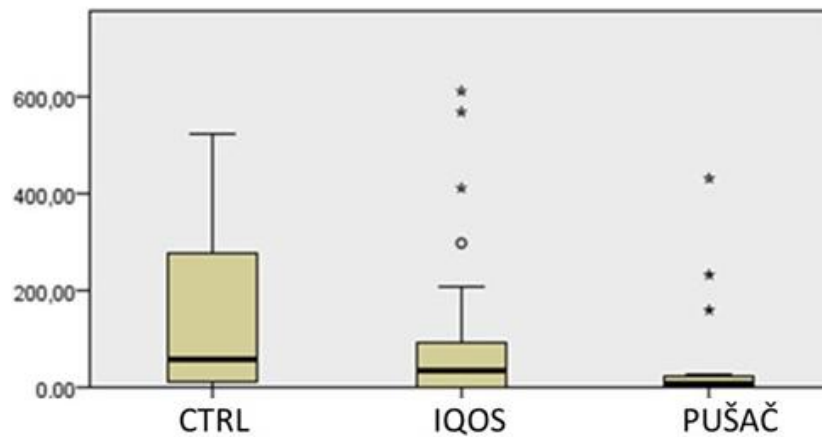
Brojnost *L. goodfellowii* je statistički značajno različita između skupina ($p=0,001$), te je značajna razlika pronađena između pušača cigareta i konzumenata IQOS-a ($p=0,040$) kao i između pušača cigareta i nepušača ($p=0,001$) (Slika 25).



Slika 25. Brojnost *L. goodfellowii* u skupinama izloženih duhanu

Neisseria elongata

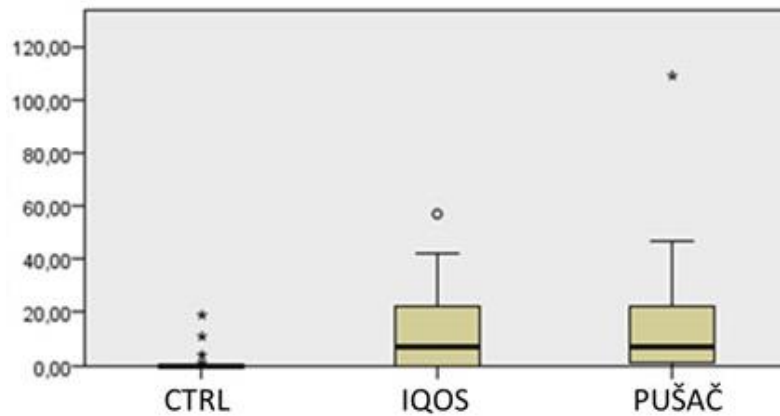
Nađena je značajna razlika kada se uspoređi brojnost ove bakterije između sve tri grupe ($p=0,019$) (Slika 26).



Slika 26. Brojnost *N. elongata* u skupinama izloženih duhanu

Pauljensenia hongkongensis

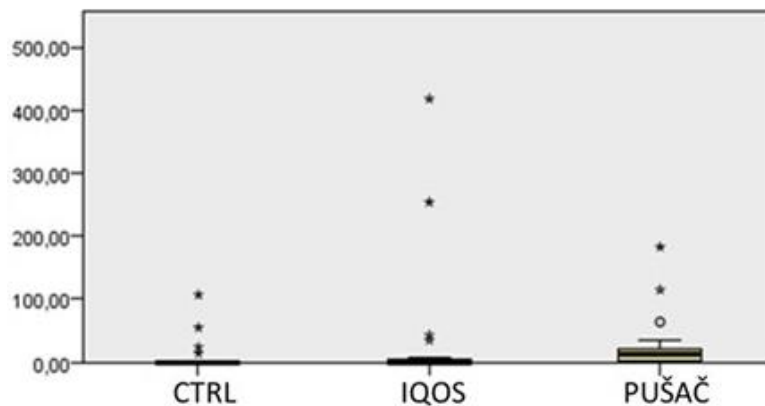
Kod *Pauljensenia hongkongensis* je znatna razlika nađena između sve tri grupe od $p=0,002$. Brojnost u nepušača se značajno razlikovala od pušača ($p=0,004$) i IQOS korisnika ($p=0,009$) (Slika 27).



Slika 27. Brojnost *P. hongkongensis* u skupinama izloženih duhanu

Prevotella salivae

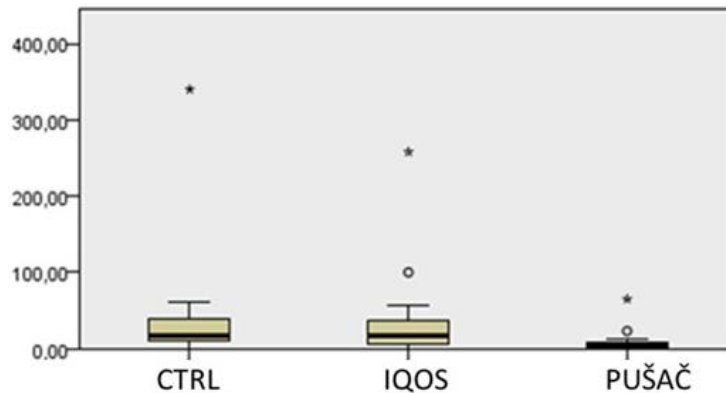
Brojnost *Prevotella salivae* je bila značajna između skupina s $p=0,036$, dok je granična vrijednost nađena kada se usporedila brojnost ove bakterije u pušača i nepušača ($p=0,052$) (Slika 28).



Slika 28. Brojnost *P. salivae* u skupinama izloženih duhanu

Pseudopropionibacterium propionicum

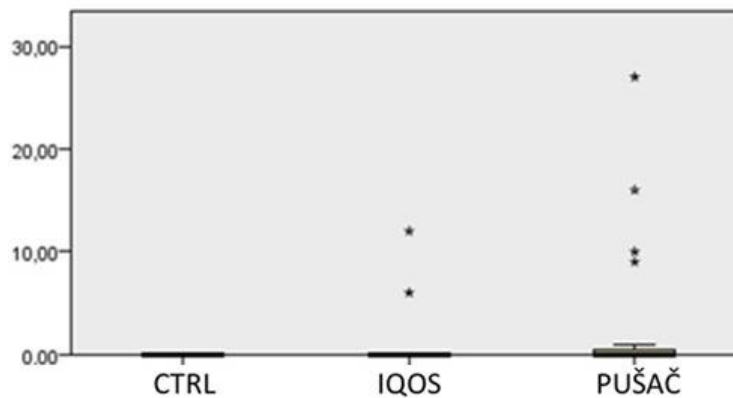
Statistički značajna razlika nađena je kada se napravila usporedba između sve tri skupine ($p=0,004$), te između pušača i IQOS korisnika ($p=0,015$) te pušača i nepušača ($p=0,008$) (Slika 29).



Slika 29. Brojnost *P. propionicum* u skupinama izloženih duhanu

Selenomonas infelix

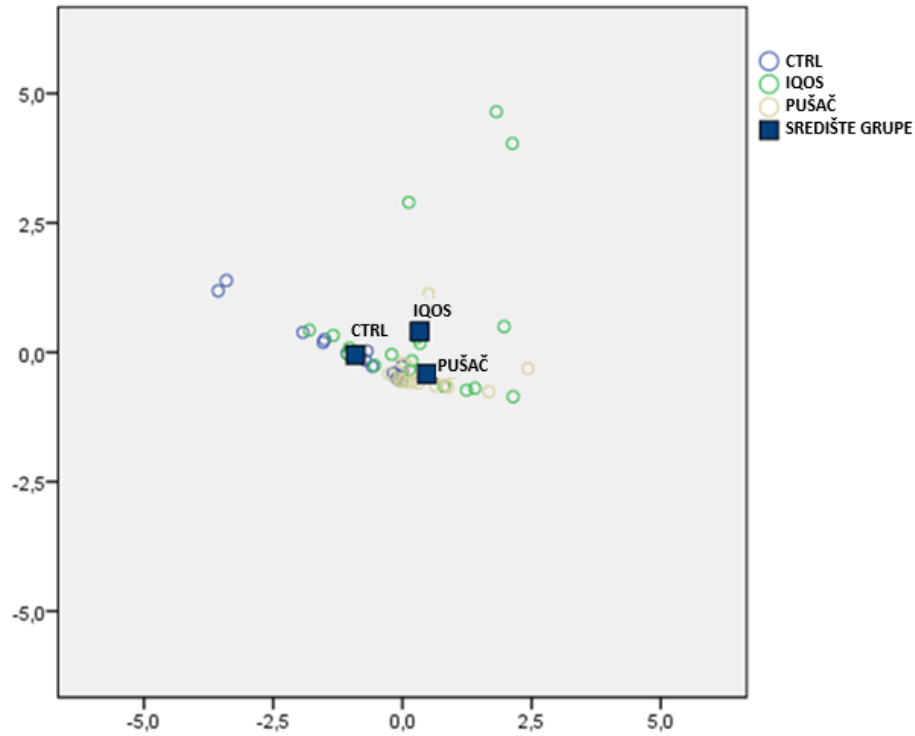
Kod *Selenomonas infelix* je nađena znatna razlika između tri grupe ($p=0.042$) te između pušača i kontrolne skupine (nepušača) $p= 0,041$ (Slika 30).



Slika 30. Brojnost *S. infelix* u skupinama izloženih duhanu

Za multivarijatnu analizu korištena je diskriminacijska analiza, u koju su unesene sve bakterijske vrste koje su u univarijatnim analizama bile značajne, kao i one koje su bile blizu granice statističke značajnosti. Diskriminacijska analiza nije detektirala značajnih kanoničkih funkcija (Tablica 11). Kada su unesene sve bakterije uz metodu postepenog izbora bakterija, detektirane su samo tri bakterije koje su značajno diskriminirale skupine, a formulirane su u dvije statistički značajne kanoničke funkcije. Ostale bakterije se nisu razlikovale između grupa. Identificirane su dvije kanoničke funkcije. Prva funkcija (x os Slika 31.) jasno razlikuje konzumente nikotina (pušače klasičnih cigareta i IQOS) od nepušača i opisuje 75,5% ($p < 0,001$) (slika 31. i Tablica 11.) Pušači klasičnih cigareta imaju povećanu brojnost *Actinomyces massiliensis* i smanjenu *Pauljensenia hongkongensis* u odnosu na nepušače (Tablica 12).

Diskriminacijska funkcija 2 (y os Slika 31.) jasno razlikuje konzumente nikotina (pušače klasičnih cigareta i IQOS) od kontrolne skupine te opisuje 24.5% varijance ($p = 0,040$) (Tablica 11). IQOS ima najveću brojnost bakterije *Prevotella shahii*, a pušači klasičnih cigareta najmanju (Tablica 12). Diskriminacijska analiza je umjereno klasificirala skupine – pripadnost originalnoj skupini zadržalo je 59,3% ispitanika (55,6% u kontrolnoj skupini, 31,8% u IQOS i 94,7% pušača cigareta) (Tablica 13).



Slika 31. Kanonička diskriminacijska funkcija

Tablica 11. Rezultati diskriminacijske analize

Funkcija	Svojtvena		Kumulativno	Kanonička	Wilkosova	p
	vrijednost	% varijance	%	korelacija	lambda	
1	0,385 ^a	75,5	75,5	0,527	0,642	<0,001
2	0,125 ^a	24,5	100,0	0,333	0,889	0,040

Tablica 12. Strukturni matiks kanoničkih diskriminacijskih funkcija

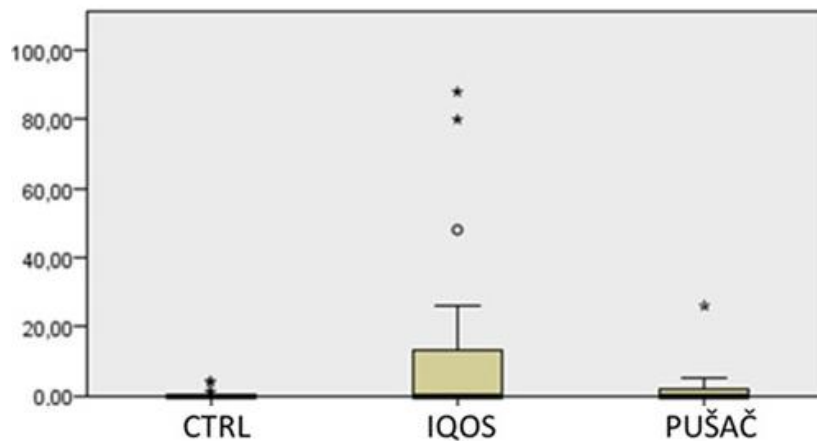
	Funkcija	
	1	2
<i>Actinomyces massiliensis</i>	-0,655*	0,397
<i>Pauljensenia hongkongensis</i>	0,531*	-0,133
<i>Prevotella shahii</i>	0,327	0,928*

Tablica 13. Rezultati klasifikacije diskriminacijskom analizom

		skupina	Predviđena pripadnost skupini			Ukupno
			CTRL	IQOS	PUŠAČ	
Originalna pripadnost	N	CTRL	10	0	8	18
		IQOS	6	7	9	22
		PUŠAČ	0	1	18	19
%		CTRL	55,6	,0	44,4	100,0
		IQOS	27,3	31,8	40,9	100,0
		PUŠAČ	,0	5,3	94,7	100,0

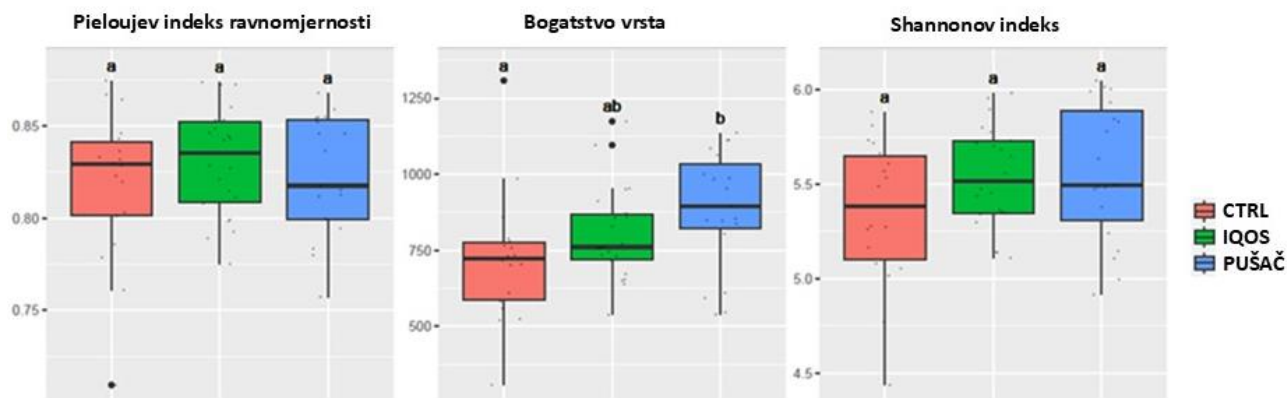
59,3% originalno grupiranih slučajeva je točno klasificirano

U univarijatnoj analizi nije značajna razlika u bakteriji *Prevotella shahii* ($p=0,087$), ali ju je detektirala diskriminacijska analiza (Slika 32).



