

# Citotoksični i genotoksični učinak različitih duhanskih proizvoda na stanicama bukalne sluznice

---

**Stazić, Vinka**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:507218>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-04**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**VINKA STAZIĆ**

**CITOTOKSIČNI I GENOTOKSIČNI UČINAK RAZLIČITIH  
DUHANSKIH PROIZVODA NA STANICAMA  
BUKALNE SLUZNICE**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina: 2020./2021.**

**Mentor: doc. dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.**

**Split, rujan 2021.**

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Pušenje .....	2
1.2. Štetnost duhanskog dima.....	3
1.3. Učinak pušenja na zdravlje .....	4
1.4. Učinak pušenja na oralnu sluznicu.....	5
1.5. Toksikologija – mikronukleus test.....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE .....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Ispitanici.....	15
3.2. Uzorkovanje stanica.....	16
3.3. Statistička obrada podataka.....	16
4. REZULTATI.....	18
5. RASPRAVA.....	26
6. ZAKLJUČCI .....	31
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	33
8. SAŽETAK.....	38
9. SUMMARY.....	40
10. ŽIVOTOPIS.....	42

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Antoniji Tadin, na neizmjernom strpljenju i razumijevanju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na stručnom vodstvu i trudu koji ste uložili, ali i na svakom savjetu i ohrabrenju tijekom studija. Bez Vas ništa od ovog ne bi bilo moguće.*

*Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljima i prijateljicama koji su uvijek bili uz mene tijekom mog studiranja i učinili ga lakšim.*

*Posebno hvala mojoj prijateljici Aniti koja mi je pomogla pri tehničkim aspektima ovoga rada.*

*Hvala dragoj rodici Petri Stazić, dr. med. dent., na svom prenesenom znanju tijekom staža i studiranja i na pomoći pri izradi ovoga diplomskog rada.*

*Ipak, najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji. Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi i podršci, što ste vjerovali u mene i poticali me da uvijek budem najbolja verzija sebe. Ovaj rad posvećujem vama.*

## **1. UVOD**

## 1.1. Pušenje

Pušenje duhana i korištenje različitih duhanskih proizvoda danas spada u jedan od glavnih javnozdravstvenih problema unatoč smanjenju prevalencije posljednjih godina. Pušenje se sastoji od uvlačenja dima dobivenog izgaranjem duhana u usta, a obično i u pluća. Najčešće se koriste cigarete, međutim danas su na tržištu dostupni različiti oblici bezdimnih duhanskih proizvoda – električne cigarete i uređaji koji zagrijavaju duhan. Svaki od njih nosi određeni rizik obolijevanja od širokoga spektra bolesti od kojih su mnoge fatalne. Preko 80 % pacijenata s oralnim karcinomom su korisnici duhanskih proizvoda. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) duhan uzrokuje 5,4 milijuna smrtnih slučajeva godišnje u svijetu. SZO je također procijenila da se tijekom 20. stoljeća zbog pušenja zabilježilo 100 milijuna smrtnih slučajeva koji će se vjerojatno povećati na milijardu tijekom 21. stoljeća ako se nastave sadašnji trendovi (1). Sadržaj katrana u cigaretama ima veliku ulogu u nastanku bolesti od pušenja. Cigarete koje se prodaju u zemljama u razvoju obično imaju veći sadržaj katrana što rezultira većoj prevalenciji oboljelih. Prerana smrt zbog pušenja definira se kao smrt od bolesti koju je uzrokovalo pušenje u pojedinca koji bi inače kasnije umro od drugog uzroka. Mnogi ljudi obolijevaju iako su prestali pušiti, što ide u prilog štetnosti duhana. Događa se i to da pušači koji prestanu pušiti u prosjeku izgube 10 godina očekivanog životnog vijeka u usporedbi s onima koji nikada nisu ni započinjali pušiti i počinju patiti od bolesti starije životne dobi oko 10 godina ranije od nepušača (1, 2).

### *Električne cigarete*

Električne cigarete (e-cigarete) uređaji su koji isporučuju korisnicima aerosolni propilen glikol i/ili glicerol te arome s ili bez nikotina. Ne sadrže duhan niti zahtijevaju sagorijevanje, ali simuliraju vizualne, osjetilne i bihevioralne aspekte pušenja (3). Od svog pojavljivanja 2004. godine, e-cigarete postale su široko dostupne i njihova se upotreba eksponencijalno povećala u cijelom svijetu. E-cigarete se oglašavaju kao pomoć pri prestanku pušenja; zdravije, jeftinije i društveno prihvatljivije od konvencionalnih cigareta. Dostupne su u mnogo različitih konfiguracija; ali dvije glavne vrste su „otvoreni“ sustavi koje potrošač može sam napuniti pripadajućom tekućinom (npr. spremnici ili modularni sustavi) ili „zatvoreni“ sustavi (npr. zamjenjive patrone koje su proizvođači prethodno napunili). Kad korisnik povuče zrak, aktivira se grijaći element koji pretvara tekućinu u ulošku u aerosol koji korisnik drži u ustima ili udiše (3). U ulošku se pohranjuje tekuća smjesa koja se tipično sastoji

od propilen glikola i/ili biljnog glicerina, vode i aroma (npr. duhan, menta, voće, kava, čokolada itd.). Tekuća smjesa sadrži nikotin u različitim koncentracijama, ali može biti bez nikotina (0 – 36 mg/mL nikotina) (4). Isparavanjem propilen glikola i glicerola nastaju visoko otrovni produkti razgradnje; formaldehid, acetaldehid (nastaje od propilenglikola) i akrolein (nastaje od glicerina) (3).

## *IQOS*

I-Quit-Ordinary-Smoking (IQOS®) jedan je od najnovijih duhanskih proizvoda koji zagrijava duhan, umjesto da ga gori. Prvi put je lansiran 2014. godine u Japanu i Italiji od strane tvrtke Philip Morris International. Opisan je kao novi hibridni proizvod između tradicionalnih cigareta i elektroničkih cigareta. Najvažnija razlika koja se navodi između IQOS-a i tradicionalne cigarete jest to da obična cigareta sagorijeva duhan na temperaturu iznad 600 °C, a IQOS ga samo zagrijava do 350 °C. Postoje tvrdnje da IQOS ne ispušta dim koji sadrži štetne komponente nastale izgaranjem i time sprječava izlaganje korisnika istim razinama kancerogena koje se nalaze u konvencionalnim cigaretama. Navodno, korištenjem IQOS-a oslobađa se aerosol koji sadrži gotovo 90 % manje otrovnih tvari od dima cigareta i da samim time nije izvor pasivnog pušenja koje negativno utječe na kvalitetu zraka u zatvorenom prostoru. IQOS se sastoji od dvije jedinice, prijenosnog punjača i držača u koji se umeće specijalno dizajnirani duhanski umetak (eng. *heets*). Držać sadrži oštricu koja se zagrijava. Na pritisak gumba, započinje zagrijavanje oštrice, odnosno duhana. Važan aspekt povezan sa IQOS sustavom je ograničen ciklus pušenja. Uređaji rade maksimalno 6 minuta (otprilike 14 udisaja) i nakon tog vremena držać vibracijom signalizira da je grijanje završeno. Držać je zatim potrebno vratiti u prijenosni punjač kako bi se opet mogao koristiti (5).

### 1.2. Štetnost duhanskog dima

Duhanski dim sadrži biološki značajne koncentracije poznatih kancerogena, kao i mnoge druge otrovne kemikalije. Neki od njih, uključujući specifične nitrozamine sastojci su duhana, uglavnom kao rezultat načina obrade, dok drugi kao što je benzopirin nastaju izgaranjem duhana (2). Zabilježeno je da nitrozamin keton dobiven iz nikotina (NNK), jedan od snažnih kancerogena u dimu cigareta, olakšava migraciju i invaziju stanica raka pluća (6). Duhanski

dim također sadrži plin ugljikov monoksid (CO). CO je snažan otrov koji istiskuje kisik s molekula hemoglobina. Međutim, akutno je količina CO u duhanskom dimu premala da bi zbog nje došlo do hipoksije i da tijelo posljedično proizvodi povećani broj crvenih krvnih stanica za kompenzaciju (2). Prilikom pušenja uobičajene cigarete, udisanje dima cigarete destilira nikotin iz duhana u cigareti. Nikotin se zatim prenosi u pluća dimom čestica gdje se apsorbira u plućnu vensku cirkulaciju. Tada nikotin ulazi u arterijsku cirkulaciju i brzo se kreće od pluća do mozga, gdje se veže za nikotinske kolinergičke receptore, dopuštajući ulazak kationa natrija ili kalcija u neuron. Ulazak kalcija u neuron izaziva oslobađanje različitih neurotransmitera u mozgu. Jedan od glavnih neurotransmitera koje nikotin oslobađa je dopamin koji signalizira ugodno iskustvo i posreduje u pojačavajućim učincima nikotina. Nikotin oslobađa dopamin u regijama mozga koji su kritični u percepciji užitka i nagrada, uključujući mezolimbicko područje, frontalni korteks, ventralno tegmentalno područje srednjeg mozga i *nucleus accumbens*. Za razliku od drugih toksina u duhanskom dimu, nikotin može uzrokovati mali dio kardiovaskularnih bolesti, ali nikako ili gotovo ništa povećanje rizika za oboljenje od respiratornih bolesti ili raka (2). Međutim, ovisnost o nikotinu koja dovodi do kroničnog pušenja duhana, neposredni je uzrok bolesti povezanih s pušenjem. Sastojci dima cigareta odgovorni za povećanje respiratornog rizika su aldehidi i mali organski spojevi nastali izgaranjem organskog materijala, osobito akrolein i acetaldehid. Ostale komponente dima cigarete za koje se utvrdilo da doprinose kardiovaskularnoj toksičnosti su cijanovodik, arsen i krezoli (7).

