Utjecaj duhanskog dima na oralni mikrobiom

Noa Petak, 3. razred
Marko Tatarović, 3. razred

Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
Mentor: *Karlo Horvatin*

SAŽETAK
Konzumacija duhanskih proizvoda jedan je od najznačajnijih čimbenika koji narušava ljudsko zdravlje, a njegov utjecaj proteže se i na sastav i funkcionalnost oralnog mikrobioma. Cilj ovog istraživačkog rada bio je usporediti mikrobiome kroničnih pušača i nepušača te ispitati učinak duhanskog dima korištenjem ekstrakta duhanskog dima (CSE) kao *in vitro* modela izloženosti kako bi se bolje razumio utjecaj pušenja na mikrobiološku ravnotežu usne šupljine. Sukladno tome, pretpostavlja se kako postoje razlike u mikrobiomima pušača i nepušača te kako se one temelje na bioraznolikosti i brojnosti bakterija. Uz to, pretpostavlja se i kako ekstrakt duhanskog dima usporava rast bakterija nepušačkog mikrobioma, dok nema značajan učinak na one iz mikrobioma pušača. Za razliku od očekivanog, rezultati su pokazali kako se mikrobiomi ne razlikuju značajno po bioraznolikosti te kako je glavna razlika brojnost nekih vrsta bakterija, čime je prva hipoteza opovrgnuta. Također je potvrđeno kako CSE ne djeluje na rast kao inhibitor, već stimulans za pojačan rast kolonija bakterija nekih vrsta pojačavajući proliferaciju, posebno kod nepušačkih kultura, čime je i druga hipoteza opovrgnuta.

Ključne riječi: *mikrobiom pušača i nepušača; ekstrakt duhanskog dima; proliferacija; bioraznolikost*

UVOD

Mikrobiom je zajednica mikroorganizama (kao što su bakterije, gljivice i virusi) koji nastanjuju određeno okruženje, a posebno skup mikroorganizama koji žive u ili na ljudskom tijelu (Merriam-Webster, 2026). Istraživanja su pokazala kako broj bakterija unutar ljudskog tijela premašuje broj tjelesnih stanica deset puta. Postoje mnoge vrste mikrobioma ljudskog tijela, u fokusu ovog eksperimenta bivajući oralni mikrobiom. Pojam oralnog mikrobioma odnosi se na skup mikroorganizama koji koloniziraju usnu šupljinu i njihove genome. U usnoj šupljini postoji oko 1000 vrsta bakterija, uglavnom uključujući koljena Actinobacteria, Bacteroidetes, Euryarchaeota, Fusobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes i Tenericutes (Dewhirst i sur., 2010).

Nakon kolonizacije usne šupljine, oralni mikroorganizmi prolaze kroz ekološku sukcesiju i postupno formiraju stabilne mikrobne zajednice. Međutim, na ekološku ravnotežu utječu i razni endogeni i egzogeni čimbenici. Ti čimbenici, uključujući upotrebu lijekova, način života domaćina, okoliš i status domaćina, doprinose razlikama u osjetljivosti na bolesti utječući na sastav, strukturu i metaboličke funkcije oralnih mikroorganizama. Jedan od najvećih utjecaja na sastav mikrobioma oralne šupljine ima pušenje. Mikrobiom pušača karakterizira se kao manje bioraznolik, sadrži mnogo više patogenih organizama nego mikrobiom nepušača te, zbog utjecaja na pH-vrijednost sline, simbiotske bakterije teže stvaraju biofilm (Wu i sur., 2016).