Slika 32. Usporedba brojnosti bakterije *Prevotella shahii* između skupina formiranih po ekspoziciji nikotinu

Od tri bakterije koje su univarijatnim analizama pokazale značajnost, kada se analiziraju grupe formirane prema eksponiranosti nikotinu i prisutnosti parodontitisa, grupe se značajno razlikuju samo u brojnosti *Actinomyces massiliensis* ($p=0,035$). Pušači običnih cigareta s parodontitisom su imali znatno manju brojnost *Actinomyces massiliensis* nego nepušači bez parodontitisa ($p=0,011$) (Slika 33).

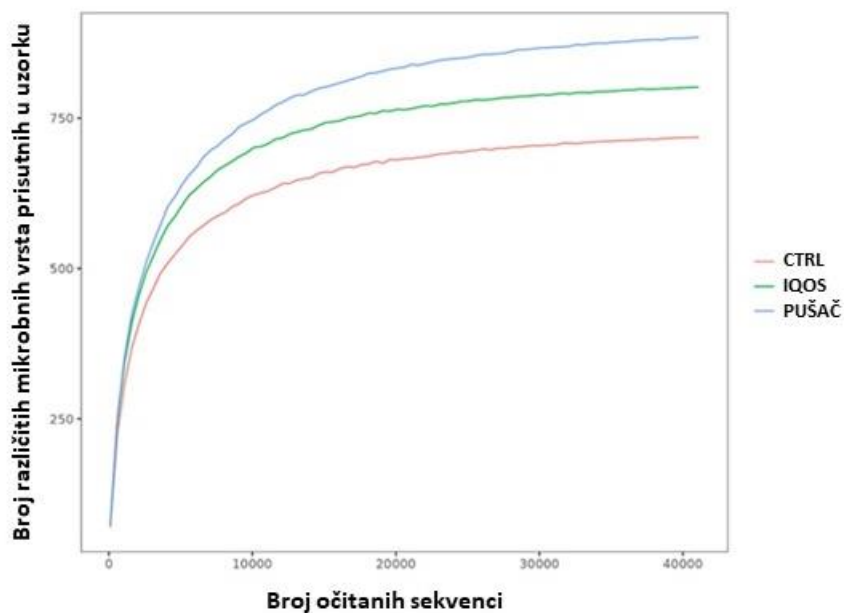


Slika 33. Analiza alfa raznolikosti (*alpha diversity*) mikrobnih zajednica u trima različitim skupinama ispitanika.

Analiza je prikazana putem tri različita indeksa: Pieloujev indeks ravnomjernosti (*Pielou evenness*), bogatstvo vrsta (*Richness*), i Shannonov indeks (*Shannon*).

Pieloujev indeks ravnomjernosti je pokazao da su jedinke među vrstama ravnomjerno raspoređene, te da nema značajnih razlika između skupina (označeno s "a" iznad svake kutije). Bogatstvo vrsta ukazuje da je u skupini pušača cigareta i IQOS-a značajno veće bogatstvo vrsta u odnosu na kontrolnu skupinu (označeno s "a" iznad kutije). Skupina IQOS korisnika pokazuje međuvrijednosti (označeno s "ab"). Rezultati Shannonov-og indeks-a pokazuju da nema značajnih razlika između skupina (označeno s "a" iznad svake kutije) (Slika 33).

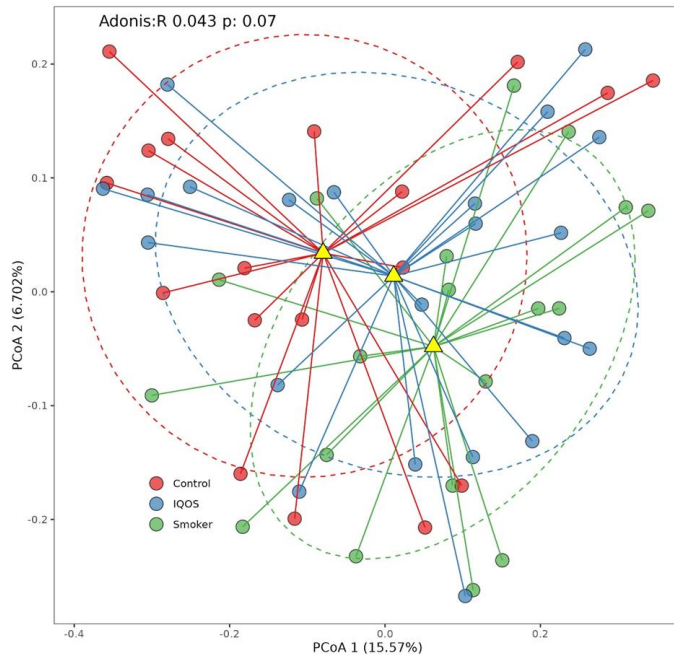
Mikrobna raznolikost prikazana na Slici 34. prikazuje najnižu raznolikost mikrobnih vrsta u kontrolnoj skupini odnosno nepušačima, u usporedbi s ostalim skupinama. IQOS korisnici imaju veću mikrobnu raznolikost nego kontrolna skupina, ali manju od pušača. Pušači cigareta imaju najveću mikrobnu raznolikost među ispitanim skupinama.



*Y- os grafa prikazuje broj različitih mikrobnih vrsta (engl. *observed species*) prisutnih u uzorku, X-os grafičkog prikaza prikazuje broj očitanih sekvenci ili dubinu sekvenciranja.

Slika 34. Prikaz analize mikrobne raznolikosti

Slika 35. prikazuje dvodimenzionalni prikaz razlika u mikrobnoj zajednici između skupina. Iako postoji određeno razdvajanje između grupa, preklapanje među elipsama sugerira da mikrobne zajednice kontrolne skupine, korisnika IQOS-a i pušača imaju sličnosti. Raspršenost točaka unutar elipsi ukazuje na varijabilnost mikrobnih profila unutar svake skupine. Adonisov test koji se koristi za procjenu razlika između grupa sugerira da razlike nisu statistički značajne.



*Svaka točka na grafikonu predstavlja mikrobni profil pojedinca, a boje točaka odgovaraju različitim skupinama ispitanika.

*PCoA 1 (15.57%) i PCoA 2 (6.70%) predstavljaju postotak ukupne varijacije u podacima

*Žuti trokuti predstavljaju centar distribucije mikrobni profila unutar svake skupine.

*Crtane elipse obuhvaćaju većinu točaka unutar svake skupine, pokazujući raspršenost podataka i preklapanje između različitih skupina.

Slika 35. Analiza glavnih koordinata u mikrobnoj zajednici između različitih skupina ispitanika

5 RASPRAVA

Parodontitis je kompleksna bolest, gdje je osim prijemčivog domaćina i mikrobiološkog izazova potrebno zadovoljiti niz drugih faktora da bi se bolest klinički očitovala. Genetska i epigenetska pozadina, pušenje i neke sustavne bolesti mogu pridonijeti većem riziku i većoj pojavnosti parodontitisa u takvih osoba [188]. Pušenje ima izravnu poveznicu s razvojem parodontitisa u takve skupine ljudi koja, ovisno o definiciji same bolesti i duljini pušenja, može biti 6 do 20 puta veća u odnosu na nepušače [89].

Parodontni indeksi, kao objektivno mjerilo zdravstvenog stanja parodonta, odstupaju u vrijednostima dok su razine i raznolikost parodontnih patogenih bakterijskih vrsta u disbiozi zbog izravnog utjecaja dima cigarete. Sekvenciranje 16S ribosomske RNA je metoda koja omogućuje detaljnu analizu subgingivnog mikrobioma, a čiji rezultat su precizni, iscrpni i opširni podaci nađenih bakterijskih rodova i vrsta u datom uzorku.

S obzirom na porast javne svijesti o štetnim učincima cigareta, duhanske kompanije posljednjih desetljeća razvijaju alternativne proizvode kako bi zadržale i zadovoljile nikotinske potrebe potrošača, ali i privukle nove generacije konzumenata. Danas nikotinski ovisnici imaju na raspolaganju čitavu lepezu proizvoda koji su koncipirani prema takvim načelima. Uređaji za zagrijavanje duhana, poput IQOS-a, su proizvodi gdje duhan ne gori već se zagrijava te je pritom emisija štetnih sastojaka reducirana.

Međutim, istraživanja - koja su još uvijek malobrojna - ukazuju da štetan potencijal, ali i učinak i dalje postoje, te se zaključci nameću sami od sebe a to je da je duhan u bilo kakvom obliku štetan i ima štetne posljedice po ljudsko, a posebice oralno zdravlje.

Ovo istraživanje inicijalno je obuhvatilo 66 ispitanika podijeljenih u tri skupine ispitanika (svaka N=22): I) ispitanici koji puše obične cigarete, II) korisnici uređaja za zagrijavanje duhana (THS) i III) nepušači.

Određivanje parodontnih indeksa i ispunjavanje parodontološkog upitnika te analiza dobivenih podataka je učinjena za svih 66 ispitanika. Sekvenciranje 16S rRNA i analiza dobivenih podataka

je provedena za 60 ispitanika zbog povlačenja pristanka za sekvenciranje, te neuspješnosti nekih od etapa sekvenciranja.

Ispitanici su bili upareni prema spolu i dobi, pri čemu je medijan dobi bio 38 godina te je prevladavao ženski spol. Dnevna konzumacija cigareta i duhanskih umetaka bila je slična u skupini konzumenata IQOS-a i pušača klasičnih cigareta, dok su pušači cigareta imali dulje iskustvo pušenja od korisnika IQOS-a.

Ovo istraživanje je pokazalo da veći utjecaj na pojavu kliničkih znakova parodontitisa u ispitanika ima dnevna konzumacija cigareta i duhanskih umetaka, nego duljina pušenja odnosno pušačkog staža. Također, prema ovom istraživanju pušenje je povezano s 4,7 puta većim izgledom od obolijevanja od parodontitisa. Međutim, kada su se uparile sve tri skupine prema izloženosti duhanu, najveće izgleda za obolijevanje od parodontitisa imaju pušači običnih cigareta dok konzumenti IQOS-a imaju – pomalo paradoksalno - najmanji rizik.

Pušači cigareta imali su više vrijednosti izmjerenih parodontnih indeksa, dok je statistička značajnost zabilježena samo za dva indeksa koji su upućuju na aktivnost bolesti - dubinu parodontnog džepa i gubitak kliničkog pričvrstka. Ovakvi rezultati jesu u suglasju s brojnim, dosad provedenim istraživanjima na pušačima običnih cigareta [189-191].

Vrijednost recesije gingive bila je najniža kod pušača IQOS-a, dok razlike između pušača cigareta i nepušača praktički nema, odnosno zanemariva je. Za ovakve rezultate možemo samo nagađati o eventualnim uzročnicima, ali i zaključiti da se povlačenje gingive ne može pripisati isključivo pušenju, već treba uzeti u obzir i druge čimbenike poput tehnike četkanja zuba, ortodontskih čimbenika, okluzalne traume i dr. Ovaj nalaz je u skladu s dostupnim podacima, odnosno činjenicom da se ne može izričito tvrditi da dim cigarete ima utjecaj na recesiju gingive [189].

Izmjereni indeks koji ukazuje na prisutstvo plaka (FMPS) pokazuje da su vrijednosti najviše u pušača cigareta dok je kod korisnika IQOS-a i nepušača taj pokazatelj stupnja oralne higijene gotovo identičan. Studije drugih autora su dokazale nešto više razine plaka u ustima pušača u odnosu na nepušače, tako da je nalaz ovog istraživanja u skladu s većinom već objavljenih studija [190,192-194]. Veća akumulacija plaka u pušača cigareta se pripisuje uglavnom lošijoj oralnoj higijeni, odnosno izostanku motivacije za boljim održavanjem [189]. Međutim, temeljem upitnika kojeg su ispitanici ovog istraživanja ispunjavali, nisu nađene značajne razlike u vidu učestalosti

održavanja oralne higijene kao niti u sredstvima koje se pritom koriste između sve tri skupine formirane prema ekspoziciji duhanu (manualne četkice, sredstva za interdentalnu higijenu,..). Stoga, nalaz povećanog FMPS možemo hipotetski pripisati redovitoj, ali neadekvatnoj, odnosno nedovoljno učinkovitoj, oralnoj higijeni u skupini pušača cigareta.