### 1.3. Učinak pušenja na zdravlje

Većina smrtnih slučajeva povezanih s pušenjem proizlazi iz karcinoma (uglavnom karcinoma pluća), respiratornih (uglavnom kronična opstruktivna plućna bolest - KOPB) i kardiovaskularnih bolesti (uglavnom koronarna bolest srca) (2). Pušenje je važan čimbenik rizika za moždani udar, sljepoću, gluhoću, bolove u leđima, osteoporozi i periferne vaskularne bolesti (što često dovodi do amputacije). Postoji povećan rizik od neplodnosti i kod muškaraca i žena, a u trudnoći uzrokuje nerazvijenost fetusa i povećava rizik od pobačaja, neonatalne smrti, respiratornih bolesti u potomaka, a vjerojatno je i uzrok mentalnih problema u istih. Važan je čimbenik rizika za razvoj Alzheimerove bolesti i vaskularne demencije. Postoji pozitivna povezanost između prosječne dnevne potrošnje cigareta i rizika bolesti povezane s



pušenjem, ali u slučaju kardiovaskularnih bolesti ta je povezanost nelinearna, tako da niske razine potrošnje cigareta nose veći rizik nego što bi to bilo za očekivati od jednostavnog linearnog odnosa (2). Karcinomi orofarinksa, pluća, bubrega, jetre, jednjaka, želuca i gušterače snažno su povezani s upotrebom duhana, dok postoje i uvjerljivi dokazi utjecaja duhana na druge vrste malignih bolesti. Od karcinoma usne šupljine oboli čak 274 000 ljudi u svijetu godišnje, a ta učestalost oboljenja diljem svijeta ukazuju na obrasce upotrebe duhanskih proizvoda (1).

#### 1.4. Učinak pušenja na oralnu sluznicu

Pušenje također ima veliki utjecaj na oralno zdravlje, s obzirom da tu započinje njegov put primjene. Stomatološka struka stavlja naglasak na provođenje pregleda usmjerenih na ranu detekciju karcinoma usne šupljine. Odnos između karcinoma usne šupljine i upotreba duhana dobro je dokumentirana, ali i druge oralne promjene se javljaju uz upotrebu duhana. Korištenje duhana uglavnom utječe na površinski epitel sluznice usne šupljine, što rezultira promjenama u izgledu tkiva. Promjene mogu varirati od manjih pigmentacija do značajnog zadebljanja epitela što rezultira izrazitim hiperkeratotičnim lezijama. (8). Pušenje uzrokuje i fizička oštećenja tkiva jer povisuje temperaturu u ustima. U kliničkom pregledu korisnici duhana češće imaju hiperpigmentacije, nikotinski stomatitis, crni dlakavi jezik, površinski glositis, paradontitis, leukoedem, leukoplakiju ili neoplazme. Pacijenti često navode da imaju halitozu, neugodan okus u ustima ili kserostomiju (9).

##### *Pušačka melanoza*

Melanoza pušača javlja se u 25 do 31 % korisnika duhana. Karakterizirana je diskretnim solitarnim ili konfluirajućim smeđim mrljama koje obično zahvaćaju pričvrstnu gingivu donje čeljusti labijalno. Pigmentaciju sluznice nepca i obraza povežujemo s pušenjem lule (10). Mikroskopski izgled melanoze u biti je sličan onom koji se vidi u fiziološkoj pigmentaciji ili melanotičnoj makuli. Pigmentaciju uzrokuje povećanje melanina u bazalnom staničnom sloju epitela. Ne postoji definitivno liječenje za melanozu pušača. Prestanak upotrebe duhana rezultira nestankom pigmentacije u roku od 6 do 36 mjeseci (8).

### *Nikotinski stomatitis*

Nikotinski stomatitis javlja se na tvrdom nepcu pušača. Ova se lezija najčešće nalazi u muškaraca starijih od 45 godina. U kliničkoj slici je prisutan difuzno keratotičan izgled nepca s dugotrajnom iritacijom manjih žlijezda slinovnica. Veći broj papula s točkastim crvenim središtima predstavlja nadražene male žlijezde slinovnice s upaljenim otvorima kanala. Histološki nalazi uključuju hiperkeratozu i akantozu nepčanog epitela, dugotrajnu upalu vezivnog tkiva i pločastu metaplaziju kanala žlijezda slinovnica. Nikotinski stomatitis je odgovor na toplinu, a ne na kemikalije u duhanu; dakle, ne postoji predmaligni potencijal. Međutim, dugotrajnom upotrebom duhana koja rezultira nikotinskim stomatitisom povećava se rizik karcinoma pločastih stanica tonzilarnе regije, retromolarne regije i respiratornog trakta. Nikotinski stomatitis potpuno je reverzibilan i nakon prestanka upotrebe duhana palatinalno tkivo pokazuje znakove oporavka za 1 do 2 tjedna (8).

### *Dlakavi jezik*

Crni dlakavi jezik nastaje zbog ubrzane proliferacije filiformnih papila ili nedostatne eksfolijacije keratinskih izdanaka filiformnih papila. Klinički se opaža hiperkeratoza na središnjoj liniji dorzalne strane jezika ispred *papilla circumvallata*. Filiformne papile mogu biti bijele, žute, smeđe, zelene ili crne ovisno o izvoru bojenja. U osoba koje konzumiraju duhan boja je općenito smeđa ili crna. Ovo stanje je uglavnom asimptomatsko, ali može izazvati zabrinutost zbog estetike i/ili neugodnog mirisa (8).

### *Parodontalne bolesti*

Studija Grossi i sur. otkrila je veći klinički gubitak pričvrška (CAL) i veći gubitak alveolarne kosti kod pušača nego kod nepušača, a gubitak je bio proporcionalan količini i trajanju pušenja (11). Druga studija je provela desetogodišnje presječno istraživanje koje je pokazalo da su pušači imali četiri puta veći gubitak kosti u odnosu na nepušače (12). Gotovo 90 % pacijenata s refraktornim parodontitisom su pušači (13) i pušači su imali veću vjerojatnost gubitka zubi nego nepušači (14). Uzrok povećane prevalencije parodontopatije kod pušača može biti kombinacija odgovora domaćina i učinka parodontnih patogena. Napetost kisika u parodontnom džepu smanjena je kod pušača što pogoduje naseljenu anaerobnih mikroorganizama (15). Pušenje umanjuje sposobnost revaskularizacije kostiju i mekih tkiva te

pogoršava funkciju neutrofila (16). Neutrofili u pušača imaju smanjenu kemotaksiju, fagocitozu i prijanjanje kao i smanjenu sposobnosti obrane od mikroorganizama (17-19). Pušenje ima veliku ulogu u razvoju mnogih slučajeva parodontalnih bolesti i nastavak pušenja tijekom parodontne terapije rezultirat će slabijim odgovorom na terapiju.

### *Oralni karcinom*

Utvrđeno je postojanje odnosa između količine upotrijebljenog duhanskog proizvoda i razvoja neoplazmi usne šupljine (1). Petogodišnja stopa preživljavanja za lokalizirani oralni karcinom otkriven u ranoj fazi je viša od 80 %. Ukoliko su zahvaćeni limfni čvorovi stopa pada ispod 50 %, a s udaljenim metastazama iznosi samo 20 %. Predilekcijska mjesta za razvoj oralnog karcinoma su dno usne šupljine, ventrolateralna površina jezika i nepčani lukovi (8). U istraživanju Mashberg i sur., 97% oralnih karcinoma pronađeno je na jednom od ta tri mjesta – 48,8 % na dnu usne šupljine, 17,2 % na ventrolateralnoj strani jezika, a 30,9 % na mekom nepcu (20). Konzumacija alkohola djeluje sinergistički s duhanom na nastanak oralnog karcinoma pa je tako rizik za pušača koji puno pije šest do petnaest puta veći u odnosu na nepušače i osobe koje ne piju (8). Oko 93 % oralnih karcinoma jest crvene boje ili ima crvenu komponentu. Samo 4,8 % oralnih karcinoma je bijele boje. Dakle, lezija crvene boje koja se nalazi na visoko rizičnom mjestu treba smatrati karcinomom usne šupljine dok se ne dokaže suprotno (8).

#### 1.5. Toksikologija – mikronukleus test

Danas postoji potreba za identifikacijom biomarkera koji mogu djelovati kao prediktori oralnog karcinoma i njegove povezanost s duhanom. Najvažniji biomarkeri koji se koriste kao pokazatelji strukturne i numeričke kromosomske aberacije su mikronukleusi i druge nuklearne anomalije koje su također pokazatelji progresije bolesti. Mikronukleus test je minimalno invazivna metoda za procjenu oštećenja DNK (deoksiribonukleinska kiselina), kromosomske nestabilnosti, stanične smrti i regenerativnog potencijala ljudskog tkiva. Mikronukleusi mogu detektirati u svim stanicama koje se dijele, primjerice eritrocitima, limfocitima, epitelnim stanicama grlića maternice, jednjaka, mokraćnog mjehura, bronha, oralne sluznice i dr. u kojima mikronukleusi mogu biti *in vivo* pokazatelj oštećenja genoma (21). Iako su dostupni

mnogi testovi klasificirani kao *in vivo biomonitoring*, test mikronukleusa jedan je od najboljih i najpopularnijih jer se također široko koristi za ispitivanje genotoksičnosti *in vitro* (22).