Duhanski dim je složena, dinamična i reaktivna smjesa koja sadrži preko 2000 kemikalija, a uglavnom se sastoji od dušika, kisika, ugljikovog(II) oksida i ugljikovog(IV) oksida. Plinska faza sadrži plinove i kemijske sastojke koji su dovoljno hlapljivi da ostanu u plinovitoj fazi dovoljno dugo da prođu kroz filter od staklenih vlakana. Sastojci u čestičnoj fazi uključuju karboksilne kiseline, fenole, vodu, humektante, nikotin, terpenoide, parafinske voskove, nitrozamine specifične za duhan (TSNA), PAH-ove i katehole (Pillsbury, 1969). Često korišten u istraživanjima, ekstrakt duhanskog dima (*Cigarette smoke exctract,*

Autori zadržavaju autorska prava te časopisu daju pravo prvog objavljivanja rada u skladu s licencijom CC BY 4.0, koja dopušta drugima dijeljenje rada uz navođenje autorstva i izvornog mjesta objavljivanja rada u časopisu.

CSE) jedina je otopina sastavljena od svih vodenih sastojaka glavnog toka (izravno udahnutog) duhanskog dima. Služi kao dobro utvrđen *in vitro* model izloženosti dimu cigarete.

Prema procjenama WHO-a, 5,4 milijuna preuranjenih smrti godišnje pripisuje se pušenju duhana diljem svijeta (WHO, 2025). Najčešći uzroci smrti povezani s duhanskim dimom su kardiovaskularne bolesti, kronična opstruktivna plućna bolest i različite vrste raka, posebno rak pluća. Osim toga, duhanski dim iz okoliša također značajno povećava rizik od razvoja ovih i drugih bolesti. WHO također procjenjuje kako u svijetu postoji 1,2 milijarde aktivnih pušača (WHO, 2025), dok se u Republici Hrvatskoj taj broj kreće oko 1,5 milijuna pušača starijih od 15 godina (≈37 % stanovništva). Može se primijetiti kako ovo čini temu eksperimenta iznimno aktualnom te kako je važno ukazati na razlike u mikrobiomima usne šupljine pušača i nepušača zbog predispozicija za razne bolesti koje one stvaraju. Prestankom pušenja se mogu izbjegnuti ove negativne posljedice. Izbjegavanje narušavanja mikrobioma je još jedan razlog na dugoj listi zašto bi se trebalo prestati pušiti. Brojne studije dokazuju kako, ukoliko se pušač odvikne, njegov mikrobiom nakon otprilike godinu dana ponovo počinje poprimati obilježja nepušačkog mikrobioma (Wu i sur., 2016).

Svrha ovog istraživanja je ukazati na narušavanje mikrobioma i pridonijeti razumijevanju utjecaja pušenja na sastav, stabilnost i funkcionalnu ravnotežu mikrobioloških zajednica koje nastanjuju usnu šupljinu te razjašnjavanje mogućih posljedica koje takve promjene mogu imati na zdravlje usne šupljine i sveukupno ljudsko zdravlje. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao znanstvena podloga za bolje razumijevanje štetnih učinaka duhanskog dima na oralni mikrobiom te naglasiti reverzibilnost određenih promjena u njemu koja se očituje nakon prestanka pušenja. Na taj način istraživanje doprinosi podizanju svijesti o važnosti očuvanja oralnog mikrobioma te ujedno ima potencijal potaknuti prestanak pušenja kao ključnu preventivnu mjeru u očuvanju oralnog i općeg zdravlja.

Na temelju navedenih podataka, glavni je cilj ovog istraživanja istražiti i utvrditi postoje li razlike između oralnog mikrobioma pušača i nepušača te utvrditi na koji način kronična izloženost duhanskom dimu utječe na rast kolonija, raznolikost i otpornost bakterija koje čine oralni mikrobiom koristeći se ekstraktom cigaretnog dima pripremljenom u kabinetu za biologiju, pritom procjenjujući njegovo djelovanje na bakterijske stanice izolirane iz usne šupljine. Ovime se ispituje razvijaju li bakterije izložene duhanskom dimu veću otpornost na nepovoljne uvjete. Sukladno navedenom, postavljene su sljedeće hipoteze:

1. Mikrobiomi pušača i nepušača razlikuju se po vrstama bakterija koje čine te kolonije.
2. Ekstrakt duhanskog dima smanjuje ukupnu pokrivenost hranjivih podloga kolonijama uzgojenih bakterija iz mikrobioma nepušača, a nema utjecaj na pokrivenost hranjivih podloga kolonijama bakterija iz mikrobioma pušača.