Iznenadjuće rezultate pokazale su vrijednosti za FMBS. Ovo istraživanje pokazalo je da je krvarenje gingive najizraženije kod pušača cigareta, a najmanje kod pušača IQOS-a, unatoč uparenosti ispitanika prema stažu pušenja. Te razlike mogu se objasniti nekim čimbenicima koji se odnose na pacijenta, poput nepridržavanja datih uputa za održavanje oralne higijene (što je vidljivo i iz viših vrijednosti FMPS) i posljedičnoj upali gingive. Istraživanja uglavnom ukazuju na smanjenje krvarenja gingive u pušača cigareta zbog promjena u broju krvnih žila, smanjenoj angiogenezi i vazokonstrukciji [3,193,195]. Međutim, neka istraživanja imaju potpuno oprečne rezultate po pitanju krvarenja i vidljive upale tkiva. Primjerice, Müller i sur. navode značajno veći indeks krvarenja pri sondiranju (BoP) ali i indeksa plaka (PI) u pušača što objašnjavaju prevladavanjem utjecaja plaka naspram utjecaja pušenja na gingivu [196]. Ovakav zaključak mogao bi objasniti i nalaz ovog istraživanja.

Mnogobrojne studije su istraživale problematiku disbiotičkog subgingivnog biofilma i parodontne bolesti. Velika većina njih potvrđuje negativan utjecaj duhanskog dima na subgingivni mikrobiom koji je evidentan kroz veću prevalenciju i veću brojnost parodontopatogenih bakterija, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja [139,185,197]. Međutim, postoje i suprotni zaključci provedenih istraživanja gdje se nisu našle razlike u prevalenciji nađenih parodontopatogenih bakterija u pušača i nepušača [198].

Istraživanja utjecaja aerosola uređaja za zagrijavanje duhana na oralni mikrobiom odnosno subgingivni mikrobiom su skromna, postoji svega nekolicina istraživanja i ne bave se striktno parodontnim patogenima. Istraživanje Tishchenko ukazuje na redukciju rezidentnih bakterija dentalnog plaka u adolescenata korisnika uređaja za zagrijavanje duhana [141].

Istraživanje mikrobioma ove studije usredotočilo se na devet glavnih parodontnih patogenih bakterija te je usporedio učinak dima cigarete i aerosola THS-a na sastav subgingivnog biofilma. Sekvenciranje 16S rRNA potvrdilo je da izloženost duhanu, bez obzira na to da li on gori (kao u običnim, konvencionalnim cigaretama) ili se grije (kao u THS proizvodima), ima skroman učinak

na sastav subgingivnog dentalnog biofilma. Naime, rezultati staju u korist parodontitisa i njegovog izraženijeg učinka na brojnost i raznolikost subgingivno smještenih bakterija u odnosu na efekt koji ima izloženost duhanu. Nedvojbeno je da parodontitis i pušenje djeluju sinergistički u pogledu disbioze i pogoršanja same bolesti.

Ovo istraživanje pokazalo je da subgingivni dentalni plak kod pušača običnih cigareta ima najveću prevalenciju *T. forsythia* i *T. denticola*, dok je *P. micra* najrjeđi nalaz. Istraživanja drugih autora u subgingivnom plaku pušača su uglavnom najčešće nalazila *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythiu*, *F. nucleatum* i dr. [139,140,199].

Kako je ova studija pokazala- subgingivni plak korisnika IQOS-a obiluje *P. intermedia* i *E. nodatum* kao najčešćim bakterijama, a zatim slijede *C. rectus* i *P. gingivalis*, dok su *A. actinomycetemcomitans* i *T. denticola* najmanje prisutni parodontopatogeni. Ovi rezultati ostaju jedinstveni jer trenutno nema relevantne literature koja bi omogućila usporedbu rezultata s ranijim istraživanjima.

Najčešći parodontopatogeni nađeni u nepušača ove studije bili su *P. micra* i *A. actinomycetemcomitans*, dok su *P. intermedia*, *T. forsythia* i *E. nodatum* rijetko pronađeni u ovoj skupini.

E. nodatum je bakterija koja pripada narančastom kompleksu parodontopatogena i prema literaturi nalazi se u teškim i uznapređovalim stadijima parodontitisa te je češća u pušača nego u nepušača [10]. *E. nodatum* je u ovom istraživanju bila brojnija u korisnika IQOS-a s parodontitisom u usporedbi s običnim pušačima, dok je njena prevalencija bila češća u skupini oboljelih od parodontitisa. Aerosol IQOS-a u kombinaciji s parodontitisom više utječe na brojnost i prevalenciju ove bakterije nego dim cigarete. Ovaj neočekivani rezultat sugerira da su korisnici IQOS-a izloženi nešto višem riziku od razvoja težih oblika parodontitisa.

Vrijednosti prevalencije i brojnosti *T. denticola* su bile približno jednake u svim skupinama (tj. pušačima i nepušačima, s ili bez parodontitisa) pa je stoga ne možemo striktno povezati ni s jednom skupinom. Međutim, njezina je prevalencija bila najveća u pušača s parodontitisom.

Najveća prevalencija parodontnih patogena *P. gingivalis*, *P. intermedia* i *E. nodatum* nađena je u ispitanika s parodontitisom. *P. gingivalis* i *P. intermedia* specifičniji su za pušače koji boluju od

parodontitisa, neovisno o tome da li duhan gori ili je zagrijavan. Dostupna istraživanja potvrđuju pozitivnu korelaciju između bakterija crvenog kompleksa i težine parodontne bolesti. Prisutnost ovih bakterija u parodontnim džepovima klinički je pokazala veću destrukciju parodontnih tkiva kod težih oblika parodontne bolesti u usporedbi s umjerenim ili blagim oblicima [200-204].

Iznenadujući rezultat zamijećen u ovom istraživanju je najveća zastupljenost *A. actinomyces* u skupini nepušača bez parodontitisa, budući da ovaj podatak nije podržan velikom većinom objavljenih studija usmjerenih na njegovu prevalenciju [3]. *A. actinomyces* prema dostupnim studijama ima jasnu i nedvojbenu vezu s destruktivnim oblicima parodontne bolesti [119,205]. Dodatno, *A. actinomyces* bio je najdeficitarniji u korisnika IQOS-a, bez obzira na to jesu li ispitanici imali parodontitis. Ovi se podaci se mogu eventualno hipotetski objasniti pretpostavkom da aerosol IQOS-a ima neku vrstu inhibitornog učinka na rast i razmnožavanje *A. actinomyces*; međutim, buduća istraživanja većih razmjera na većem broju ispitanika mogu pružiti točnije uvide u točnost ovog nalaza.

Osim devet parodontnih patogena, koristeći sekvenciranje slijedeće generacije i analizom 16S rRNA bakterijskog genoma, otkriveno je i analizirano još 236 bakterijskih vrsta. U pušača klasičnih cigareta zabilježeno je veće bogatstvo i veća raznolikost bakterija i bakterijskih vrsta dok je u nepušača ona najsiromašnija i najmanje raznolika.

Devet bakterijskih vrsta istaklo se prema brojnosti samo između tri skupine formirane prema izloženosti duhanu - pušačima, nepušačima i konzumentima IQOS-a: *Actinomyces dentalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces massiliensis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia goodfellowii*, *Neisseria elongata*, *Pauljensenia hongkongensis*, *Pseudopropionibacterium propionicum*, *Prevotella salivae* i *Selenomonas infelix*.

Actinomyces dentalis i *Actinomyces naeslundii* su najbrojnije vrste nađene u pušača cigareta, dok su *Actinomyces massiliensis*, *Actinomyces naeslundii*, *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia goodfellowii*, *Neisseria elongata* najbrojnije vrste u nepušača. Konzumenti IQOS-a su imali značajne razlike u brojnosti *Pauljensenia hongkongensis* i *Pseudopropionibacterium propionicum* u usporedbi s druge dvije skupine formirane prema ekspozicija duhana.

Rod *Actinomyces* podrazumijeva anaerobne bakterije koje su nađene u usnoj šupljini već 2 mjeseca od rođenja, da bi se od navršene prve godine raznolikost roda značajno proširila. Važni su

kolonizatori supragingivnog i subgingivnog dentalnog plaka, te su neke vrste poput *A.odontolyticus*, *A.dentalis* i *A.massiliensis* češće nađene u osoba oboljelih od parodontitisa [206]. Postoje i oprečni zaključci provedenih istraživanja gdje je brojnost roda *Actinomyces* u parodontnim džepovima niska, a ukupna biomasa približno jednaka u zdravih i u onih oboljelih od parodontitisa [207]. Važno je primjetiti da je jedino *A.dentalis* bila brojnija u običnih pušača ovog istraživanja u odnosu na ostale dvije skupine

Actinomyces naeslundii je jedan od ranih kolonizatora dentalnog plaka, pripadnik je plavog kompleksa prema Socranskom i predstavlja takozvani 'most' za adherenciju ostalih (patogenih) vrsta i daljnju kolonizaciju dentalnog plaka [208]. U ovom istraživanju, nađen je u povećanim razinama i u pušača i nepušača. Izmjereni FMPS je bio približno jednak između pušača i nepušača, iako su prema ispunjenoj anketi, i pušači i nepušači, uglavnom prali zube manualnom četkicom 2 puta dnevno. Održavanje interdentalne higijene je bilo nešto lošije – 2/3 nepušača i nešto malo više od 1/3 pušača je koristilo sredstva za interdentalnu higijenu. Obzirom da je upravo interdentalno područje područje rizika za početak parodontitisa i stvaranje parodontnih džepova, možda su upravo povišene razine ovih bakterija u interdentalnim područjima pogodovale očitovanju parodontitisa u pušača i nepušača ovog istraživanja.

Capnocytophage su uglavnom implicirane u patogenezu parodontne bolesti kao rani kolonizatori dentalnog plaka i pripadnici su zelenog kompleksa prema Socranskom [6]. *C. sputigena* je izolirana i u oboljelih od parodontitisa kao i u parodontno zdravih osoba i djece, te se ne može direktno povezati samo s patogeneзом parodontitisa [209]. Njena veća prevalencija i brojnost u nepušača ovog istraživanja nije u suglasju s dostupnim podacima jer se ova bakterija uglavnom povezuje s pušačima, a objašnjava modificirajućim učinkom pušenja na subgingivni mikrobiološki sastav [139,210,211].

Leptotrichia goodfellowii je oportunistička bakterija koja može izazvati ozbiljne i životno ugrožavajuće infekcije poput bakterijemije i endokarditisa u imunokompromitiranih osoba [212,213]. Pušači predstavljaju jednu od imunokompromitiranih skupina, stoga se može pretpostaviti da će ova bakterija biti brojnija u pušača, a ne u nepušača što je u suglasju s rezultatima ovog istraživanja. Osim imunokompromitiranosti, samo pušenje utječe na sastav oralnog mikrobioma te može utjecati i na prekomjeren rast oportunističkih bakterija poput ove [212-214]. Prema ovom istraživanju *L. goodfellowii* je značajno brojnija bakterija u subgingivnom

mikrobiomu nepušača u odnosu na pušače cigareta i korisnike uređaja za zagrijavanje duhana što nije u suglasju s dostupnim studijama.

Rod *Neisseria* je jedna od tri najčešće bakterije u slini usne šupljine, uz rodove *Streptococcus* i *Veillonella*. Promjene u brojnosti ovih bakterija usko su povezane s oralnim zdravljem [215]. Vrste koje pripadaju ovom rodu su aerobne do fakultativno anaerobne. Rod obuhvaća nepatogene i uvjetno patogene vrste koje obično nastanjuju sluznicu gornjih dišnih puteva i usne šupljine [216,217]. Prema dostupnim studijama rod bakterija *Neisseria* ne može se povezati striktno niti za zdravljem niti s bolešću. Naime, rod *Neisseria* zauzima tek 1% od cjelokupnog subgingivnog mikrobioma u pacijenata s umjerenim i uznapredovalim parodontitisom [217]. Vrsta *Neisseria elongata* je u ovom istraživanju, u nešto većoj brojnosti, nađena u subgingivnom biofilmu nepušača dok u ispitanika s parodontitisom nije zabilježena u statistički značajnijoj mjeri, što je u suglasju s istraživanjem Moona-a i sur. gdje je također zabilježena povećana brojnost *Neisserie elongate* u subgingivnom mikrobiomu nepušača. U istraživanju Bizzara i sur. nije nađena razlika u brojnosti ovog roda u pušača i nepušača [217].

Prevotella salivae anerobna je bakterija prisutna u subgingivnom biofilmu te u ovom istraživanju je njena brojnost granična između skupine pušača i nepušača. Za *Prevotellu salivae* nema dostupnih podataka o njenoj vezi s pušačima ili u patogenezi parodontne bolesti. Rod *Prevotella* ima svojeg predstavnika vrste *-Prevotellu intermediu* koji ima nedvojbenu ulogu u patogenezi parodontitisa kao pripadnik narančastog kompleksa prema Socranskom [6]. Međutim, hipotetski možemo pretpostaviti da prisutstvo *P. salivae* u subgingivnoj mikrobnj zajednici može pridonijeti ukupnoj patogenosti biofilma interakcijom s drugim bakterijama i pojačavanjem upalnog odgovora.

Pseudopropionibacterium propionicum je anaerobna bakterija koja se među ostalima također može naći u ljudskim ustima [218]. Osobito je rizičan za imunokompromitirane osobe jer, uslijed neodgovarajuće opskrbe tkiva krvlju, može prodrijeti u tkiva i uzrokovati infekcije [219]. Kako je već navedeno, ova bakterija je češća u imunokompromitiranih osoba, međutim analiza mikrobioma ovog istraživanja je ukazala na veću brojnost u IQOS korisnika koji se svrstavaju u pušače pa samim time i u imunokompromitiranu skupinu. Njena brojnost je povećana i u nepušača, dok je u pušača ona najrjeđa i najmanje brojna bakterija, gdje se prijašnji navod vezan za pušače i imunokompromitiranu skupinu dovodi u pitanje.