Mikronukleus je definiran kao mikroskopski vidljiva okrugla do ovalna masa citoplazmatskog kromatina pored jezgre (23). Nije povezan s jezgrom, ali sadrži DNK pa se boja slično kao jezgra. Od 1937. mikronukleusi se smatraju pokazateljima genotoksične izloženosti (24). Dva su dominantna mehanizma koji vode do njegovog nastanka u mitotičkoj stanici, kromosomski lom i disfunkcija mitotičkog aparata. Klastogeni izazivaju lomove kromosoma i daju kromosomske fragmente koji su izravno uključeni u nastanak mikronukleusa (23). Stoga se ovaj test može koristiti za procjenu citogenetskih oštećenja uzrokovanih genotoksičnim uzročnicima, a tvrdi se da je osjetljiv kao i opsežna citogenetska analiza.

Sluznica usne šupljine je lako dostupno tkivo za uzimanje uzoraka, a uspješno prikazuje genotoksične učinke čimbenika životnog stila kao što su pušenje duhana, uzimanje različitih lijekova, radioterapija i slično (21). Također, predstavlja barijeru potencijalnim kancerogenima koji ulaze u tijelo gutanjem ili disanjem te se akumuliraju u njenim stanicama. Bukalna mukoza je pločasti epitel koji se sastoji od četiri različita sloja. Rožnati sloj ili *stratum corneum* oblaže usnu šupljinu i sastoji se od stanica koje se stalno ljušte kao posljedica trošenja površinskoga tkiva. Ispod ovog sloja slijede *stratum granulosum* ili granulozni sloj i *stratum spinosum* ili trnasti sloj koji sadrži populacije diferenciranih, apoptotičnih i nekrotičnih stanica. Ispod ovih slojeva se nalazi *stratum germinativum* s bazalnim stanicama koje se aktivno dijele i bazalnim matičnim stanicama koje proizvode stanice koje održavaju profil, strukturu i integritet bukalne mukoze (21).

Matične stanice u *stratum germinativum* proizvode bazalne stanice koje sazrijevaju u prijelazne diferencirane stanice, a zatim u terminalno diferencirane stanice koje migriraju prema površinskom sloju nakon 7 – 21 dana (21). Bazalne, prijelazne i diferencirane stanice pokazuju nuklearne promjene povezane s različitim biološkim procesima. One uključuju biomarkere oštećenja DNK (mikronukleusi i nuklearni pupoljci); stanične smrti (kondenzirani kromatin, karioreksa, piknotičke i kariolitičke stanice); citokinetičkog zastoja (binuklearne stanice) i proliferativnog djelovanja (frekvencija bazalnih stanica). Staničnu smrt obično ne možemo vidjeti u bazalnom sloju (25).

### *Kriteriji za identifikaciju i bodovanje različitih vrsta stanica*

Kriteriji za identifikaciju i bodovanje tipova stanica u bukalnom području uglavnom su bazirani na temelju koje su prvotno opisali Tolbert i sur. (26). Ovi kriteriji su namijenjeni razvrstavanju bukalnih stanica u kategorije pa tako razlikujemo „normalne“ stanice i stanice koje se smatraju „abnormalnim“ na temelju citoloških i nuklearnih značajki, koje ukazuju na oštećenje DNK, citokinetički neuspjeh ili staničnu smrt. Osim otkrivanja samog mikronukleusa kao glavne mjere toksičnosti, postoje i drugi biomarkeri genomskog oštećenja što daje sveobuhvatnu sliku citotoksičnosti i genotoksičnosti, a uključuju sljedeće: stanice zaustavljene u binuklearnoj fazi, stanice s jezgrinim pupom, kondenziranim kromatinom, fragmentiranom jezgrom (karioreksa), piknotičnom jezgrom te stanice s potpunim gubitkom jezgrinog materijala (karioliza) (27).

#### Stanica s mikronukleusom

Glavni kriterij za identifikaciju ove stanice je prisutnost glavne jezgre i jedne ili više jezgri sličnih struktura nazvanih mikronukleusima. Mikronukleusi su okruglog ili ovalnog oblika s istom teksturom i intenzitetom bojenja kao i jezgre. Promjer im se kreće između  $1/3$  i  $1/16$  veličine glavne jezgre. Učestalost mikronuklearnih bukalnih stanica u zdravih ispitanika koji nisu izloženi genotoksičnim tvarima obično je u rasponu od 0,30 do 1,70 na 1000 diferenciranih stanica. Stanice s više mikronukleusa rijetke su kod zdravih ispitanika, ali postaju sve češće kod osoba izloženih zračenju ili drugim genotoksičnim uzročnicima, a ukazuju na gubitak ili fragmentaciju kromosoma koji su se dogodili tijekom ranije nuklearne podjele. Mikronuklearne stanice imaju sljedeće karakteristike: a) sadrže i glavnu jezgru i jedan ili više mikronukleusa, b) mikronukleusne tvorbe su okrugle ili ovalne, c) mikronukleusi su Feulgen-pozitivna tijela i d) mikronukleusi se ne smiju preklapati s jezgrom (25, 26).

#### Binuklearna stanica

Binuklearne stanice sadrže dvije glavne jezgre iste veličine, morfologije, teksture i intenziteta bojenja. Jezgre su obično vrlo blizu i mogu se dodirivati. Najvjerojatniji mehanizam nastanka binuklearne stanice je neuspjeh citokineze bilo zbog defekata u nastanku mikrofilamentnog prstena ili zbog zaustavljanja staničnog ciklusa zbog neuspjele segregacije kromosoma ili disfunkcija telomera (25, 26).

### Stanica s nuklearnim pupoljkom (pup)

Stanice s nuklearnim pupoljcima sadrže jezgre s oštrim suženjem na jednom kraju koje upućuje na proces pupanja, tj. uklanjanje nuklearnog materijala pupanjem. Nuklearni pupoljak i jezgra obično su u vrlo blizu i čini se da su međusobno povezani. Pupiljak ima istu morfologiju i intenzitet bojenja kao i jezgra; međutim, njegov promjer može se kretati od pola do četvrtine onog u jezgri. Mehanizam koji dovodi do stvaranja nuklearnih pupova nije poznat, ali vjerojatno je povezan s eliminacijom amplificirane DNK, kompleksa popravaka DNK i dodatnih kromosoma aneuploidnih stanica (25, 26).

### Stanica s kariolizom

Kariolitičke stanice su terminalno diferencirane stanice za koje se na preparatu doima da nedostaje jezgra. Ona je potpuno lišena DNK pa se ne boja po Feulgenju. Karioliza je faza u kojoj dolazi do potpunog raspada jezgre i javlja se u kasnijim etapama stanične smrti. Kariolitičke stanice imaju sljedeće karakteristike: a) obično su angularne i plosnatog oblika veličine terminalno diferencirane stanice, b) imaju razgrađenu jezgru koja ne sadrži DNK ni ostale strukture koje bi se mogle obojiti (25, 26).

### Stanica s karioreksom

Karioreksu karakteriziraju jezgre s opsežnijom agregacijom kromatina u odnosu na stanice s kondenziranim kromatinom. Gusti i šareni nuklearni uzorak ukazuje na nuklearni raspad tipičan za kasnije faze apoptoze. Karioreksne stanice imaju sljedeće karakteristike: a) obično su angularne i plosnatog oblika veličine terminalno diferencirane stanice, b) jezgra sadrži gušće agregirani kromatin nego u kondenziranim stanicama kromatina i c) jezgra također može pokazivati opsežnu fragmentiranost što ukazuje na uznapredovalu nuklearnu fragmentaciju (25, 26).

### Stanica s piknotičnom jezgrom

Stanice s piknotičnom jezgrom su terminalno diferencirane stanice koje imaju sitnu jezgru koja je intenzivno obojana radi velike gustoće nuklearnog materijala. Promjer jezgre je obično jedna do dvije trećine jezgre u normalnim diferenciranim stanicama. Biološki značaj piknotičnih stanica i mehanizam koji dovodi do njihovog stvaranje nije poznat, ali se smatra da bi te stanice mogle prolaziti kroz jedinstveni oblik stanične smrti; međutim, precizan mehanizam ostaje nepoznat. Oni mogu predstavljati alternativni mehanizam nuklearnog

raspada koji se razlikuje od procesa koji dovodi do kondenzacije kromatina i kariorekse (25, 26).