METODE RADA

Budući da je cilj istraživanja testirati utjecaj kronične izloženosti duhanskom dimu na rast i otpornost bakterija na duhanski dim, potrebno je prvo identificirati i uzgojiti bakterije koje se pojavljuju u najvećoj brojnosti kod pušača i nepušača. Ovo je potrebno jer se raznolikost mikrobioma koja se istražuje očituje u brojnosti onih bakterija na koje konzumacija duhanskih proizvoda ima utjecaj. Zbog toga se ovo istraživanje odvilo u dva dijela:

1. Identifikacija, izolacija i uzgajanje bakterija učestalih u oralnim mikrobiomima.
2. Testiranje njihove otpornosti na duhanski dim.

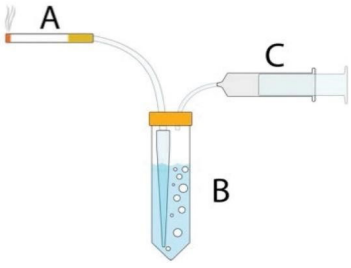
Identifikacija, izolacija i uzgoj bakterija učestalih u oralnim mikrobiomima

Pokus je izveden u školskom kabinetu iz biologije. Kako bi bakterije na koje utječe izloženost duhanskom dimu bile identificirane, uzeti su uzorci oralnih mikrobioma 30 različitih učenika – 15 pušača i 15 nepušača (pod uvjetom da nikad nisu pušili). Uzorci su uzeti iz usne šupljine (strana obraza, jezik, zubi) trljanjem vatenog sterilnog štapića 45 sekundi. Sterilni štapić zatim je povučen po površini agara (agar-agar) unutar Petrijeve zdjelice u cik-cak pokretu u sterilnoj atmosferi. Uzorci su pušteni da se razvijaju u inkubatoru na temperaturi od 37 °C na 72 h. Nakon što su se bakterije razvile i formirale vidljive kolonije izračunana je razlika u brojnosti kolonija pojedinih vrsta između uzoraka pušača i nepušača te je tablično prikazana uz brojnost kolonija pronađenih vrsta i morfoloških obilježja kolonija. Različite vrste raspoznavane su na temelju morfoloških obilježja kolonija: boje, oblika kolonije, ruba (margine), površine kolonije, reljefa i prozirnosti. Pri radu s uzorcima bakterija koristi se odgovarajuća zaštitna oprema: zaštitne naočale, zaštitne rukavice i kuta.

Za daljnje testiranje na otpornost odabrane su bakterijske vrste s najvećom učestalosti u pušačkom i nepušačkom mikrobiomu, pritom osiguravajući da razlike u otpornosti ne proizlaze iz inherentnih obilježja vrsta te ispitivanje isključivo utjecaja prisutnosti duhanskog dima u staničnom okolišu na otpornost.

Testiranje otpornosti uzoraka na duhanski dim

Kako bi otpornost bakterija na duhanski dim bila testirana pripremljen je CSE (*Cigarette Smoke Extract*) metodom korištenom u istraživanju Cigarette Smoke Extract: A Preclinical Model of Tobacco Dependence (Gellner i sur., 2016) (slika 1), a korištena aparatura prilagođena je školskom kabinetu pomoću predmeta dostupnih u školskome kabinetu. Priprema ekstrakta cigaretnog dima (CSE) provodila se korištenjem žutih *Camel* cigareta. Svi postupci izvedeni su u digestoru kako bi se izbjegla izloženost dimu. Dim cigarete uvlačio se kroz gumenu cijev spojenu na pripremljenu aparaturu (slika 2) u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL koja je sadržavala 20 mL fiziološke otopine. Povlačenje dima volumena 35 mL provodi se putem plastične šprice od 50 mL povlačenjima u trajanju od 2 sekunde, svakih 30 sekundi, sve dok cigareta nije izgori. Specifično odabrani vremenski intervali korišteni su kako bi se eksperimentalni uvjeti što vjernije približili stvarnim uvjetima pušenja. Pripremljene su 3 različite otopine CSE-a ovisno o broju cigareta čijim je izgaranjem dim provučen kroz 20 mL fiziološke otopine tijekom pripreme otopine ekstrakta – otopina C_1 u kojoj je otopljen dim jedne (≈ 25 %-tna), otopina C_2 u kojoj je otopljen dim dviju (≈ 50 %-tna) te otopina C_4 u kojoj je otopljen dim četiriju cigareta (≈ 100 %-tna otopina). Razlike u koncentracijama otopina lako su vidljive zbog različitih intenziteta boja otopina (slika 3). Otopina C_0 je fiziološka otopina koja se koristi za prekrivanje kontrolne skupine.