Iako gore navedene bakterije nemaju direktnu i optužujuću vezu s pušačima i parodontitisom, možemo zaključiti da nađene vrste *Actinomyces*, *Capnocytophage*, i *Neisserie* djeluju kao rani kolonizatori, prenosnici, koji potpomažu adherenciju i razmnožavanje bakterija crvenog i narančastog kompleksa, čime utječu na pojavu simptoma parodontitisa. Međutim, proturječno je da su ovi rani kolonizatori nađeni u nešto većem broju u nepušača, skupine koja u ovom istraživanju ima najmanju incidenciju parodontitisa u odnosu na druge dvije skupine.

Za neke bakterije ne može se naći direktna povezanost s pušenjem i parodontitisom, poput *Pauljensenia hongkongensis* gdje njena uloga u subgingivnom mikrobiomu korisnika IQOS-a tek treba biti istražena, obzirom da do sada nije zabilježena njena pojava u pušača kao niti u oboljelih od parodontitisa. Važan je podatak da je bakterija anerob, kao i *Pseudopropionibacterium propionicum*, a obje su brojnije u korisnika IQOS-a. Povećana prevalencija i brojnost anaerobnih vrsta u pušača objašnjava se utjecajem pušenja na dostupnost kisika u usnoj šupljini te na smanjenje oksido-redukcijskog potencijala što stvara pogodno okruženje za rast i razmnožavanje ovih vrsta [220].

Za *Selenomonas infelix* također nema dostupnih istraživanja koja bi je mogla povezati s pušačima osim u vidu imunokompromitiranosti [221]. U ovom istraživanju brojnija je u pušača nego u nepušača. Činjenica je da je rod *Selenomonas* nađen u dentalnom plaku i da su neke vrste *Selenomonasa* (*S. noxia*) nađene u plitkim džepovima oboljelih od parodontitisa. Osim toga, *S. noxia* je povezana s pojavom bolesti u prethodno zdravih osoba, tako da patogeni potencijal roda svakako postoji te bi trebao biti dublje istražen [119].

Mason je u svojoj studiji jasno utvrdio da je mikrobiom pušača vrlo raznolik, anaeroban i bogat patogenima, a pritom siromašan komezalima, što je svakako u suglasju i s ovim istraživanjem. Također, takav mikrobiom stvara pogodno okruženje za razvoj bolesti u zdravih osoba i predstavlja visoki rizik za buduću 'ekološku katastrofu' usne šupljine [222].

Parodontitis se ne može manifestirati bez svoje primarne i osnovne komponente – mikroorganizama odn. bakterijskog biofilma. Mikroorganizmi su nezamjenjiva sastavnica bez koje upalna bolest niti ne može nastati.

Mikrobiom usne šupljine je dinamičan orkestar koji se sastoji od malih, međusobno povezanih frakcija. Ove polimikrobne frakcije trebaju međusobno komunicirati i surađivati kako bi se oduprle

imunološkom sustavu domaćina, odredile i stvorile okolinu povoljnu za rast i izazvale destrukciju parodontnih tkiva putem upalne i imunosne reakcije [115,197,201,223]. Disbioza, upalni odgovori domaćina i okolišni čimbenici poput pušenja i genetike etiološki su čimbenici koji su uključeni i nužni za parodontitis [221,224]. Pušenje mijenja oralni mikrobiom smanjujući raznolikost mikroorganizama, a pritom povećava broj patogenih bakterija povezanih s parodontitisom što dovodi do disbioze. Imunološki sustav domaćina je kompromitiran, čime je omogućen brži rast patogenih bakterija, koje su ključne za razvoj parodontitisa [98].

Međutim, prisutstvo parodontopatogene bakterije u gingivnim sulkusima ili parodontnim džepovima ne uvjetuje nužno i pojavu znakova i simptoma bolesti [119,201]. Ova informacija može dati hipotetsko objašnjenje nalaza ovog istraživanja koje se odnose na *A. actinomyces*, koja je najbrojnija u nepušača bez parodontitisa. *A. actinomyces* možebitno treba neku ili neke druge specifične bakterije, komponentu/e, okolišnog/e čimbenik/e, genetsku osjetljivost ili pak neki drugi dio slagalice koji bi pomaknuli njegov patogeni potencijal u evidentan i destruktivan. Nadalje, jedino su klonovi *A. actinomyces* serotipa B i JP2 zabilježeni kao patogeni, te je moguće je da ovih podskupina u ispitanika ovog istraživanja nije bilo. Međutim kako sekvenciranje bakterijskog genoma 16S rRNA nije dalo uvid u serotip *A. actinomyces*, možemo samo spekulirati o ovom nalazu.

Duhanski proizvodi svih vrsta su štetni, neki više od drugih, a ovo je istraživanje potvrdilo štetan učinak uređaja za zagrijavanje duhana kako na parodontne indekse tako i na subgingivni mikrobiom, iako u manjoj mjeri od izgorjelog duhana iz konvencionalnih cigareta. Konzumenti IQOS-a u ovoj studiji imali su manje ukupnog pušačkog staža u usporedbi s pušačima cigareta, što je vjerojatno pridonijelo nešto boljem parodontnom statusu. Mora se uzeti u obzir činjenica da je predstavljanje IQOS-a u Hrvatskoj bilo tek u prosincu 2017. godine [225].

Aerosol grijanog duhana IQOS-a ima utjecaj na brojnost i prevalenciju *P. gingivalis*, *F. nucleatum* i *P. intermedia*, tri najvažnija parodontna patogena, stoga ga ne možemo smatrati u potpunosti sigurnim i bezopasnim..

Parodontitis, s druge strane, izravno utječe na sastav subgingivnog mikrobioma jer stvara okruženje koje mijenja pH i dostupnost hranjivih tvari u parodontnim džepovima, što pogoduje patogenim bakterijama dominaciju nad komenzalima, što dodatno pogoršava postojeće stanje.

Pušenje i parodontitis imaju značajan utjecaj na subgingivni mikrobiom, međutim ovo istraživanje je pokazalo da je ipak parodontitis nadmoćniji te da ima veći utjecaj u odnosu na ekspanziju duhanu. Istraživanja koja se bavila ovom tematikom isto su zabilježila ovakve trendove [198]. Također, istraživanja Haffaje-a su zaključila da je razlika u mikrobiomu pušača, s različitim poviješću pušenja, bila prvenstveno u brojnosti pojedinih vrsta, a ne u brojnosti bakterija [191].

Ovo istraživanje je prvo takve vrste koje je koristilo 16S rRNA NGS analizu za određivanje točnog sastava parodontopatogenih polimikrobnih zajednica u subgingivalnom zubnom plaku kod korisnika IQOS-a, klasičnih pušača i nepušača s ili bez parodontitisa.

Na temelju rezultata ovog istraživanja, teško je bez sumnje tvrditi da je grijani duhan manje štetan. Danas se proizvodi sustava za zagrijavanje duhana kao što je IQOS promoviraju kao proizvodi koji uzrokuju manju štetu po zdravlje, a u nekim se zemljama prodaju bez grafičkih oznaka upozorenja [226]. Oni su nove, moderne i primamljive alternative duhanu i primjetno je da su osobito popularne među tinejdžerima, mladim odraslima te onima koji nikada prije nisu pušili. Učinak THS proizvoda na zdravlje ne ovisi samo o tome jesu li manje štetni od tradicionalnih cigareta, već o tome potiču li povećanje ili smanjenje prevalencije pušenja. Nalazi iz odabranih studija sugeriraju da duhanski proizvodi koji zagrijavaju i ne izgaraju mogu stvoriti novu populaciju ovisnu o nikotinu [227].

Dosadašnja istraživanja – unatoč agresivnim reklamama proizvođača - nisu dostatna za davanje konkretnih zaključaka o utjecaju aerosola uređaja za zagrijavanje duhana. Istraživanja temeljena na analizi uzročno-posljedičnih veza na korisnicima uređaja za zagrijavanje duhana su još uvijek oskudna i manjkava. Nužna su daljnja longitudinalna i intervencijska istraživanja usmjerena na nekiruršku i kiruršku parodontnu terapiju u konzumentima THS-a kao i na pojavnost pojedinih bolesti ne samo usne šupljine nego i sistemskih tijekom godina njihovog konzumiranja. 16S rRNA sekvenciranje subgingivnog dentalnog plaka u pravilnim razmacima kroz godinu dana, u cilju praćenja smanjenja, stagnacije ili rasta parodontnih patogena bi bio jedan od faktora koji bi zasigurno razjasnio učinke različitih vrsta duhanskih proizvoda na subgingivni mikrobiom.

6 ZAKLJUČCI

1. Vrijednost dubine sondiranja parodontnog džepa (PPD) je manja u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače klasičnih cigareta, ali veća od vrijednosti izmjerenih u nepušača.
2. Opseg krvarenja u ustima (FMBS) je veća u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače cigareta, i veća ili jednaka nepušačima
3. Opseg nakupljanja plaka (FMPS) i gingivitisa bio je najveći kod pušača cigareta, a najmanji kod korisnika IQOS-a.
4. Vrijednost recesija gingive (GR) je najmanja u korisnika IQOS-a u odnosu na pušače klasičnih cigareta.
5. Skupine se nisu značajno razlikovale u pogledu pokretljivosti zuba (TM), no najveću prevalenciju pokretljivosti imali su pušači klasičnih cigareta, dok su nepušači i pušači IQOS-a imali istu prevalenciju
6. Furkacijskih defekata ima zanemarivo malo u sve tri skupine ispitanika formirane prema izloženosti duhanu.
7. Gubitak kliničkog pričvrstka (CAL) je najveći u pušača cigareta a najmanji u nepušača.
8. Subgingivno bakterijsko opterećenje parodontopatogenim bakterijskim vrstama je najveće u pušača bezdimnih cigareta u odnosu na pušače klasičnih cigareta i nepušače. Brojnost parodontopatogenih vrsta je jednaka u korisnika IQOS-a s parodontitisom i pušača običnih cigareta s parodontitisom.
9. Subgingivni plak pušača običnih cigareta ima najveću prevalenciju *T. forsythia* i *T. denticola*
10. Subgingivni plak korisnika IQOS-a obiluje *P. intermedia* i *E. nodatum* kao najčešćim bakterijama.
11. Najčešći parodontopatogeni nađeni u nepušača bili su *P. micra* i *A. actinomycetemcomitans*, dok su *P. intermedia*, *T. forsythia* i *E. nodatum* rijetko pronađeni u ovoj skupini.
12. Najveća prevalencija parodontnih patogena *P. gingivalis*, *P. intermedia* i *E. nodatum* nađena je u ispitanika s parodontitisom
13. *A. actinomycetemcomitans* je najbrojniji u skupini nepušača bez parodontitisa.

14. U subgingivnom plaku pušača običnih cigareta koji boluju od parodontitisa uvijek su bili prisutni *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsytha* i *F. nucleatum*.
15. Kod korisnika IQOS-a s parodontitisom *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. nodatum* i *F. nucleatum* su najčešći nalaz, dok su u skupini nepušača s parodontitisom to bili *T. forsythia*, *E. nodatum* i *F. nucleatum*.

7 LITERATURA

1. 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.
2. Chaffee BW, Couch ET, Vora M V., Holliday RS. Oral and periodontal implications of tobacco and nicotine products. *Periodontol 2000.* 2021;87:241–53.
3. Palmer RA SMLP. Modificirajući faktori. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, ur., *Klinička parodontologija i dentalna implantologija.* 5th ed. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010. p. 312–22.
4. Başaran R, Güven NM, Eke BC. An Overview of IQOS® as a New Heat-Not-Burn Tobacco Product and Its Potential Effects on Human Health and the Environment. *Turk J Pharm Sci.* 2019;16:371–4.
5. Jiang Y, Zhou X, Cheng L, Li M. The Impact of Smoking on Subgingival Microflora: From Periodontal Health to Disease. *Front Microbiol.* 2020;11.
6. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134–44.
7. Perez-Warnisher MT, de Miguel M del PC, Seijo LM. Tobacco Use Worldwide: Legislative Efforts to Curb Consumption. *Ann Glob Health.* 2019;85.
8. World Health Organization. Tobacco. Geneva, Switzerland. 2024 [citirano 2024 7 28]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
9. Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, Menafra D, Pozza C, Pivonello R, et al. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2018;16:3.
10. P Saha S, K Bhalla D, F Whyne T, Gairola C. Cigarette smoke and adverse health effects: An overview of research trends and future needs. *International Journal of Angiology.* 2007;16:77–83.
11. Thomson NC, Polosa R, Sin DD. Cigarette Smoking and Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022;10:2783–97.

12. World Health Organization. World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals [Internet]. Geneva, Switzerland. 2024 [citirano 2024 8 1]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565707>
13. Knežić M, Hudorović N. The incidence of smoking in the student population. *Sestrinski glasnik/Nursing Journal*. 2014;19:12–6.
14. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Europska zdravstvena anketa (EHIS) – rezultati istraživanja. Zagreb, Hrvatska. 2024 [citirano 2024 8 8]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2016/02/Duhan_2015.pdf
15. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Istraživanje o uporabi duhana u odrasloj populaciji Republike Hrvatske. Zagreb, Hrvatska. 2024 [citirano 2024 9 10]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2016/02/Duhan_2015.pdf
16. Philip Morris Int. About us, our products [Internet]. Stamford, Connecticut [citirano 2024 7 21]. Dostupno na: <https://www.pmi.com/markets/croatia/hr/about-us/our-products>
17. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Europska zdravstvena anketa u Hrvatskoj 2019., Osnovni pokazatelji. Zagreb, Hrvatska. 2024 [citirano 2024 9 10]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/07/EHIS-Osnovni-pokazatelji-1.pdf>
18. Borgerding M, Klus H. Analysis of complex mixtures – Cigarette smoke. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2005;57:43–73.
19. Das S, Prochaska JJ. Tobacco, Nicotine, Health, and Mental Health. *Encyclopedia of Mental Health*. Elsevier; 2016. p. 300–13.
20. Mishra S, Mishra M. Tobacco: Its historical, cultural, oral, and periodontal health association. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2013;3:12.
21. Morabia A. Quality, originality, and significance of the 1939 “Tobacco consumption and lung carcinoma” article by Mueller, including translation of a section of the paper. *Prev Med (Baltim)*. 2012;55:171–7.