#### Stanica s kondenziranim kromatinom

Kondenzirane stanice kromatina karakterizirane su jezgrom s prugastim uzorkom zbog paralelnih područja kondenziranog kromatina koja su intenzivno obojena. Kada je agregacija kromatina opsežna, može se činiti da se jezgra fragmentira. Kondenzirane stanice kromatina imaju sljedeće karakteristike: a) obično su angularne i plosnatog oblika veličine terminalno diferencirane stanice b) jezgre pokazuju prugasti uzorak paralelnih kondenziranih trakata kromatina i c) različita područja kondenziranog kromatina u jezgri su intenzivnije obojeni od ostatka jezgre (25, 26).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE**



Cilj ove *in vivo* studije bio je ispitati utjecaj različitih vrsta duhanskih proizvoda (klasične cigarete, električne cigarete i IQOS-a) na epitelnim stanicama bukalne sluznice.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- Procijeniti razliku u učestalosti mikronukleusa i drugih jezgrinih anomalija (nuklearni pup, binuklearne stanice, stanice s karioreksom, kondenziranim kromatinom, piknotičkom jezgrom, kariolizom te "slomljeno jaje") između nepušača i pušača različitih vrsta duhanskih proizvoda.
- Procijeniti razliku u učestalosti mikronukleusa i drugih jezgrinih anomalija (nuklearni pup, binuklearne stanice, stanice s karioreksom, kondenziranim kromatinom, piknotičkom jezgrom, kariolizom te „slomljeno jaje“) između pušača različitih vrsta duhanskih proizvoda.

Hipoteza ovog istraživanja pretpostavlja da neće biti razlike u broju mikronukleusa i drugih jezgrinih anomalija između pušača i nepušača.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Ovo presječno istraživanje bilo je usmjereno na procjenu citotoksičnoga i genotoksičnoga oštećenja u oljuštenim bukalnim stanicama u pušača i nepušača primjenom mikronukleus testa. Istraživanje se provodilo na Katedri za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju studija Dentalne medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu tijekom srpnja i kolovoza 2021. godine. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

### 3.1. Ispitanici

Svaki je ispitanik dobrovoljno pristao sudjelovati te je prije potpisivanja afirmiranoga pristanka detaljno bio upućen u svrhu rada. U ovu studiju bilo je uključeno 160 ispitanika, 61 muškarac (38,1 %) i 99 žena (61,5 %) u dobi od 20 do 71 godine (srednja dob  $41,6 \pm 14,6$ ). Svakom ispitaniku uzeta je detaljna medicinska i dentalna anamneza. Ispitanici su ispunili upitnik predviđen za ovo istraživanje u kojemu su odgovorili na pitanja vezana za demografske čimbenike (dob, spol) i životne navike (prehrana – učestalost konzumacije mesa, povrća, voća te alkohola).

Ispitanici su birani sukladno ranije određenim kriterijima uključenja i isključenja. Kriteriji uključenja bili su minimalno godina dana korištenja ispitivanih duhanskih proizvoda, dobrovoljni pristanak na sudjelovanje u istraživanju, punoljetnost, pripadanje skupini ASA I prema Američkom anesteziološkom društvu, pacijenti bez protetskih i ortodontskih nadomjestaka u usnoj šupljini, bez prekanceroznih lezija u usnoj šupljini, bez parodontnih bolesti, bez zračenja u području glave i vrata te bez korištenja antibiotika, kortikosteroida i bisfosfonata u posljednjih šest mjeseci. Kriteriji isključenja bili su sistemska oboljenja, nedovoljne oralno – higijenske navike, trudnice i dojilje.

Za izračun veličine minimalnog potrebnog uzorka korišten je učinak veličine uzorka (Cohen's d) dobiven je iz rezultata rada Upadhyay i sur. (28). Iz razlike u broju pojavnosti mikronukleusa u stanicama bukalne sluznice osoba koje nisu pušači ( $1,03 \pm 1,27$ ) i pušača ( $7,58 \pm 5,67$ ) dobiveni učinak veličine uzorka (Cohen's d) iznosio je 1,594. Uz razinu značajnosti  $\alpha = 0,05$ , 80 % snagu testa i navedeni učinak veličine uzorka u ispitivanje je

potrebno uključiti najmanje 6 ispitanika po skupini. Veličina uzorka povećana je na 40 ispitanika kako bi se izbjegao njihov potencijalni gubitak tijekom trajanja istraživanja.

### 3.2. Uzorkovanje stanica

Uzorci epitelnih stanica obrazne sluznice uzeti su od svakog ispitanika tehnikom četkanja. Sudionici istraživanja zamoljeni su da prije uzorkovanja isperu usnu šupljinu s većom količinom vode. Nakon što su sudionici isprali usnu šupljinu vodom iz slavine, citološkom četkicom (Cytobrush Plus, GmbH, Dietramszell-Linden, Njemačka), nježnim četkanjem područja obrazne sluznice, uzet je bris. Četkicom skupljene stanice razmazane su preko šifriranog predmetnog stakalca. Stanice nanese na mikroskopska stakalca ostavljene su da se osuše na zraku i fiksiraju u otopini sastava etanol: glacijalna octena kiselina (3:1) na 4 °C najmanje 20 minuta. Bojanje stakalca slijedilo je postupak koji su opisali Thomas i sur. (21) i jezgre su obojene Schiffovim reagensom 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi (Feulgen-tehnika), dok je citoplazma obojena Fast Green-om iz Feulgenovog kompleta (Biognost, Zagreb, Hrvatska) 10 - 15 sekundi. Analiza je obavljena svjetlosnim mikroskopom Olympus CX 40 (Olympus, Tokio, Japan) pod povećanjem od 400 puta, a pojedine uočene anomalije dodatno su provjerene pod povećanjem od 1000 puta. Svaki uzorak pripremljen je u duplikatu te je postavljen na svakom predmetnom stakalcu, a analizirano je 2000 epitelnih stanica. Pojava jezgrenih abnormalnosti (mikronukleus, binukleuklearna stanica, karioreksa, karioliza, piknoza, jezgrin pup i „slomljeno jaje“) procijenjena je i kvalificirana prema Tolbertu i sur. (26).

### 3.3. Statistička obrada podataka

Dobiveni podatci uneseni su u prethodno kreiranu tablicu u programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD) gdje su kodirani za daljnju obradu u statističkom paketu za društvene znanosti (SPSS, inačica 26, IBM Corp, Armonk, New York, SAD). Inicijalna raščlamba rezultata odrađena je deskriptivnom statistikom. Vrijednosti kontinuiranih varijabli prikazane su srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom, a kategorijske varijable prikazane su kao cijeli broj i postotak. Normalnost distribucije

kvantitativnih varijabli procijenjena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Razlike među grupama uspoređene su Kruskal-Wallis analizom varijance. Multipla regresijska analiza korištena je za procjenu učinka prediktorskih varijabli (dob, spol, prehrambene navike) na zavisne varijable (mikronukleus, binuklearne stanice, slomljeno jaje, jezgrin pup, piknotička stanica, stanice s kondenziranim kromatinom, kariolitična stanica i stanica s kariorektnim kromatinom). Sve su analize određene na razini statističke značajnosti od  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

U istraživanju je sudjelovalo 160 ispitanika, od kojih 61 muškaraca i 99 žena, u dobi od 20 do 71 godina (tablica 1). Podaci dobiveni na temelju posebno razvijenog upitnika za ovo istraživanje, a koji uključuju životne navike ispitanika kao što su pušenje, konzumiranje alkohola, prehrambene navike (konzumacija mesa, voća i povrća) te broj amalgamskih i kompozitnih ispuna prikazani su u tablici 2.

Tablica 1. Demografski podatci ispitanika.

<b>Karakteristika</b>	<b>Nepušači n (%)</b>	<b>Cigarete n (%)</b>	<b>E- cigarete n (%)</b>	<b>IQOS n (%)</b>	<b>Ukupno n (%)</b>
<b>Broj ispitanika</b>	40 (24,8)	40 (24,8)	40 (24,8)	40 (24,8)	160 (100)
<b>Dob (X ± SD)</b>	47,8±12,8	43,1±16,3	40,1±14,5	35,4±12,2	41,6±14,6
<b>Spol</b>	Muškarac	20 (50)	12 (30)	13 (32,5)	61 (37,9)
	Žena	20 (50)	28 (70)	27 (67,5)	99 (61,5)

Kratice: X – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija.

Tablica 2. Deskriptivna statistika životnih navika ispitanika.