22. O'Connor R, Schneller LM, Felicione NJ, Talhout R, Goniewicz ML, Ashley DL. Evolution of tobacco products: recent history and future directions. *Tob Control*. 2022;31:175–82.
23. Gee J, Prasad K, Slayford S, Gray A, Nother K, Cunningham A, et al. Assessment of tobacco heating product THP1.0. Part 8: Study to determine puffing topography, mouth level exposure and consumption among Japanese users. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018;93:84–91.
24. Glantz SA. Heated tobacco products: the example of IQOS. *Tob Control*. 2018;27:s1–6.
25. Goldenberg M, Danovitch I, IsHak WW. Quality of life and smoking. *Am J Addict*. 2014;23:540–62.
26. Oyapero A, Erinoso O, Olatosi O. Policy Proposal for Integration of Tobacco Cessation Interventions into Oral Health Care in Dental Settings. *West Afr J med*. 2022;39:486–96.
27. DeVito EE, Krishnan-Sarin S. E-cigarettes: Impact of E-Liquid Components and Device Characteristics on Nicotine Exposure. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16:438–59.
28. Li X, Luo Y, Jiang X, Zhang H, Zhu F, Hu S, et al. Chemical Analysis and Simulated Pyrolysis of Tobacco Heating System 2.2 Compared to Conventional Cigarettes. *Nicotine & Tobacco Research*. 2019;21:111–8.
29. Seidenberg A, Freeman B. IQOS is not an acronym: a call to researchers and journals. *Tob Control*. 2021;30:356–8.
30. Münzel T, Hahad O, Kuntic M, Keaney JF, Deanfield JE, Daiber A. Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes. *Eur Heart J*. 2020;41:4057–70.
31. Zhang X, Martinez-Donate AP, Kuo D, Piper M. Beyond cigarette smoking: smoke-free home rules and use of alternative tobacco products. *Perspect Public Health*. 2016;136:30–3.
32. Phillip Morris Int. Revolucionarni proizvodi za pušače [Internet]. Stamford, Connecticut[citirano 2024 7 25]. Dostupno na: <https://www.pmi.com/markets/croatia/hr/science-and-innovation/breakthrough-products-for-smokers>

33. Khalaf HNB, Mostafa MYA, Zhukovsky M. Particulate matter variation for different types of cigarettes in indoor air. 2020. p. 080016.
34. Phillip Morris Int. Making heated tobacco products. Stamford, Connecticut [citirano 2024 7 14]. Dostupno na: <https://www.pmi.com/faq-section/heated-tobacco-products/making-heated-tobacco-products>
35. World Health Organization. Heated tobacco products, A brief. [Internet]. Geneva, Switzerland. Connecticut [citirano 2024 6 30]. Dostupno na: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/350470/WHO-EURO-2020-4571-44334-64934-eng.pdf?sequence=3>
36. Phillip Morris Int. Heated tobacco products. [Internet]. Stamford, Connecticut [citirano 2024 7 14]. Dostupno na: <https://www.pmi.com/our-business/smoke-free-products/heated-tobacco-products>
37. PMI science. Tobacco heating system. [Internet]. Stamford, Connecticut [citirano 2024 5 20]. Dostupno na: <https://www.pmiscience.com/en/products/heated-tobacco/tobacco-heating-system/>
38. PMI science. All about : Heated tobacco products. Stamford, Connecticut [citirano 2024 5 22]. Dostupno na: <https://www.pmi.com/our-science/heated-tobacco-products-explained>
39. Caputi TL, Leas E, Dredze M, Cohen JE, Ayers JW. They're heating up: Internet search query trends reveal significant public interest in heat-not-burn tobacco products. PLoS One. 2017;12:e0185735.
40. U. S. Food & Drug Administration (FDA). FDA authorizes marketing of IQOS Tobacco Heating System with 'Reduced Exposure' information. New Hampshire. [citirano 2024 6 7]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-authorizes-marketing-iqos-tobacco-heating-system-reduced-exposure-information>
41. 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.
42. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. 2009. p. 29–60.

43. Gajšek D. Povezanost pušačkih navika roditelja s prisutnošću nikotina u tijelu djeteta. *Acta medica croatica*. 2020;74:17–22.
44. Jarvik ME SN. Nicotine. In: Lowinson JH, Ruis P, Milman RB, Langrod JG, eds, editors. *Substance abuse: a comprehensive textbook*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1992. p. 334–56.
45. Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*. 2004;43:619–32.
46. Kim S. Overview of Cotinine Cutoff Values for Smoking Status Classification. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13:1236.
47. Benowitz NL, Jacob P. Nicotine and carbon monoxide intake from high- and low-yield cigarettes. *Clin Pharmacol Ther*. 1984;36:265–70.
48. Benowitz NL, III PJ. Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther*. 1984;35:499–504.
49. Zorc B, Iličić Ž. Nikotin i pušenje. *Farm Glas*. 1998;327–34.
50. Zhao C, Xie Y, Zhou X, Zhang Q, Wang N. The effect of different tobacco tar levels on DNA damage in cigarette smoking subjects. *Toxicol Res (Camb)*. 2020;9:302–7.
51. Prijić Ž, Igić R. Cigarette smoking and medical students. *J BUON*. 2021;26:1709–18.
52. Pan K-T, Leonardi GS, Ucci M, Croxford B. Can Exhaled Carbon Monoxide Be Used as a Marker of Exposure? A Cross-Sectional Study in Young Adults. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18:11893.
53. Hecht SS DD. Tobacco smoke and its constituents. In: Baan RA, Stewart BW, Straif K, editors, editors. *Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis*. Lyon(FR): International Agency for Research on Cancer; 2019.
54. Xue J, Yang S, Seng S. Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers (Basel)*. 2014;6:1138–56.

55. Harbison RD, Bourgeois MM, Johnson GT, editors. *Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology*. 6th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2015.
56. Tomar SL, Hecht SS, Jaspers I, Gregory RL, Stepanov I. Oral Health Effects of Combusted and Smokeless Tobacco Products. *Adv Dent Res*. 2019;30:4–10.
57. 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;11:251.
58. Taybos G. Oral Changes Associated with Tobacco Use. *Am J Med Sci*. 2003;326:179–82.
59. Alkhatib MN, Holt RD, Bedi R. Smoking and tooth discolouration: findings from a national cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2005;5:27.
60. Rosenberg M. Clinical assessment of bad breath: current concepts. *J Am Dent Assoc*. 1996;127:475–82.
61. West R. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. *Psychol Health*. 2017;32:1018–36.
62. Shiu MN, Chen THH, Chang SH, Hahn LJ. Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. *Br J Cancer*. 2000;82:1871–4.
63. Hashibe M, Mathew B, Kuruvilla B, et al. Chewing Tobacco, Alcohol, and the Risk of Erythroplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers* . 2000;9.
64. Warnakulasuriya S, Kerr AR. Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future. *J Dent Res*. 2021;100:1313–20.
65. AlJehani YA. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. *Int J Dent*. 2014;2014:1–9.
66. Lindhe J, Thorkild K, Aurejo M. Anatomija parodontalnih tkiva. In: Lindhe J, Lang PN, Karring T, ur. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija*. 5th ed. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010. p. 3–47.

67. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:11–28.
68. Torabi S SA. *Histology, periodontium*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
69. Relvas M, López-Jarana P, Monteiro L, Pacheco JJ, Braga AC, Salazar F. Study of Prevalence, Severity and Risk Factors of Periodontal Disease in a Portuguese Population. *J Clin Med*. 2022;11:3728.
70. Idrees MM, Azzeghaiby SN, Hammad MM, Kujan OB. Prevalence and severity of plaque-induced gingivitis in a Saudi adult population. *Saudi Med J*. 2014;35:1373–7.
71. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366:1809–20.
72. Mariotti A. Plakom inducirani gingivitis. In: Lindhe J, Lang NPB, Karring T, ur. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija*. 5th ed. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010. p. 405–19.
73. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol*. 2018;45.
74. 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.
75. Kinane DF LJTL. Kronični parodontitis. In: Lindhe JA, Lang NPB, Karring TC., ur., editors. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija*. 5th ed. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010. p. 405–19.
76. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006;42:80–7.
77. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013;69:137–43.

78. Di Stefano M, Polizzi A, Santonocito S, Romano A, Lombardi T, Isola G. Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis: A Critical Review on Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2022;23:5142.
79. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45.
80. Preshaw PM, Seymour RA, Heasman PA. Current Concepts in Periodontal Pathogenesis. *Dent Update.* 2004;31:570–8.
81. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2009;24:681–8.
82. Anderegg CR, Metzler DG. Tooth Mobility Revisited. *J Periodontol.* 2001;72:963–7.
83. Pilloni A, Rojas MA. Furcation Involvement Classification: A Comprehensive Review and a New System Proposal. *Dent J (Basel).* 2018;6:34.
84. Tomar SL, Asma S. Smoking-Attributable Periodontitis in the United States: Findings From NHANES III. *J Periodontol.* 2000;71:743–51.
85. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for Cigarette Smoking as a Major Risk Factor for Periodontitis. *J Periodontol.* 1993;64:16–23.
86. Linden GJ, Mullally BH. Cigarette Smoking and Periodontal Destruction in Young Adults. *J Periodontol.* 1994;65:718–23.
87. Pesce P, Menini M, Ugo G, Bagnasco F, Dioguardi M, Troiano G. Evaluation of periodontal indices among non-smokers, tobacco, and e-cigarette smokers: a systematic review and network meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2022;26:4701–14.
88. Madi M, Smith S, Alshehri S, Zakaria O, Almas K. Influence of smoking on periodontal and implant therapy: A narrative review. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20.

89. Bergstrom J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*. 2004;92:1–8.
90. Dietrich T, Bernimoulin J, Glynn RJ. The Effect of Cigareté Smoking on Gingival Bleeding. *J Periodontol*. 2004;75:16–22.
91. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 2004;31:267–72.
92. Meekin TN, Wilson RF, Scott DA, Ide M, Palmer RM. Laser Doppler flowmeter measurement of relative gingival and forehead skin blood flow in light and heavy smokers during and after smoking. *J Clin Periodontol*. 2000;27:236–42.
93. Güntsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodontal Res*. 2006;41:184–8.
94. Sørensen LT, Nielsen HB, Kharazmi A, Gottrup F. Effect of smoking and abstention on oxidative burst and reactivity of neutrophils and monocytes. *Surgery*. 2004;136:1047–53.
95. Kamma JJ, Nakou M. Subgingival Microflora in Smokers with Early Onset Periodontitis. *Anaerobe*. 1997;3:153–7.
96. Esfahrood ZR, Zamanian A, Torshabi M, Abrishami M. The effect of nicotine and cotinine on human gingival fibroblasts attachment to root surfaces. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;26:517–22.
97. Javed F, Rahman I, Romanos GE. Tobacco-product usage as a risk factor for dental implants. *Periodontol 2000*. 2019;81:48–56.
98. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija*. 5th ed. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010.
99. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89.

100. Duarte PM, Nogueira CFP, Silva SM, Pannuti CM, Schey KC, Miranda TS. Impact of Smoking Cessation on Periodontal Tissues. *Int Dent J.* 2022;72:31–6.
101. Rashid ME, Alam MK, Akhter K, Abdelghani A, Babkair HA, Sghaireen MG. Assessing the Impact of Smoking Cessation Interventions on Periodontal Health and Gingival Inflammation in Smokers with Periodontitis. *J Pharm Bioallied Sci.* 2024;16:S742–4.
102. Goel K, Gorkhali RS, Pradhan S, Gupta S. Impact of Smoking and Smoking Cessation on Periodontal Health: A Review. *Journal of Nepalese Society of Periodontology and Oral Implantology.* 2017;1:65–71.
103. Yoon V, Maalouf NM, Sakhaee K. The effects of smoking on bone metabolism. *Osteoporosis International.* 2012;23:2081–92.
104. Tarantino U, Cariati I, Greggi C, Gasbarra E, Belluati A, Ciolli L, et al. Skeletal System Biology and Smoke Damage: From Basic Science to Medical Clinic. *Int J Mol Sci.* 2021;22:6629.
105. Truntzer J, Vopat B, Feldstein M, Matityahu A. Smoking cessation and bone healing: optimal cessation timing. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology.* 2015;25:211–5.
106. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27:409–19.
107. Tan X, Wang Y, Gong T. The interplay between oral microbiota, gut microbiota and systematic diseases. *J Oral Microbiol.* 2023;15.
108. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, et al. The Human Oral Microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192:5002–17.
109. Marsh P, Do, Devine. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2013;11.
110. Newman HN, Newman HN, Wilson M. Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. *Proceedings of a Conference Held at the Royal College of Physicians.* 1999.

111. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:883-893.
112. Wade WG, Prosdocimi EM. Profiling of Oral Bacterial Communities. *J Dent Res.* 2020;99:621–9.
113. Zijngé V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, et al. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PLoS One.* 2010;5:e9321.
114. He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol (Praha).* 2015;60:69–80.
115. Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11.
116. Ma J, Kageyama S, Takeshita T, Shibata Y, Furuta M, Asakawa M, et al. Clinical utility of subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota for detecting periodontitis. *PLoS One.* 2021;16:e0253502.
117. Bosshardt DD. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol 2000.* 2018;76:43–50.
118. Abusleme L, Hoare A, Hong B, Diaz PI. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000.* 2021;86:57–78.
119. Socransky SS HA. Parodontalne infekcije. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, ur.. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija.* 5th ed. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010. p. 208–32.
120. Simonavicius E, McNeill A, Shahab L, Brose LS. Heat-not-burn tobacco products: a systematic literature review. *Tob Control.* 2019;28:582–94.
121. Auer R, Concha-Lozano N, Jacot-Sadowski I, Cornuz J, Berthet A. Heat-Not-Burn Tobacco Cigarettes. *JAMA Intern Med.* 2017;177:1050.