Karakteristika		Nepušači n (%)	Cigarete n (%)	E-cigarete n (%)	IQOS n (%)	Ukupno n (%)
<b>Duljina korištenja duhanskog proizvoda</b>		0	13,3±3,9	5,1±3,4	2,3±0,7	/
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>		0,85±0,83	0,25±0,54	0,83±1,66	0,20±0,89	0,53±1,09
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>		1,63±1,59	4,89±5,74	3,83±1,61	2,55±1,79	3,22±3,41
<b>Konzumacija alkohola</b>	Nikada	6 (15)	10 (25)	30 (75)	18 (45)	64 (39,8)
	≤ jednom/tjedno	17(42,5)	14 (35)	10 (25)	4 (10)	45 (28,0)
	1-3x/tjedno	9 (22,5)	5 (12,5)	0 (0)	4 (10)	18 (11,2)
	4-6x/tjedno	8 (20)	8 (20)	0 (0)	10 (25)	26 (16,1)
	≥ 1x/dnevno	0 (0)	3 (7,5)	0 (0)	4 (10)	7 (4,3)
<b>Konzumacija mesa</b>	Nikad	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (10)	4 (2,5)
	≤ jednom/tjedno	4 (10)	1 (2,5)	0 (0)	0 (0)	5 (3,1)
	1-3x/tjedno	9 (22,5)	12 (30)	0 (0)	14 (35)	35 (21,7)
	4-6x/tjedno	14 (35)	14 (35)	20 (50)	20 (50)	68 (42,2)
	≥ 1x/dnevno	13 (32,5)	13 (32,5)	20 (50)	2 (5)	48 (29,8)
<b>Konzumacija voća</b>	≤ jednom/tjedno	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5)	2 (1,2)
	1-3x/tjedno	0 (0)	12 (30)	6 (15)	8 (20)	26 (16,1)
	4-6x/tjedno	31 (77,5)	22 (55)	17 (42,5)	20 (50)	90 (55,9)
	≥ 1x/dnevno	9 (22,5)	6 (15)	17 (42,5)	10 (25)	42 (26,1)
<b>Konzumacija povrća</b>	≤ jednom/tjedno	13 (32,5)	2 (5)	0 (0)	0 (0)	15 (9,3)
	1-3x/tjedno	5 (12,5)	14 (35)	0 (0)	6 (15)	25 (15,5)
	4-6x/tjedno	6 (15)	10 (25)	23 (57,5)	26 (65)	65 (40,4)
	≥ 1x/dnevno	16 (40)	14 (35)	17 (42,5)	8 (20)	55 (34,2)

Kratice: X – srednja vrijednost, SD – standardna devijacija.



Rezultati mikronukleus testa prikazani su u tablici 3. Krusal-Wallis testom pokazana je statistički značajna razlika između ispitivanih grupa za mikronukleus ( $P = 0,011$ ), jezgrin pup ( $P = 0,012$ ), binuklearne stanice ( $P \leq 0,001$ ), karioreksu ( $P \leq 0,001$ ), kariolizu ( $P \leq 0,001$ ), kondenzirani kromatin ( $P \leq 0,001$ ) te piknozu ( $P \leq 0,001$ ). Usporedbom među grupama potvrđena je statistički značajna razlika u broju mikronukleusa između nepušača te onih koji puše cigarete i e-cigarete ( $1,22 \pm 1,00$  naspram  $1,95 \pm 1,46$  i  $1,85 \pm 0,58$ ) te pušača e-cigareta i IQOS-a ( $1,85 \pm 0,58$  naspram  $1,40 \pm 1,17$ ).

U tablicama 4-11 prikazani su rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja citogenetskih oštećenja s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima. Za broj stanica s mikronukleusom utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija s konzumacijom povrća ( $\beta = 0,244$ ,  $P = 0,017$ ), duljinom pušačkog staža ( $\beta = 0,045$ ,  $P = 0,003$ ), a negativna s konzumacijom alkohola ( $\beta = -0,147$ ,  $P = 0,035$ ).

Tablica 3. Rezultati mikronukleus testa (prosječan broj citogenetskih oštećenja/ 2000 bukalnih epitelnih stanica) među ispitanicima.

Citogenetsko oštećenje	Nepušači	Cigarete	E-cigarete	IQOS	P
<b>Mikronukleus</b>	$1,22 \pm 1,00^{A,B}$	$1,95 \pm 1,46^A$	$1,85 \pm 0,58^{B,C}$	$1,40 \pm 1,17^C$	<b>0,011</b>
<b>Jezgrin pup</b>	$0,43 \pm 0,63^{D,E,F}$	$0,85 \pm 0,80^D$	$0,90 \pm 0,74^E$	$0,90 \pm 0,81^F$	<b>0,012</b>
<b>Slomljeno jaje</b>	$0,10 \pm 0,37$	$0,13 \pm 0,33$	$0,15 \pm 0,36$	$0,13 \pm 0,33$	0,797
<b>Binuklearne stanice</b>	$4,50 \pm 2,44^{G,H,I}$	$6,37 \pm 3,64^G$	$7,35 \pm 2,45^H$	$7,30 \pm 2,90^I$	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Karioreksa</b>	$6,25 \pm 2,47^{J,K,L}$	$8,58 \pm 3,17^{J,M}$	$9,98 \pm 2,13^{K,M,N}$	$8,87 \pm 3,24^{L,N}$	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Karioliza</b>	$8,73 \pm 3,14^{O,P,Q}$	$14,75 \pm 5,56^O$	$14,85 \pm 3,54^P$	$14,88 \pm 3,86^Q$	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Kondenzirani kromatin</b>	$4,88 \pm 3,73^{R,S,T}$	$7,12 \pm 3,01^{R,U,V}$	$9,70 \pm 1,63^{S,U}$	$8,80 \pm 2,80^{T,V}$	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Piknoza</b>	$4,35 \pm 1,98^{W,X}$	$5,12 \pm 1,80^{Y,Z}$	$6,24 \pm 1,99^{W,Y}$	$6,90 \pm 2,47^{X,Z}$	<b><math>\leq 0,001</math></b>

\*Unutar istog reda, isto slovo označava statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa ( $P < 0,05$ ;  $^{A,D}P = 0,014$ ,  $^{B}P = 0,005$ ,  $^{C}P = 0,036$ ,  $^{E}P = 0,006$ ,  $^{F,V}P = 0,042$ ,  $^{G}P = 0,004$ ,  $^{H,I,J,K,L,O,P,Q,S,T,U,W,X,Z}P = \leq 0,001$ ,  $^{M}P = 0,016$ ,  $^{N}P = 0,047$ ,  $^{R}P = 0,023$ ,  $^{Y}P = 0,036$ ). Kratice: X, srednja vrijednost; SD, standardna devijacija.

Tablica 4. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja stanica s mikronukleusom s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

Karakteristika	Nestandardiziran koeficijent		Standardizirani koeficijent	t	P
	$\beta$	Standardna pogreška	Beta		
<b>Spol</b>	0,126	0,189	0,054	0,666	0,507
<b>Dob</b>	-0,331	0,007	-0,001	-0,012	0,990
<b>Konsumacija mesa</b>	0,028	0,088	0,023	0,325	0,746
<b>Konsumacija povrća</b>	0,244	0,101	0,202	2,417	<b>0,017</b>
<b>Konsumacija voća</b>	-0,013	0,127	-0,008	-0,104	0,917
<b>Konsumacija alkohola</b>	-0,147	0,069	-0,161	-2,127	<b>0,035</b>
<b>Vrsta duhanskog proizvoda</b>	-0,014	0,077	-0,014	-0,181	0,856
<b>Duljina pušačkog staža</b>	0,045	0,015	0,342	3,030	<b>0,003</b>
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>	0,061	0,037	0,185	1,656	0,100
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>	0,094	0,089	0,091	1,057	0,292

Tablica 5. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja stanica s jezgrinim pupom s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

Karakteristika	Nestandardiziran koeficijent		Standardizirani koeficijent	t	P
	$\beta$	Standardna pogreška	Beta		
<b>Spol</b>	-0,165	0,134	-0,104	-1,229	0,221
<b>Dob</b>	0,002	0,005	0,032	0,358	0,721
<b>Konsumacija mesa</b>	-0,163	0,062	-0,198	-2,627	<b>0,010</b>
<b>Konsumacija povrća</b>	0,127	0,071	0,154	1,775	0,078
<b>Konsumacija voća</b>	-0,170	0,090	-0,152	-1,888	0,061
<b>Konsumacija alkohola</b>	-0,212	0,049	-0,341	-4,320	<b>0,000</b>
<b>Vrsta duhanskog proizvoda</b>	0,077	0,055	0,111	1,402	0,163
<b>Duljina pušačkog staža</b>	0,030	0,010	0,340	2,891	<b>0,004</b>
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>	-0,028	0,026	-0,123	-1,056	0,293
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>	-0,127	0,063	-0,182	-2,026	<b>0,045</b>

Tablica 6. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja stanica sa „slomljenim jajetom“ s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

Karakteristika	Nestandardiziran koeficijent		Standardizirani koeficijent	T	P
	$\beta$	Standardna pogreška	Beta		
<b>Spol</b>	-0,015	0,067	-0,020	-0,218	0,828
<b>Dob</b>	0,003	0,002	0,143	1,446	0,150
<b>Konsumacija mesa</b>	-0,037	0,031	-0,098	-1,187	0,237
<b>Konsumacija povrća</b>	-0,036	0,036	-0,098	-1,022	0,309
<b>Konsumacija voća</b>	0,144	0,045	0,282	3,192	<b>0,002</b>
<b>Konsumacija alkohola</b>	0,038	0,025	0,136	1,569	0,119
<b>Vrsta duhanskog proizvoda</b>	0,035	0,027	0,111	1,265	0,208
<b>Duljina pušačkog staža</b>	-0,001	0,005	-0,035	-0,272	0,786
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>	-0,007	0,013	-0,071	-0,552	0,581
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>	-0,033	0,031	-0,104	-1,051	0,295

Tablica 7. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja binuklearnih stanica s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

Karakteristika	Nestandardiziran koeficijent		Standardizirani koeficijent	t	P
	$\beta$	Standardna pogreška	Beta		
<b>Spol</b>	-1,092	0,499	-0,172	-2,187	<b>0,030</b>
<b>Dob</b>	-0,037	0,018	-0,176	-2,114	<b>0,036</b>
<b>Konsumacija mesa</b>	0,274	0,232	0,082	1,183	0,239
<b>Konsumacija povrća</b>	-0,038	0,266	-0,012	-0,144	0,885
<b>Konsumacija voća</b>	-1,077	0,336	-0,239	-3,204	<b>0,002</b>
<b>Konsumacija alkohola</b>	-0,612	0,183	-0,245	-3,346	<b>0,001</b>
<b>Vrsta duhanskog proizvoda</b>	0,669	0,204	0,242	3,287	<b>0,001</b>
<b>Duljina pušačkog staža</b>	0,064	0,039	0,181	1,659	0,099
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>	0,123	0,098	0,136	1,261	0,209
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>	-0,327	0,235	-0,116	-1,395	0,165

Tablica 8. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja stanica s kariolizom s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

Karakteristika	Nestandardiziran koeficijent		Standardizirani koeficijent	t	P
	$\beta$	Standardna pogreška	Beta		
<b>Spol</b>	-1,988	0,686	-0,199	-2,897	<b>0,004</b>
<b>Dob</b>	-0,047	0,024	-0,141	-1,929	0,056
<b>Konsumacija mesa</b>	-0,643	0,319	-0,123	-2,019	<b>0,045</b>
<b>Konsumacija povrća</b>	1,772	0,366	0,341	4,837	<b>0,000</b>
<b>Konsumacija voća</b>	-0,956	0,462	-0,135	-2,069	<b>0,040</b>
<b>Konsumacija alkohola</b>	-1,186	0,251	-0,302	-4,718	<b>0,000</b>
<b>Vrsta duhanskog proizvoda</b>	1,008	0,280	0,232	3,599	<b>0,000</b>
<b>Duljina pušačkog staža</b>	0,164	0,053	0,292	3,072	<b>0,003</b>
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>	0,314	0,134	0,220	2,336	<b>0,021</b>
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>	-0,763	0,322	-0,172	-2,365	<b>0,019</b>

Tablica 9. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja stanica s karioreksom s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

Karakteristika	Nestandardiziran koeficijent		Standardizirani koeficijent	t	P
	$\beta$	Standardna pogreška	Beta		
<b>Spol</b>	0,678	0,499	0,107	1,360	0,176
<b>Dob</b>	0,005	0,018	0,024	0,289	0,773
<b>Konsumacija mesa</b>	0,398	0,231	0,120	1,720	0,087
<b>Konsumacija povrća</b>	0,210	0,266	0,064	0,788	0,432
<b>Konsumacija voća</b>	-2,012	0,336	-0,448	-5,990	<b>0,000</b>
<b>Konsumacija alkohola</b>	-0,371	0,183	-0,149	-2,028	<b>0,044</b>
<b>Vrsta duhanskog proizvoda</b>	0,893	0,203	0,325	4,391	<b>0,000</b>
<b>Duljina pušačkog staža</b>	0,125	0,039	0,352	3,224	<b>0,002</b>
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>	-0,167	0,098	-0,185	-1,715	0,088
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>	0,337	0,234	0,120	1,437	0,153

Tablica 10. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja stanica s kondeziranim kromatinom s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

Karakteristika	Nestandardiziran koeficijent		Standardizirani koeficijent	t	P
	$\beta$	Standardna pogreška	Beta		
<b>Spol</b>	-0,484	0,543	-0,069	-0,890	0,375
<b>Dob</b>	-0,040	0,019	-0,173	-2,095	<b>0,038</b>
<b>Konsumacija mesa</b>	0,144	0,252	0,039	0,570	0,569
<b>Konsumacija povrća</b>	0,019	0,290	0,005	0,066	0,948
<b>Konsumacija voća</b>	-0,531	0,366	-0,107	-1,450	0,149
<b>Konsumacija alkohola</b>	-0,657	0,199	-0,239	-3,299	<b>0,001</b>
<b>Vrsta duhanskog proizvoda</b>	1,197	0,222	0,394	5,402	<b>0,000</b>
<b>Duljina pušačkog staža</b>	0,004	0,042	0,010	0,092	0,927
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>	0,267	0,106	0,267	2,507	<b>0,013</b>
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>	0,396	0,255	0,128	1,550	0,123

Tablica 10. Rezultati višestruke regresijske analize. Povezanost broja stanica s piknozom s demografskim i životnim čimbenicima kao mogućim prediktivnim čimbenicima.

Karakteristika	Nestandardiziran koeficijent		Standardizirani koeficijent	t	P
	$\beta$	Standardna pogreška	Beta		
<b>Spol</b>	-0,718	0,396	-0,153	-1,815	0,072
<b>Dob</b>	0,008	0,014	0,051	0,563	0,574
<b>Konsumacija mesa</b>	-0,113	0,184	-0,046	-0,615	0,539
<b>Konsumacija povrća</b>	0,408	0,211	0,168	1,934	0,055
<b>Konsumacija voća</b>	-0,155	0,267	-0,047	-0,583	0,561
<b>Konsumacija alkohola</b>	-0,330	0,145	-0,179	-2,277	<b>0,024</b>
<b>Vrsta duhanskog proizvoda</b>	0,842	0,161	0,413	5,216	<b>0,000</b>
<b>Duljina pušačkog staža</b>	0,062	0,031	0,235	2,010	<b>0,046</b>
<b>Broj kompozitnih restauracija</b>	-0,176	0,077	-0,263	-2,273	<b>0,024</b>
<b>Broj amalgamskih restauracija</b>	0,062	0,186	0,030	0,336	0,737

## **5. RASPRAVA**

Cilj ove presječne studije bio je procijeniti moguća DNK (deoksiribonukleinska kiselina) oštećenja u stanicama bukalne sluznice u ispitanika koji koriste različite vrste duhanskih proizvoda danas dostupnih na tržištu. Ispitanici su bili podijeljeni u četiri skupine – nepušači, pušači konvencionalnih cigareta te korisnici e-cigareta i IQOS-a. Na temelju uzetih briseva oralne sluznice, genotoksičnost i citotoksičnost je bila procijenjena mikronukleus testom, pouzdanom metodom koja uspješno bilježi sva jezgrina oštećenja u *in vivo* i *in vitro* uvjetima. Nulta hipoteza nije potvrđena; oljuštene bukalne stanice nepušača pokazale su statistički značajno manju pojavnost većine ispitivanih parametara DNK oštećenja u odnosu na pušače općenito.

Duhan je najekstremniji primjer sustavnog ljudskog mutagena (29). Ipak, postavlja se pitanje ima li pušenje različitih duhanskih proizvoda različit utjecaj na stanice sluznice usne šupljine. Bukalna mukoza je lako dostupno tkivo za uzimanje uzoraka, a matične stanice bazalnog sloja mogu sadržavati genetska oštećenja u obliku mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija (22). U ovom istraživanju sve vrste ispitivanih duhanskih proizvoda su pokazale veću učestalost svih jezgrinih anomalija (mikronukleus, jezgrin pup, binuklearne stanice, karioreksa, karioliza, kondenzirani kromatin i piknoza) u odnosu na nepušače. Iako se u velikom broju studija mikronukleus uzima kao glavni pokazatelj toksičnosti, ova studija je pokazala da svi pušači neovisno o vrsti duhanskog proizvoda imaju izražena i ostala citogenetska oštećenja u odnosu na nepušače. Kod usporedbe nepušača i pušača konvencionalnih cigareta uočeno je statistički značajno povećanje broja mikronukleusa ( $1,22 \pm 1,00$  naspram  $1,95 \pm 1,46$ ,  $P = 0,014$ ), jezgrinog pupa ( $0,43 \pm 0,63$  i  $0,85 \pm 0,80$ ,  $P = 0,014$ ), binuklearnih stanica ( $4,50 \pm 2,44$  i  $6,37 \pm 3,64$ ,  $P = 0,04$ ), kariorekse ( $6,25 \pm 2,47$  i  $8,5 \pm 3,17$ ,  $P \leq 0,001$ ), kariolize ( $8,73 \pm 3,14$  i  $14,75 \pm 5,56$ ,  $P \leq 0,001$ ) te kondenziranog kromatina ( $4,88 \pm 3,73$  i  $7,12 \pm 3,01$ ,  $P = 0,023$ ). Jedina promjena koja se nije pokazala statistički značajnom jest „slomljeno jaje“, za razliku od studije Nersesyan i sur. gdje je ta vrsta oštećenja bila prisutna (30). Međutim, njihovi ispitanici su bili teški pušači koji su konzumirali  $\geq 40$  filtriranih ili  $\geq 30$  nefiltriranih cigareta dnevno, što je moglo uzrokovati veća oštećenja zbog izloženosti većoj koncentraciji kancerogenih sastojaka iz duhanskog dima.

Potvrđene su značajno veće učestalosti mikronukleusa u bukalnim stanicama pušača u usporedbi s nepušačima (31). Prema Kamath i sur., postoji značajan porast ukupnog broja mikronukleusa s povećanjem trajanja i učestalosti pušenja (32). S povećanjem trajanja i učestalosti navika povezanih s duhanom, aditivni učinci karcinogena dovode do povećanja genotoksičnosti kod pojedinaca što se očituje kao povećanje broja mikronukleusa (32).