122. Harmful Chemicals Measured for Smoke-Free Products | PMI Science [Internet]. www.pmiscience.com. 2024 [cited 2024 Nov 3]. Available from: <https://www.pmiscience.com/en/smoke-free/harmful-chemicals-toxicants/>
123. Ganesan SM, Dabdoub SM, Nagaraja HN, Scott ML, Pamulapati S, Berman ML, et al. Adverse effects of electronic cigarettes on the disease-naive oral microbiome. *Sci Adv*. 2020;6.
124. Pagano S, Negri P, Coniglio M, Bruscoli S, Di Michele A, Marchetti MC, et al. Heat-not-burn tobacco (IQOS), oral fibroblasts and keratinocytes: cytotoxicity, morphological analysis, apoptosis and cellular cycle. An in vitro study. *J Periodontal Res*. 2021;56:917–28.
125. Morishita Y, Hasegawa S, Koie S, Nakaya S, Goto M, Miyachi H, et al. Effects of heated tobacco products and conventional cigarettes on dental implant wound healing: experimental research. *Annals of Medicine & Surgery*. 2023;85:1366–70.
126. Camoni N, Conti G, Esteves-Oliveira M, Carvalho TS, Rocuzzo A, Cagetti MG, et al. Electronic Cigarettes, Heated Tobacco Products, and Oral Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Applied Sciences*. 2023;13:9654.
127. Biondi-Zoccai G, Sciarretta S, Bullen C, Nocella C, Violi F, Loffredo L, et al. Acute Effects of Heat-Not-Burn, Electronic Vaping, and Traditional Tobacco Combustion Cigarettes: The Sapienza University of Rome-Vascular Assessment of Proatherosclerotic Effects of Smoking (SUR-VAPES) 2 Randomized Trial. *J Am Heart Assoc*. 2019;8.
128. 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.
129. D'Ambrosio F, Pisano M, Amato A, Iandolo A, Caggiano M, Martina S. Periodontal and Peri-Implant Health Status in Traditional vs. Heat-Not-Burn Tobacco and Electronic Cigarettes Smokers: A Systematic Review. *Dent J (Basel)*. 2022;10:103.
130. Abdelmaged N, EL-Shall O, Farid Z. Effects of Some Types of Smoking on the Outcome of Non-Surgical Periodontal Therapy of Periodontitis Patients. *Al-Azhar Dental Journal for Girls*. 2022;9:675–83.

131. Pouly S, Ng WT, Blanc N, Hession P, Zanetti F, Battey JND, et al. Effect of switching from cigarette smoking to the use of the tobacco heating system on periodontitis treatment outcome: Periodontal parameter results from a multicenter Japanese study. *Frontiers in Dental Medicine*. 2022;3.
132. Kuzniak NB, Kiiun ID, Soltys OM, Vatamaniuk NV, Kavchuk OM. Structure and prevalence of periodontic tissue diseases in smokers using tobacco heating products. *Ukrainian Dental Almanac*. 2022;20–4.
133. Pouly S, Ng WT, Benzimra M, Soulan A, Blanc N, Zanetti F, et al. Effect of Switching to the Tobacco Heating System Versus Continued Cigarette Smoking on Chronic Generalized Periodontitis Treatment Outcome: Protocol for a Randomized Controlled Multicenter Study. *JMIR Res Protoc*. 2021;10:e15350.
134. Ilchyshyn MP, Furdychko AI, A. Ya. B, Fedun IR, Gan I V. Features of the Influence of Tobacco Heating Systems (GLO and IQOS) on the Oral Tissues Condition. *Ukraïns'kij žurnal medicini, biologii ta sportu*. 2020;5:247–51.
135. World Health Organization. Heated Tobacco Products (HTPs) Information Sheet; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2020. [citirano 2024 8 7]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HEP-HPR-2020.2> (accessed on 20 October 2023).
136. European Respiratory Society. ERS Position Paper on Heated Tobacco Products; The Organization: Lausanne, Switzerland, 2018.[citirano 2024 6 20]. Dostupno na: <https://www.ersnet.org/the-society/news/ers-postion-paper-on-heated-tobacco-products>.
137. Yu G, Phillips S, Gail MH, Goedert JJ, Humphrys MS, Ravel J, et al. The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota. *Microbiome*. 2017;5:3.
138. Shiloah J, Patters MR, Waring MB. The Prevalence of Pathogenic Periodontal Microflora in Healthy Young Adult Smokers. *J Periodontol*. 2000;71:562–7.
139. Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival Microbial Profiles of Smokers with Periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89:1247–53.

140. Karasneh JA, Al Habashneh RA, Marzouka NAS, Thornhill MH. Effect of cigarette smoking on subgingival bacteria in healthy subjects and patients with chronic periodontitis. *BMC Oral Health*. 2017;17:64.
141. Tishchenko OV KLG. Influence of smoking heating up tobacco products and e-cigarettes on the microbiota of dental plaque. *Pol Merkur Lekarski*. 2022;50:16–20.
142. Socransky SS, Haffajee AD. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *J Periodontol*. 1992;63:322–31.
143. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976;34:235–49.
144. Miller WD. The micro-organisms of the human mouth: The local and general diseases which are caused by them (classic reprint). London, England: Forgotten Books; 2022.
145. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*. 2012;6:1176–85.
146. Teles F, Wang Y, Hajishengallis G, Hasturk H, Marchesan JT. Impact of systemic factors in shaping the periodontal microbiome. *Periodontol 2000*. 2021;85:126–60.
147. Balan P, Belibasakis G, Ivanovski S, Bostanci N, Seneviratne CJ. Community dynamics of subgingival microbiome in periodontitis and targets for microbiome modulation therapy. *Crit Rev Microbiol*. 2023;49:726–38.
148. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122.
149. Leviatan S, Shoer S, Rothschild D, Gorodetski M, Segal E. An expanded reference map of the human gut microbiome reveals hundreds of previously unknown species. *Nat Commun*. 2022;13:3863.

150. Zaura E, Pappalardo VY, Buijs MJ, Volgenant CMC, Brandt BW. Optimizing the quality of clinical studies on oral microbiome: A practical guide for planning, performing, and reporting. *Periodontol 2000*. 2021;85:210–36.
151. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9:a036798.
152. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med*. 2021;41:25–43.
153. Kikuchi T, Hayashi J, Mitani A. Next-Generation Examination, Diagnosis, and Personalized Medicine in Periodontal Disease. *J Pers Med*. 2022;12:1743.
154. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133:1–4.
155. Kchouk M, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*. 2017;09.
156. Microbenotes. Ion Torrent Sequencing: Principle, Steps, Method, Uses. Kathmandu, Nepal. [citirano 2024 11 7]. Dostupno na: <https://microbenotes.com/ion-torrent-sequencing>
157. Primorac D. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
158. Macherey-Nagel User Manual: Genomic DNA from tissue. NucleoSpinTissue. Duren, Njemačka. [citirano 2024 8 12].
Dostupno na: <https://www.mn-net.com/media/pdf/5b/d0/d9/Instruction-NucleoSpin-Tissue.pdf>
159. Mullegama S V., Alberti MO, Au C, Li Y, Toy T, Tomasian V, et al. Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. 2019. p. 359–83.
160. Kocjan BJ, Hošnjak L, Poljak M. Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2015;24.

161. Hunter ME, Ferrante JA, Meigs-Friend G, Ulmer A. Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques. *Sci Rep.* 2019;9:5259.
162. Church DL, Cerutti L, Gürtler A, Griener T, Zelazny A, Emler S. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33.
163. Liu W, LL, KMA, ZF. Popular molecular markers in bacteria. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2012;27:103–7.
164. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2761–4.
165. Renvoisé A, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology? *Med Mal Infect.* 2013;43:322–30.
166. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007;69:330–9.
167. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2011;108:4516–22.
168. Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105:2761–2.
169. Weinroth MD, Belk AD, Dean C, Noyes N, Dittoe DK, Rothrock MJ, et al. Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. *J Anim Sci.* 2022;100.
170. Biocompare. A guide to the NGS workflow. San Francisco SAD. [citirano 2024 10 9]. Dostupno na: <https://www.biocompare.com/Molecular-Biology/9187-Next-Generation-Sequencing/>

171. Lojo-Kadrić N, Poljskić N, Pojskić L. Metode sekvenciranja DNK. Laboratorijske tehnologije u molekularnoj biologiji. Sarajevo: Fakultet u Sarajevu- Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju; 2018. p. 91–7.
172. Leong I, Skinner J, Love D. Application of Massively Parallel Sequencing in the Clinical Diagnostic Testing of Inherited Cardiac Conditions. *Medical Sciences*. 2014;2:98–126.
173. Nakazato T, Ohta T, Bono H. Experimental Design-Based Functional Mining and Characterization of High-Throughput Sequencing Data in the Sequence Read Archive. *PLoS One*. 2013;8:e77910.
174. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D633–42.
175. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2012;41:D590–6.
176. Lawley B, Tannock GW. Analysis of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences Using the QIIME Software Package. 2017. p. 153–63.
177. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:7537–41.
178. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One*. 2013;8:e61217.
179. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Author Correction: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37:1091–1091.
180. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37:852–7.

181. Barwell LJ, Isaac NJB, Kunin WE. Measuring β -diversity with species abundance data. *Journal of Animal Ecology*. 2015;84:1112–22.
182. Jayaram P, Chatterjee A, Raghunathan V. Probiotics in the treatment of periodontal disease: A systematic review. *J Indian Soc Periodontol*. 2016;20:488.
183. Addy M, Morran J. Kemijska supragingivalna kontrola plaka. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, ur. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija*. 5th ed. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010. p. 734–58.
184. Tonetti MS, Sanz M. Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education. *J Clin Periodontol*. 2019;46:398–405.
185. Bašić K, Peroš K, Bošnjak Z, Šutej I. Subgingival microbiota profile in association with cigarette smoking in young adults: A cross-sectional study. *Dent J*. 2021;9.
186. Aldakheel FM, Alduraywish SA, Jhugroo P, Jhugroo C, Divakar DD. Quantification of pathogenic bacteria in the subgingival oral biofilm samples collected from cigarette-smokers, individuals using electronic nicotine delivery systems and non-smokers with and without periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2020;117:104793.
187. Thermo Fisher Scientific: Ion Chef Instrument User Guide, Maintenance, calibration, and troubleshooting. Waltham, Massachusetts, SAD. [citirano 2024 7 22]. Dostupno na: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0018668_IonChefInstrument_UG.pdf
188. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55:21–31.
189. Luzzi LIT, Greggi SLA, Passanezi E, Sant'ana ACP, Lauris JRP, Cestari TM. Evaluation of clinical periodontal conditions in smokers and non-smokers. *Journal of Applied Oral Science*. 2007;15:512–7.
190. Bergström J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol*. 2000;27:61–8.

191. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2001;28:377–88.
192. Zini A, Sgan-Cohen HD, Marcenes W. Socio-economic position, smoking, and plaque: a pathway to severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011;38:229–35.
193. Hunter L, Newcombe R, Richmond S, Owens J, Addy M. The Cardiff Dental Survey: oral hygiene, gingival and periodontal health in relation to smoking in young adults. *Int J Dent Hyg.* 2008;6:199–204.
194. Al-Habashneh R, Al-Omari M, Taani D. Smoking and caries experience in subjects with various form of periodontal diseases from a teaching hospital clinic. *Int J Dent Hyg.* 2009;7:55–61.
195. Müller H-P, Stadermann S, Heinecke A. Bleeding on probing in smokers and non-smokers in a steady state plaque environment. *Clin Oral Investig.* 2001;5:177–84.
196. Müller H, Stadermann S, Heinecke A. Longitudinal association between plaque and gingival bleeding in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol.* 2002;29:287–94.
197. Jiang Y, Zhou X, Cheng L, Li M. The Impact of Smoking on Subgingival Microflora: From Periodontal Health to Disease. *Front Microbiol.* 2020;11.
198. Boström L, Bergström J, Dahlén G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001;28:212–9.
199. Lang NP, Mombelli A, Attsrom R. Zubni plak i zubni kamenac. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, ur. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija.* 5th ed. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010. p. 184–97.
200. Kozak M, Pawlik A. The Role of the Oral Microbiome in the Development of Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023;24:5231.
201. Abdulkareem AA, Al-Taweel FB, Al-Sharqi AJB, Gul SS, Sha A, Chapple ILC. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *J Oral Microbiol.* 2023;15.

202. Xu J, Pahumunto N, Naorungroj S, Teanpaisan R. Association Between Periodontal Pathogens and Severity of Periodontal Diseases Among Adolescents in Kunming City: China. *Journal of Health Science and Medical Research*. 2024;20231029.
203. Sharma A. Persistence of *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in Dental Plaque: a Strategic Alliance. *Curr Oral Health Rep*. 2020;7:22–8.
204. Chigasaki O, Aoyama N, Sasaki Y, Takeuchi Y, Mizutani K, Ikeda Y, et al. *Porphyromonas gingivalis*, the most influential pathogen in red-complex bacteria: A cross-sectional study on the relationship between bacterial count and clinical periodontal status in Japan. *J Periodontol*. 2021;92:1719–29.
205. Belibasakis GN, Maula T, Bao K, Lindholm M, Bostanci N, Oscarsson J, et al. Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*. 2019;8:222.
206. Vielkind P, Jentsch H, Eschrich K, Rodloff AC, Stingu C-S. Prevalence of *Actinomyces* spp. in patients with chronic periodontitis. *International Journal of Medical Microbiology*. 2015;305:682–8.
207. Könönen E, Wade WG. *Actinomyces* and Related Organisms in Human Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:419–42.
208. Takahashi N, Yamada T. Glucose and Lactate Metabolism By *Actinomyces Naeslundii*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1999;10:487–503.
209. Idate U, Bhat K, Kotrashetti V, Kugaji M, Kumbar V. Molecular identification of *Capnocytophaga* species from the oral cavity of patients with chronic periodontitis and healthy individuals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2020;24:397.
210. Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk Indicators for Harboring Periodontal Pathogens. *J Periodontol*. 1998;69:1111–8.
211. Hanioka T, Morita M, Yamamoto T, Inagaki K, Wang P-L, Ito H, et al. Smoking and periodontal microorganisms. *Japanese Dental Science Review*. 2019;55:88–94.

212. Yong KLim, OJKweon, HRKim, M-KL. *Leptotrichia goodfellowii* Infection: Case Report and Literature Review. *Infection: Case Report and Literature Review*. 2016;
213. Matias WR, Bourque DL, Niwano T, Onderdonk AB, Katz JT. Subacute Bacterial Endocarditis with *Leptotrichia goodfellowii* in a Patient with a Valvular Allograft: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Infect Dis*. 2016;2016:1–5.
214. Eribe ERK, Paster BJ, Caugant DA, Dewhirst FE, Stromberg VK, Lacy GH, et al. Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov. and *Leptotrichia wadei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:583–92.
215. Yuan H, QJ, ZT, WX, ZJ, & PS. Quantitative changes of *Veillonella*, *Streptococcus*, and *Neisseria* in the oral cavity of patients with recurrent aphthous stomatitis: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol*. 2021;
216. Bovre K, Holten E. *Neisseria elongata* sp.nov., a Rod-shaped Member of the Genus *Neisseria*. Re-evaluation of Cell Shape as a Criterion in Classification. *J Gen Microbiol*. 1970;60:67–75.
217. Moon J -H., Lee J -H., Lee J -Y. Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in Korean chronic periodontitis patients. *Mol Oral Microbiol*. 2015;30:227–41.
218. Bowden G. *Actinomyces*, *Propionibacterium propionicus*, and *Streptomyces*. In: Baron S ur., editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
219. Tanaka–Bandoh K, Watanabe K, Kato N, Ueno K. Susceptibilities of *Actinomyces* Species and *Propionibacterium propionicus* to Antimicrobial Agents. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;25:S262–3.
220. Kenney EB, Saxe SR, Bowles RD. The Effect of Cigarette Smoking on Anaerobiosis in the Oral Cavity. *J Periodontol*. 1975;46:82–5.
221. Bisiaux-Salauze B, Perez C, Sebald M, Petit JC. Bacteremias caused by *Selenomonas artemidis* and *Selenomonas infelix*. *J Clin Microbiol*. 1990;28:140–2.

222. Huang C, Shi G. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *J Transl Med.* 2019;17:225.
223. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000.* 2020;84:14–34.
224. Nath S, Raveendran R. Microbial dysbiosis in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17:543.
225. Philip Morris International. About Us, Our Products; Philip Morris International: Stamford, CT, USA. [citirano 2024 6 9].Dostupno na: <https://www.pmi.com/markets/croatia/hr/about-us/our-products> (accessed on 24 October 2023)
226. Ling PM, Kim M, Egbe CO, Patanavanich R, Pinho M, Hendlin Y. Moving targets: how the rapidly changing tobacco and nicotine landscape creates advertising and promotion policy challenges. *Tob Control.* 2022;31:222–8.
227. Ratajczak A, Jankowski P, Strus P, Feleszko W. Heat Not Burn Tobacco Product—A New Global Trend: Impact of Heat-Not-Burn Tobacco Products on Public Health, a Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17:409.

POPIS SLIKA

Slika 1. Shematski prikaz IQOS-a i duhanskog umetka HEETS (Heat Sticks)

Slika 2. Dijagram povezanosti bakterijskih vrsta između i unutar mikrobnih kompleksa

Slika 3. Prikaz odnosa toksičnih tvari iz obične cigarete naspram duhanskog umetka IQOS-a izražen postotkom i načinom koji djeluje na ljudsko zdravlje

Slika 4. Prikaz koraka Ion Torrent tehnologije sekvenciranja

Slika 5. Ilustracija regija unutar 16S rRNA gena

Slika 6. Prikaz pripreme knjižnica

Slika 7. Emulzijski PCR

Slika 8. Ion Torrent sekvenciranje

Slika 9. Protokol izolacije DNA Nucleo Spin Tissue Kitom

Slika 10. Kapilarna elektroforeza amplikona hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena dobivena Agilent 2100 Bioanalyzer uređajem

Slika 11. Kapilarna elektroforeza barkodiranih i pročišćenih knjižnica za pripremu *template*-a dobivena Agilent 2100 Bioanalyzer uređajem

Slika 12. Prikaz unutarnjih karakteristika Ion Torrent Ion Chef uređaja

Slika 13. Izvještaj za sekvenciranje DNA za što je korištena Ion Torrent platforma - Run Report for Auto user GSS5PR-0495-6-2023-07-18 Omega dentalni 162

Slika 14. Usporedba prosječne dubine sondiranja i gubitka kliničkog pričvrstka između skupina izloženih nikotinu.

Slika 15. Prevalencija pomičnih zuba i prisustva parodontitisa među skupinama.

Slika 16. Opseg nakupljanja plaka i opseg gingivitisa između skupina

Slika 17. Odnos između dnevne izloženosti nikotinu i iskustva pušenja s dubinom sondiranja i gubitkom pričvrstka.

Slika 18. Broj parodontopatogenih vrsta u skupinama formiranim prema izloženosti duhanu, prisutnosti parodontitisa i njihovoj kombinaciji.

Slika 19. Brojnost parodontopatogenih vrsta prema izloženosti duhanu i prisutnosti parodontitisa.

Slika 20. Prevalencija parodontopatogenih vrsta prema izloženosti nikotinu i prisutnosti parodontitisa.

Slika 21. Brojnost *A. dentalis* u skupinama izloženih duhanu

Slika 22. Brojnost *A. massiliensis* u skupinama izloženih duhanu

Slika 23. Brojnost *A. naeslundii* u skupinama izloženih duhanu

Slika 24. Brojnost *C. sputigena* u skupinama izloženih duhanu

Slika 25. Brojnost *L. goodfellowii* u skupinama izloženih duhanu

Slika 26. Brojnost *N. elongata* u skupinama izloženih duhanu

Slika 27. Brojnost *P. hongkongensis* u skupinama izloženih duhanu

Slika 28. Brojnost *P. salivae* u skupinama izloženih duhanu

Slika 29. Brojnost *P. propionicum* u skupinama izloženih duhanu

Slika 30. Brojnost *S. infelix* u skupinama izloženih duhanu

Slika 31. Kanonička diskriminacijska funkcija

Slika 32. Usporedba brojnosti bakterije *Prevotella shahii* između skupina formiranih po ekspoziciji nikotinu

Slika 33. Analiza alfa raznolikosti (*alpha diversity*) mikrobnih zajednica u trima različitim skupinama ispitanika.

Slika 34. Prikaz analize mikrobne raznolikosti

Slika 35. Analiza glavnih koordinata vizualizira razlike u mikrobnoj zajednici između različitih skupina ispitanika

POPIS TABLICA

Tablica 1. Koncentracije izoliranih DNA u uzorcima subgingivnog dentalnog plaka

Tablica 2. Prikaz koncentracije pročišćenog PCR produkta

Tablica 3: Barkodovi ligirani na pripadajući uzorak amplikona hipervarijabilnih regija 16S rRNA sugingivnog dentalnog plaka

Tablica 4. Rezultati izračuna oitrebni volumena barkodiranih i pročišćenih knjižnica za pripremu *template-a*

Tablica 5. Usporedba sociodemografskih varijabli, pušenja i oralne higijene među skupinama.

Tablica 6. Parodontni indeksi u odnosu na status pušenja

Tablica 7. Distribucija parodontitisa između kontrolne skupine (nepušači - NP), korisnika IQOS-a i klasičnih pušača (P).

Tablica 8. Prediktor parodontitisa u logističkoj regresiji (prosječni gubitak pričvrstka ≥ 4 mm).

Tablica 9. Prevalencija parodontopatogenih bakterija u kontrolnoj skupini (nepušači - NS), korisnici IQOS-a i obični pušači (S).

Tablica 10. Prevalencija parodontopatogenih bakterija u ispitanika s i bez parodontitisa

Tablica 11. Rezultati diskriminacijske analize

Tablica 12. Strukturni matriks kanoničkih diskriminacijskih funkcija

Tablica 13. Rezultati klasifikacije diskriminacijskom analizom

POPIS POKRATA

THS – sustav za zagrijavanje duhana

SZO- Svjetska Zdravstvena Organizacija

KOPB-Kronična opstruktivna bolest pluća

EHIS-2- Europska zdravstvena anketa 2

EHIS-3 - Europska zdravstvena anketa 3

HTP- Heated tobacco products

HnB- Heat not burn system

PMI- Phillip Morris International

BAT- British American Tobacco

KT&G- Korea Tobacco & Ginseng Corporation

ENDS- sustav elektroničke dostave nikotina

HEETS- Heat Stick

JTI- Japan Tobacco International

FDA- Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država

CO- ugljikov monoksid

NNN- N'-nitrozonornikotin

NNK- N'-nitrozokozin

NNT- N'-nitrozoanatabin

NAB- N'-nitrozoanabazin

PPMQ-milijuntinka

CAL- razina kliničkog pričvrstka

MMP- matriksne metaloproteinaze

PPD-dubina parodontnog džepa

FMBS- full mouth bleeding score

FMPS-full mouth plaque score

GR-gingivalna recesija

TM-mobilnost zuba

FD- furkacijski defekt

CEJ-caklinsko-cementna granica

AAP-Američka akademija za parodontologiju

EFP- Europska parodontološka federacija

ŠPŠŠ- štetne i potencijalno štetne kemikalije

ERS- Europsko respiratorno društvo

PMN-polimorfonuklearne stanice

IgG- imunoglobulin G

NK stanice-prirodnoubilačke stanice

NGS- sekvenciranje nove generacije

16S rRNA- 16S geni ribosomske ribonukleinske kiseline

pb- parovi baza

DNA-deoksiribonukelinska kiselina

ISP- magnetna zrnca

RNA- ribonukleinska kiselina

TRIS-EDTA - tris(hidroksimetil)aminometan - etilen-diamin-tetraoctena kiselina

TRIS-HLC - tris(hidroksimetil)aminometan-hidroklorid

SDS- natrijev dodecil sulfat

EDTA- etilen-diamin tetraoctena kiselina

e- PCR – emulzijska lančana reakcija polimerazom

PCR-lančana reakcija polimerazom

A-adenin

T-timin

C-citozin

G-guanin

NCBI- National Center for Biotechnology Information

RDP- Ribosomal Database Project

OUT-Amplicon Sequence Variant

PCoA- Principal Coordinates Analysis plot

CTRL-kontrola

POPIS KRATICA BAKTERIJA

A. massiliensis - *Actinomyces massiliensis*

A. dentalis - *Actinomyces dentalis*

A. naeslundii - *Actinomyces naeslundii*

A. actinomycetemcomitans - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

C. rectus - *Campylobacter Rectus*,

C. sputigena - *Capnocytophaga sputigena*

E. nodatum - *Eubacterium nodatum*

F. nucleatum - *F. nucleatum*

L. goodfellowii - *Leptotrichia goodfellowii*

N. elongata - *Neisseria elongata*

P. salivae - *Prevotella salivae*

P. gingivalis - *Porphyromonas Gingivalis*

P. hongkongensis - *Pauljensenia hongkongensis*

P. Intermedia - *Prevotella intermedia*,

P. micra - *Parvimonas micra*

P. proprionicum - *Pseudopropionibacterium propionicum*

P. shahii - *Prevotella shahii*

S. infelix - *Selenomonas infelix*

T. denticola – *Treponema denticola*

T. forsythia - *Tannerella forsythia*

Privitak 1. -Istraživački upitnik o oralno-higijenskim navikama i navikama pušenja

PODACI O PACIJENTU:	
Broj protokola ispitanika:	<input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> Ž
Godine:	Broj telefona:

1.Označiti odgovarajuće:

Pušač običnih cigareta

Pušač IQOS-a

Nepušač

(odgovarati do 4.
pitanja)

2.Koliko često idete na stomatološki pregled:

svaka 3 mjeseca

svakih 6 mjeseci

svakih 12 mjeseci

više od godine dana

3.Za održavanje oralne higijene koristim (moguć odabir više odgovora):

- četkicu za zube
- zubni konac
- interdentalne/međuzubne četkice
- tekućinu za ispiranje usne šupljine
- ostalo _____

4.Koliko puta dnevno perete zube:

- ne perem zube svakodnevno
- 1 puta
- 2 puta
- 3 puta
- >4 puta

5.Koliko dugo pušite samo obične cigarete / samo IQOS :

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

6.Količina popušenih cigareta / duhanskog umetka za grijanje (engl. Heat Stick, HEETS) u

1 danu:

< 5

5-10

10-15

>15

Privitak 2. Anamnestički obrazac prema Svjetskoj stomatološkoj federaciji (FDI)

UPITNIK O ZDRAVLJU PO PREPORUCI FDI 1998

[]		[]	
DATUM POPUNJAVANJA UPITNIKA		IME I PREZIME	
[]		Ž	M
DATUM ROĐENJA		SPOL	ZANIMANJE
[]		[]	
ADRESA		BROJ TELEFONA	
[]		[]	
IME, ADRESA I TELEFON NAJBЛИŽEG SRODNIKA			
[]			
AKO UPITNIK ISPUNJAVA DRUGA OSOBA NAPIŠITE NJENO IME I PREZIME			