Međutim, studija Naderi i sur. govori u prilog tome da cigareta ima sposobnost manifestiranja kromosomskih oštećenja već od ranog vremena korištenja (33). S druge strane, osim duljine i učestalosti pušenja istraživanje Nersesyana i sur. je uzimalo u obzir i količinu nikotina i katrana (30). Pronašli su značajnu količinu stanica s mikronukleusom samo u skupini koja je pušila najjaču vrstu cigareta (sadržaj nikotina je bio između 1,6 i 1,7 mg, a sadržaj katrana između 23 i 26 mg), a ta odstupanja mogu djelomično biti posljedica varijacija u razinama katrana i nikotina u cigaretama koje su pušili sudionici.

Mikronukleusi se mogu detektirati u svim stanicama koje se dijele, tako da se mogu promatrati toksični učinci duhanskih proizvoda i na drugim organskim sustavima (22). To su uradili 1995. Burgaz i sur. kad su pronašli značajno veću količinu stanica s mikronukleusom u oljuštenim urotelijskim stanicama pušača konvencionalnih cigareta (34). Osim što je postojala statistički značajna razlika između kontrolne skupine nepušača i pušača općenito ( $P < 0,001$ ), također je primijećena razlika u ispitanika koji puše više od 20 cigareta dnevno u usporedbi sa ispitanicima koji puše upola manje, iako ovaj učinak nije bio značajan ( $P > 0,05$ ). Slična studija, samo na stanicama vrata grlića maternice *in vivo* provedena je od strane Nersesyana i sur. Pronašli su povećan broj mikronukleusa u ispitanica koje su pušile i rezultati su im bili proporcionalni godinama ispitivanih žena. Statički značajno povećan broj stanica s mikronukleusom u postmenopauzalnih žena može biti posljedica nakupljanja mutagena dobivenih duhanom (35).

Pušači koji puše električne cigarete imaju značajno više stanica s mikronukleusom ( $1,85 \pm 0,58$  i  $1,22 \pm 1,00$ ,  $P = 0,005$ ), jezgrinim pupom ( $0,90 \pm 0,74$  i  $0,43 \pm 0,03$ ,  $P = 0,006$ ), binuklearnim stanicama ( $7,35 \pm 2,45$  i  $4,50 \pm 2,44$ ,  $P \leq 0,001$ ), karioreksom ( $9,98 \pm 2,13$  i  $6,25 \pm 2,47$ ,  $P \leq 0,001$ ), kariolizom ( $14,85 \pm 3,54$  i  $8,73 \pm 3,14$ ,  $P \leq 0,001$ ), kondenziranim kromatinom ( $9,70 \pm 1,63$  i  $4,88 \pm 3,73$ ,  $P \leq 0,001$ ) te piknozom ( $6,24 \pm 1,99$  i  $4,35 \pm 1,98$ ,  $P \leq 0,001$ ) u usporedbi s nepušačima. Ovi povećani parametri citotoksičnosti i genotoksičnosti nam sugeriraju da električne cigarete također nisu bez rizika i da se potencijalno neopravdano reklamiraju kao manje štetne. U usporedbi s klasičnim cigaretama imaju statistički značajno povećanje stanica s karioreksom, kondenziranim kromatinom i piknozom što nam može dati naslutiti da potencijalno imaju veći citotoksični i genotoksični učinak na bukalnu sluznicu. Iako su Wieczorek i sur. (3) u svojim *in vitro* istraživanjima pokazali da produkti e-cigareta imaju niske toksikološke promjene, u nedavnom sistematičnom pregledu prikazano je da e-cigarete imaju više citotoksičnih učinaka nego klasične (36). Yu i sur. su procijenili citotoksični i genotoksični učinak e-cigareta na orofarinks (37). *In vitro* test je izveden na normalnim



epitelnim stanicama kao i na staničnim linijama karcinoma pločastih stanica glave i vrata. Zaključili su da su stanice izložene e-cigaretama značajno smanjile vitalnost stanica i klonogeno preživljavanje u obje skupine ispitivanih stanica neovisno o sadržaju nikotina. Međutim, važno ograničenje ove studije može biti uporaba stanica koje su već genotipski oštećene (37). Za razliku od ove *in vitro* studije, studija Franco i sur. je provela *in vivo* istraživanje na stanicama oralne sluznice. Došli su do zaključka da su e-cigarete ipak sigurniji izbor od konvencionalnih cigareta nakon što su dobili statistički beznačajne rezultate u broju stanica s mikronukleusom između korisnika e-cigareta i zdravih kontrola (38). Moramo naglasiti da iako su naši ispitanici koristili samo e-cigaretu minimalno godinu dana, ne možemo isključiti činjenicu da je na dobivene rezultate moglo utjecati njihovo prethodno pušenje klasičnih cigareta.

Nedavni sistematični pregledi pokazuju da grijani duhan predstavlja manji javnozdravstveni problem te da ima niži rizik za kronične bolesti u usporedbi s konvencionalnim cigaretama (39, 40). Iako postoje *in vitro* studije koje podržavaju uvjerenje da je grijani duhan manje rizičan od konvencionalnih cigareta (41), u ovom istraživanju uspoređujući IQOS i klasične cigarete, IQOS pokazuje veću pojavnost stanica s kondenziranim kromatinom i piknozom što može ukazivati na njegov citotoksičniji učinak naspram klasičnih cigareta. Međutim, potrebno je naglasiti kako su IQOS uređaji naspram ostalih ispitivanih skupina najkraće u uporabi. Te same promjene bi možda mogle biti povezane s prijašnjim navikama pušenja klasičnih cigareta. Sukladno tome, uspoređujući IQOS i e-cigarete manje promjene u stanicama s mikronukleusom i karioreksom su bile prisutne kod IQOS-a. Međutim, statistički značajna razlika ostalih jezgrinih anomalija između ove dvije ispitivane skupine nije pronađena. Uzimajući u obzir da je IQOS relativno nov proizvod naspram konvencionalnih i e-cigareta, smatramo da ne postoji još dovoljno studija koje su istražile toksikologiju da bi bilo dostatno da usporedimo dobivene rezultate.

Pretraživanjem literature nismo pronašli nijednu studiju koja je poput naše uspoređivala međusobnu razliku genotoksičnog i citotoksičnog učinka klasičnih cigareta, e-cigareta i IQOS-a.

Zaključno, možemo reći da naši rezultati pokazuju značajno povišene parametre DNK oštećenja u oljuštenim bukalnim stanicama u svim ispitivanim skupinama i da svi duhanski proizvodi uzrokuju citogenetska oštećenja bez obzira na vrstu. Iako se električne cigarete i grijani duhan promoviraju kao potencijalno manje štetni i bolja opcija od klasičnih cigareta,

naše istraživanje ne ide u prilog tome. Sve dok je udio pušača u ukupnom stanovništvu značajan, a u isto vrijeme i postojan trend promoviranja alternativnih načina konzumiranja duhana potrebno je provoditi kontrolna ispitivanja te daljnja istraživanja iste problematike.

Ovo istraživanje ima i određen broj limitirajućih čimbenika koji mogu utjecati na rezultat. Jedno od njih je činjenica da između skupina svi ispitanici ne puše iste cigarete, odnosno ne koriste uređaje istog proizvođača. Treba napomenuti da su kemijski spojevi u cigaretama iz različitih tvornica i bezdimnih sredstava različiti. Također, ograničavajući čimbenik smatramo vrijeme izloženosti duhanskom dimu i kao prijedlog za buduća istraživanja predlažemo standardizaciju vremena izloženosti. Nadalje, teško je pronaći osobe koje koriste e-cigarete i IQOS, a da nikad prije nisu pušili klasične cigarete što značajno može utjecati na dobiveni rezultat. Dakle, za postizanje odlučnijih rezultata potrebna je standardizacija primijenjenih tehnika.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju rezultata dobivenih istraživanjem možemo izvesti sljedeće zaključke:

- 1) Nepušači imaju manji broj citogenetskih oštećenja u oljuštenim bukalnim stanicama u odnosu na ispitanike koji puše cigarete, e-cigarete i IQOS.
- 2) Pušači cigareta imaju veći broj mikronukleusa, jezgrinog pupa, binuklearnih stanica, kariorekse, kariolize, kondenziranog kromatina u odnosu na nepušače.
- 3) Korisnici e-cigareta imaju veći broj mikronukleusa, jezgrinog pupa, binuklearnih stanica, kariorekse, kariolize, kondenziranog kromatina i piknotičnih stanica u odnosu na nepušače.
- 4) Korisnici IQOS-a imaju veći broj jezgrinog pupa, binuklearnih stanica, kariolize, kondenziranog kromatina te piknotičnih stanica u odnosu na nepušače.
- 5) Među korisnicima duhanskih proizvoda najmanji broj stanica sa mikronukleusom imaju IQOS korisnici.
- 6) Možemo zaključiti kako duhanski proizvodi u različitom opsegu dovode do citotoksičnih i genotoksičnih učinaka u oljuštenim bukalnim stanicama.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. West R. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. *Psychol Health*. 2017;32(8):1018-36.
2. Biswas SD, Garai B, Banerjee M. Genotoxic Effects of Tobacco on Buccal Epithelium: Cell Nuclear Anomalies as Biomarker. *Asia Pac J Med Toxicol*. 2014;3:157-62.
3. Wieczorek R, Phillips G, Czekala L, Trelles Sticken E, O'Connell G, Simms L i sur. A comparative in vitro toxicity assessment of electronic vaping product e-liquids and aerosols with tobacco cigarette smoke. *Toxicol In*. 2020;66:104866.
4. Rom O, Pecorelli A, Valacchi G, Reznick AZ. Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking? *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1340:65-74.
5. 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(3):371-374.
6. Wang Y, Shi L, Li J, Wang H, Yang H. Involvement of twist in NNK exposure-promoted lung cancer cell migration and invasion. *Toxicol In Vitro*. 2020;63:104740.
7. Fowles J, Dybing E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Tob Control*. 2003;12(4):424-30.
8. Taybos G. Oral changes associated with tobacco use. *Am J Med Sci*. 2003;326(4):179-82.
9. Michalak E, Halko-Gąsior A, Chomyszyn-Gajewska M. [The impact of tobacco on oral health - based on literature]. *Przegl Lek*. 2016;73(7):516-9.
10. Gondak RO, da Silva-Jorge R, Jorge J, Lopes MA, Vargas PA. Oral pigmented lesions: Clinicopathologic features and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(6):e919-24.
11. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE i sur. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*. 1994;65(3):260-7.
12. Bergström J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol*. 2000;71(8):1338-47.
13. Magnusson I, Walker CB. Refractory periodontitis or recurrence of disease. *J Clin Periodontol*. 1996;23(3 Pt 2):289-92.

14. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. III. The effectiveness of clinical parameters in accurately predicting tooth survival. *J Periodontol.* 1996;67(7):666-74.
15. Hanioka T, Tanaka M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S. Pocket oxygen tension in smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol.* 2000;71(4):550-4.
16. Mosely LH, Finseth F, Goody M. Nicotine and its effect on wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 1978;61(4):570-5.
17. Kraal JH, Kenney EB. The response of polymorphonuclear leukocytes to chemotactic stimulation for smokers and non-smokers. *J Periodontal Res.* 1979;14(5):383-9.
18. MacFarlane GD, Herzberg MC, Wolff LF, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol.* 1992;63(11):908-13.
19. Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS i sur. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol.* 1995;66(12):1047-55.
20. Mashberg A, Meyers H. Anatomical site and size of 222 early asymptomatic oral squamous cell carcinomas: a continuing prospective study of oral cancer. II. *Cancer.* 1976;37(5):2149-57.
21. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol.* 2011;682:235-48.
22. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1534.
23. Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol.* 2012;40(1):84-90.
24. Kamath VV, Anigol P, Setlur K. Micronuclei as prognostic indicators in oral cytological smears; comparison between smokers and non-smokers. *Clin Cancer Investig J.* 2014;3:49-54.
25. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyanyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res.* 2013;753(2):100-13.

26. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69-77.
27. Yadav A.S JS. Buccal Micronucleus Cytome Assay-A Biomarker of Genotoxicity. *J Mol Biomark Diagn.* 2015;6(3):6.
28. Upadhyay M, Verma P, Sabharwal R, Subudhi SK, Jatol-Tekade S, Naphade V i sur. Micronuclei in Exfoliated Cells: A Biomarker of Genotoxicity in Tobacco Users. *Niger J Surg.* 2019;25(1):52-59.
29. DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res.* 2004;567(2-3):447-74.
30. Nersesyanyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis.* 2011;26(2):295-301.
31. Shafi F. The effects of smoking on micronucleus frequencies in buccal cells of health Iraqi individuals. *World J Pharm Res.* 2015;9:406-15.
32. Kamath VV, Anigol P, Setlur K. Micronuclei as prognostic indicators in oral cytological smears: A comparison between smokers and non-smokers. *Clin Cancer Investig J.* 2014;3:49-54.
33. Naderi NJ, Farhadi S, Sarshar S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian J Pathol Microbiol.* 2012;55(4):433-8.
34. Burgaz S, Işcan A, Büyükbingöl ZK, Bozkurt A, Karakaya AE. Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers. *Mutat Res.* 1995;335(2):163-9.
35. Nersesyanyan A, Muradyan R, Kundi M, Fenech M, Bolognesi C, Knasmueller S. Smoking causes induction of micronuclei and other nuclear anomalies in cervical cells. *Int J Hyg Environ Health.* 2020;226:113492.
36. Armendáriz-Castillo I, Guerrero S, Vera-Guapi A, Cevallos-Vilatuña T, García-Cárdenas JM, Guevara-Ramírez P i sur. C. Genotoxic and Carcinogenic Potential of Compounds Associated with Electronic Cigarettes: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2019;2019:1386710.
37. Yu V, Rahimy M, Korrapati A, Xuan Y, Zou AE, Krishnan AR i sur. Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death independently of nicotine in cell lines. *Oral Oncol.* 2016;52:58-65.



38. Franco T, Trapasso S, Puzzo L, Allegra E. Electronic Cigarette: Role in the Primary Prevention of Oral Cavity Cancer. *Clin Med Insights Ear Nose Throat*. 2016;9:7-12.
39. 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(2):409.
40. Znyk M, Jurewicz J, Kaleta D. Exposure to Heated Tobacco Products and Adverse Health Effects, a Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(12):6651.
41. Thorne D, Whitwell J, Clements J, Walker P, Breheny D, Gaca M. The genotoxicological assessment of a tobacco heating product relative to cigarette smoke using the in vitro micronucleus assay. *Toxicol Rep*. 2020;3:1010-9.

## **8. SAŽETAK**

**Naslov diplomskog rada:** Citotoksični i genotoksični učinak različitih duhanskih proizvoda na stanicama bukalne sluznice

**Cilj istraživanja:** Mikronukleus test u bukalnim epitelnim stanicama je jednostavna metoda za dijagnosticiranje genetskih oštećenja toksičnih tvari. Cilj ove *in vivo* studije bio je procijeniti citotoksični i genotoksični učinak pušenja koristeći mikronukleus test.

**Materijali i metode:** Istraživanje je provedeno na 160 ispitanika, 40 nepušača te 120 pušača. Pušači su bili podijeljeni u tri podjednake skupine ovisno o korištenom proizvodu (cigarete, električne cigarete, IQOS). Praćen je učinak pušenja na pojavnost jezgrinih anomalija uključujući mikronukleus, kondenzirani kromatin, karioreksu, kariolizu, piknozu, „slomljeno jaje“ te jezgrin pup.

**Rezultati:** Rezultati dobiveni Kruskal-Wallis testom potvrđuju značajnu razliku u učestalosti stanica s mikronukleusom ( $P = 0,011$ ), jezgrinim pupom ( $P = 0,012$ ), karioreksom ( $P \leq 0,001$ ), kariolizom ( $P \leq 0,001$ ), kondenziranim kromatinom ( $P \leq 0,001$ ) i binuklearnih stanica ( $P \leq 0,001$ ) u pušača različitih duhanskih proizvoda i nepušača.

**Zaključak:** Korištenje duhanskih proizvoda značajno dovodi do citotoksičnih i genotoksičnih oštećenja u oljuštenim bukalnim stanicama.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Cytotoxic and genotoxic effect of various tobacco products on buccal epithelial cells

**Objectives:** The micronucleus test in buccal epithelial cells is a simple method for diagnosing genetic damage to toxic substances. The aim of this *in vivo* study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effect of smoking using the micronucleus test.

**Materials and methods:** The study was conducted on 160 subjects, 40 non – smokers and 120 smokers. Smokers were divided into three equal groups depending on the products used (cigarettes, electronic cigarette and IQOS). The effect of smoking on the occurrence of nuclear anomalies including micronucleus, condensed chromatin, karyorrhexis, karyolysis, pyknosis, „fractured egg“, and nuclear bud was monitored.

**Results:** Results obtained by Kruskal-Wallis test confirm significant difference in the frequency of cells with micronuclei ( $P = 0,011$ ), nuclear buds ( $P = 0,012$ ), karyorrhexis ( $P \leq 0,001$ ), karyolysis ( $P \leq 0,001$ ), condensed chromatin ( $P \leq 0,001$ ) and binuclear cells ( $P \leq 0,001$ ) in smokers of various tobacco products versus non-smokers.

**Conclusion:** The usage of tobacco products results with significant cytotoxic and genotoxic damage of the exfoliated buccal cells.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podaci:**

Ime i prezime: Vinka Stazić

Datum i mjesto rođenja: 19. veljače 1996., Split

Državljanstvo: Hrvatsko

Adresa: Muškat 15, 21 400 Supetar

Telefon: +385 91 620 4728

E-mail: stazic.vini@hotmail.com

**Obrazovanje:**

- 2002. – 2010. Osnovna škola Supetar
- 2010. – 2014. II. Gimnazija u Splitu
- 2015. – 2021. Medicinski fakultet u Splitu – integrirani studij Dentalna medicina

**Materinski jezik:**

- Hrvatski jezik

**Ostali jezici:**

- Engleski jezik – tečno
- Talijanski jezik – osnovno

**Aktivnosti:**

- Demonstratorica na Katedri za histologiju i embriologiju (akademska godina 2016./2017. i 2017./2018.)
- Demonstratorica na Katedri za anatomiju (akademska godina 2016./2017.)
- Sudjelovanje na "11<sup>th</sup> ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine" 2019. godine u Splitu
- Sudjelovanje na 4. Simpoziju studenata dentalne medicine 2019. godine u Zagrebu
- Pohađanje tečajna trajne izobrazbe "Udlage i bruksizam" 2021. godine u Zagrebu

**Nagrade:**

- Dobitnica Dekanove nagrade za uspjeh u akademskoj godini 2015./2016.