- | | | |
|---|----|----|
| 1. Bolujete li od neke bolesti? | NE | DA |
| 2. Ako da, od koje? _____ | | |
| 3. Da li Vas je u posljednje dvije godine liječio doktor medicine? | NE | DA |
| 4. Ako jest, od koje bolesti? _____ | | |
| 5. Ime, prezime i telefon Vašeg doktora medicine _____ | | |
| 6. Jeste li se u posljednje dvije godine liječili u bolnici? | NE | DA |
| 7. Koje lijekove uzimate - ponekad ili stalno? _____ | | |
| 8. Jeste li Vi ili netko u Vašoj obitelji imali komplikacija pri lokalnoj ili općoj anesteziji? | NE | DA |
| 9. Jeste li alergični na neki lijek ili na nešto drugo? _____ | | |
| 10. Je li u Vas ikad primijećen poremećaj zgrušavanja krvi? | NE | DA |
| 11. Jesu li Vas ikad liječili zračenjem glave ili vrata? | NE | DA |
| 12. Imate li nekakvu infektivnu bolest? | NE | DA |
| 13. Jeste li ikad primili transfuziju krvi? | NE | DA |
| Navedite tip i datum _____ | | |
| 14. Jeste li bili izloženi virusu AIDS-a (HIV)? | NE | DA |
| 15. Jeste li HIV seropozitivni? | NE | DA |
| 16. Za žene. Jeste li trudni? | NE | DA |
| Ako jeste kada očekujete porod? _____ | | |

17. Označite s X bolesti (stanja) što ste ih imali ili imate

- | | | | |
|--|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> mane srčanih zalistaka | <input type="checkbox"/> endokarditis | <input type="checkbox"/> epilepsija (padavica) | <input type="checkbox"/> alergične teškoće |
| <input type="checkbox"/> urođene srčane mane | <input type="checkbox"/> stalni kašalj | <input type="checkbox"/> povećane žlijezde | <input type="checkbox"/> virusni hepatitis |
| <input type="checkbox"/> bronhiektazije | <input type="checkbox"/> TBC | <input type="checkbox"/> gastrointestinalni ulkus | <input type="checkbox"/> astma |
| <input type="checkbox"/> bolesti štitnjače | <input type="checkbox"/> artritis | <input type="checkbox"/> visoki krvni tlak | <input type="checkbox"/> leukemija |
| <input type="checkbox"/> diabetes (šećerna bolest) | <input type="checkbox"/> umjetni srčani zalistak | <input type="checkbox"/> anemija | <input type="checkbox"/> usna kandidijaza |
| <input type="checkbox"/> sinusitis | <input type="checkbox"/> srčani pacemaker | <input type="checkbox"/> glaukom | <input type="checkbox"/> žutica |
| <input type="checkbox"/> malignom (rak) | <input type="checkbox"/> psihijatrijsko liječenje | <input type="checkbox"/> spolna bolest | <input type="checkbox"/> plućni ispljuvak |

.....
(POTPIS PACIJENTA)

.....
(PREGLEDAO)



ŽIVOTOPIS

Ivana Mišković

DATUM I MJESTO ROĐENJA

29. rujna 1983. Rijeka, Republika Hrvatska

ZAPOSLENJE

1.3.2022- 26.06.2023. Sveučilišna asistentica, Katedra za parodontologiju, Fakultet dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci

- 26.02.2020-1.3.2022. Sveučilišna asistentica, Katedra za oralnu medicinu i parodontologiju, Fakultet dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci
- 1.04.2011-26.02.2020. Sveučilišna asistentica, Katedra za oralnu medicinu i parodontologiju, Studij dentalne medicine, Medicinski fakultet Rijeka Sveučilišta u Rijeci
- 5.07.2017-danas, Doktor dentalne medicine, specijalist parodontologije, Odjel za parodontologiju, Klinički bolnički centar Rijeka
- 23.6.2014-23.06.2017. Doktor dentalne medicine, specijalizant parodontologije, Klinički bolnički centar Rijeka i Klinički bolnički centar Zagreb
- 1.10.2011-6.8.2012. Sveučilišna asistentica, Katedra za dječju stomatologiju i ortodonciju, Studij dentalne medicine, Medicinski fakultet Rijeka Sveučilišta u Rijeci

- 1.12.2020-31.03.2011. Sveučilišna asistentica, Katedra za stomatološku protetiku, Studij dentalne medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- 1.3.2010-13.08.2010. Sveučilišna asistentica, Katedra za oralnu medicine i parodontologiju, Studij dentalne medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci Rijeka
- 8.12.2008-7.12.2009. Doktor dentalne medicine- pripravnik, Klinički bolnički centar Rijeka

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

- 2013. – danas Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Biomedicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- 2014. - 2019. Poslijediplomski sveučilišni studij Dentalna medicina, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- 2014. - 2017. Klinički bolnički centar Rijeka i Klinički bolnički centar Zagreb, Doktor dentalne medicine specijalizant parodontologije
- 2002. - 2008. Studij dentalne medicine, Medicinski fakultet Rijeka Sveučilišta u Rijeci
- 1998.-2002. Zubni tehničar, Srednja medicinska škola u Rijeci

PUBLIKACIJE

Poglavlje u knjizi:

Šćiran Ivana. Razvoj i struktura zubnih adherentnih materijala, zubnog plaka i zubnoga kamenca // Osnove prevencije karijesa i parodontalnih bolesti. Split: Redak, 2013. str. 9-21

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima

1. Mišković I, Kuiš D, Špalj S, Pupovac A, Prpić J. Periodontal Health Status in Adults Exposed to Tobacco Heating System Aerosol and Cigarette Smoke vs. Non-Smokers: A Cross-Sectional Study. *Dent J (Basel)*. 2024;12(2):26.
2. Mišković I, Kuiš D, Špalj S, Pupovac A, Mohar-Vitezić B, Prpić J. Does Exposure to Burning and Heated Tobacco Affect the Abundance of Perio-Pathogenic Species in the Subgingival Biofilm? *Applied Sciences*. 2024; 14(11):4824.
3. Pupovac A, Kuiš D, Mišković I, Prpić J. Impact of Periodontal Diseases on Oral Health-Related Quality of Life: A Study with a Condition-Specific Questionnaire in Croatian Population. *Eur J Dent*. 2024;18(4):1172-1178.
4. Kuis D, Sciran I, Lajnert V, et al. Coronally advanced flap alone or with connective tissue graft in the treatment of single gingival recession defects: a long-term randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2013;84(11):1576-1585.

Ostali radovi u drugim časopisima:

1. Prpić J, Mišković I, Lajnert V, Božić D, Plančak D, Pezelj-Ribarić S. Xerostomia, burning mouth syndrome, and *Candida albicans* infections-comparison between the healthy and patients suffering from coronary heart disease. *Bosnian journal of dental medicine*.2016;1 (1), 7:169-79.

2. Prpić J, Mišković I, Muhvić Urek Miranda, Glažar I, Bošnjak A, Pezelj-Ribarić S. Correlation between overweight and obesity with severity of periodontitis in adults .Medicina : glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka, 50 (2014), 3; 339-344
3. Glažar I, Ivančić Jokić N, Bakarčić D, Mišković I, Kuiš D.Probiotici u dentalnoj medicini. Medicina : glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka, 50 (2014), 3; 306-310
4. Pezelj Ribarić S, Glažar I, Muhvić Urek M, Mišković I, Lučin K. Lihenoidna reakcija. Vjesnik dentalne medicine, 1 (2014), 5-6
5. Šćiran I, Jović T. Klorheksidin i natrijev lauril sulfat: svojstva, upotreba i međudjelovanje. Vjesnik dentalne medicine, 21 (2013), 1; 32-34

Kongresna priopćenja:

1.Impact of Periodontal Diseases on Oral Health-Related Quality of Life – a study in Croatian population

Pupovac A, Kuiš D, Mišković I, Prpić J. 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress "Science and us", Rijeka, Hrvatska. 16.05.2024-18.05.2024

2. From periodontal health to disease: the impact of smoking.

Kuiš D, Prpić J, Mišković I, Pupovac A, Kunosić Z, Špalj. International Scientific Conference in Dentistry. Novi Sad, Srbija, 31.03.2023-01.04.2023

3. 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 J. Virtual World Congress of Dental Students online, 13.04.2023-14.04.2023

4. Učinak klorheksidina na uspješnost inicijalne parodontne terapije

Pupovac A, Mišković I, Kuiš D, Sever E, Božac E, Kunosić Z, Prpić J. 8. hrvatski parodontološki dani. Rovinj, Hrvatska, 01.01.2022-01.01.2022

5. Effect of smoking on implant stability at the time of implant uncovering

Muzica J, Prpić J, Pupovac A, Kunosić Z, Mišković I, Kuiš D. Journal of clinical periodontology, 2022. str. 55-142.

6. Endo-paro complications of generalized aggressive periodontitis – a case report

Mišković I, Plančak D, Bošnjak A, Pezelj-Ribarić S. Journal of clinical periodontology, 2015. str. 290-290

7. Connective tissue graft versus acellular dermalmatrix – 1 year follow-up, a case report

Kuiš D, Prpić J, Šćiran I, Bošnjak A, Pezelj-Ribarić S. Journal of clinical periodontology, 2015. str. 214-214

8. Periodontal disease parameters in patients with coronary heart disease with emphasis on disease severity

Prpić J, Kuiš D, Šćiran I, Bošnjak A, Pezelj-Ribarić S. Journal of Clinical Periodontology, Special Issue: Abstracts of EuroPerio8, London, UK, 3-6 June. 2015. str. 201-201

9. Soft Laser, Chewing Gum and Citric Acid Effects on Salivation

Mišković I, Muhvić Urek M, Glažar I, Mlacović Zrinski M, Prpić J, Kuiš D, Pezelj-Ribarić S. Journal of dental research, 2014. str. 45-45

10. Soft tissue management after tooth extraction in the esthetic zone - a case report

Šćiran I, Kovač Z, Kuiš D, Prpić J, Uhač I, Bošnjak A. Journal of Clinical Periodontology. 2012. str. 397-397

11. Oral hygiene habits in patients with coronary heart disease

Prpić J, Kuiš D, Bošnjak A, Ivić-Kardum M, Šćiran I, Pezelj-Ribarić S. Journal of clinical periodontology, 2012

Sažeci u zbornicima skupova

1. 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. *Acta stomatologica Croatica*, 58, 1, 2024. str. 94-108

2. Koliko dobro peru zube oni koji to znaju?

Mišković I, Kuiš D, Prpić J, Vuković FM. *Acta Stomatologia Croatica*.

Zagreb, 2019. str. 184-184

3. Trombocitima bogat fibrin u parodontnoj plastičnoj kirurgiji

Kuiš D, Matoš I, Mišković I, Vuković FM, Prpić J. *Medicina Fluminensis*, 54 (2018), 2; 177-181.

4. Primjena hijaluronske kiseline u parodontologiji

Mišković I, Plančak D, Prpić J, Kuiš D. The use of hyaluronic acid in periodontology // *Acta stomatologica Croatica*, 2017. str. 265-265

5. Predictors of oral mucosal lesions among removable prosthesis wearers

Kovačević Pavičić D, Braut A, Pezelj-Ribarić S, Glažar I, Lajnert V, Mišković I, Muhvić Urek M. *Periodicum biologorum*, 119 (2017), 3; 181-187

6. Salivary flow rate, oral yeast colonization and dental status in institutionalized and non-institutionalized elderly

Glažar I, Muhvić Urek M, Kuiš D, Prpić J, Mišković I, Kovačević Pavičić D, Pezelj-Ribarić S. *Acta clinica Croatica*, 55 (2016), 390-395.

7. Increasing the width of keratinized gingiva on implants by using a free gingival graft - case report / Proširenje pojasa pričvrstne gingive uz implantate slobodnim gingivnim transplantatom - prikaz slučaja

Mišković I, Božić D, Plančak D. *Acta stomatologica Croatica*, 2015. str. 188-188

8. Konzervativno liječenje periimplantitisa uz primjenu fotodinamske terapije - prikaz slučaja
Prpić J, Kuiš D, Mišković I, Bošnjak A, Pezelj-Ribarić S. Acta stomatologica Croatica, 2015. str.
181-181

9. Razlika električnog potencijala i pH sline u pacijenata s erozivnim i neerozivnim oralnim
lichenom planusom.

Muhvić- Urek M, Glažar I, Jurčević M, Kuiš D, Prpić J, Mišković I, Pezelj-Ribarić S. 2014.
Medicina Fluminensis, 50 (3), str. 317-324.

10. Klasifikacija gingivalnih recesija – što ima novog?

Kuiš D, Prpić J, Šćiran I, Bošnjak A. Acta stomatologica Croatica.

2013. str. 181-181

11. Endodontska i parodontna terapija u liječenju endo-paro lezija- prikaz slučajeva

Šćiran I, Braut A, Kuiš D, Prpić J, Bošnjak A. Acta stomatologica Croatica. 2013

12. Prekrivanje korijena u području donjih prednjih zuba - prikaz dvaju kirurških tehnika

Prpić J, Kuiš D, Šćiran I, Ivić-Kardum M, Bošnjak A. Acta Stomatologica Croatica.

Zagreb, 2013. str. 187-187

Projekti:

2023.- danas

Suradnik na projektu: "Okolišni čimbenici i mikrobiološke interakcije u strukturi dentalnog
biofilma" Hrvatske zaklade za znanost (IP-2020-02-4027).

Voditelj: prof. dr. sc. Stjepan Špalj dr.med.dent.

Stručna djelatnost:

Rad na popularizaciji struke:

Sudjelovanje u projektu 'Unaprijeđenje oralnog zdravlja u djece Primorsko-goranske županije' od 2009.- 2015. godine.