Slika 1 Aparatura za pripravu CSE
Izvor: Gellner i sur., 2016


Slika 2 Korištena prilagođena aparatura



Slika 3 Pripremljene otopine CSE

Otpornost bakterija na duhanski dim testirana je tako da su odabrane dvije vrste bakterija na temelju najveće učestalosti kod pušača i nepušača radi mogućnosti uzimanja većeg broja uzoraka te su potom presađene u zasebne Petrijeve zdjelice. U ovome dijelu pokusa korišteno je ukupno 48 Petrijevih

zdjelica sa hranjivom podlogom (agar-agar). Po 12 Petrijevih zdjelica korišteno ja za uzgoj svake skupine bakterija: pušačka kultura A, nepušačka kultura A, pušačka kultura B, nepušačka kultura B. Ispitivana je i uspoređivana razlika u otpornosti između pušačkih i nepušačkih kultura. Presađivanje je provedeno standardnim postupkom – steriliziranom ezom je iz kultura uzgojenih bakterija uzet uzorak pojedinih kolonija te cik-cak metodom prenesen u novu Petrijevu zdjelicu s agar-agarom u sterilnoj atmosferi. Površina agara Petrijevih zdjelica bila je zalivena jednim mililitrom otopine CSE koncentracije C_n gdje je n broj izgorjelih cigareta: C_0, C_1, C_2 i C_4. Za svaku testnu skupinu pripremljeno je 12 Petrijevih zdjelica, unutar kojih su po tri zdjelice bile izložene svakoj od pripremljenih koncentracija CSE-a. Bakterije su potom ostavljene u inkubatoru 72 h na 37 °C. Nakon toga, bakterijske su kolonije pregledane te je zabilježen udio površine Petrijeve zdjelice koju prekrivaju bakterije. Kao kontrolnu skupinu koristi se uzorak bakterija prekriven fiziološkom otopinom (C_0).

Analiza podataka

Udio površine Petrijeve zdjelice koju prekrivaju bakterije 72 sata nakon tretmana otopinom CSE-a koncentracije C_n određen je pomoću računalnog programa OpenCFU koji kvantitativno opisuje rast bakterijskih kolonija. Osim tabličnog prikaza svih pojedinih mjerenja, dobivene srednje vrijednosti udjela pokrivenosti hranjive površine po skupinama (pušačka kultura A, nepušačka kultura A, pušačka kultura B, nepušačka kultura B) dodatno su prikazane grafički kako bi se olakšala usporedba rezultata između eksperimentalnih skupina. U istraživanju nije provedena statistička analiza rezultata zbog manje količine uzoraka od potrebne za vjerodostojnu i preciznu analizu.

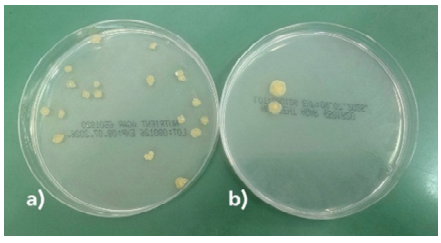
REZULTATI

Identifikacija, izolacija i uzgoj bakterija na koje utječe pušenje

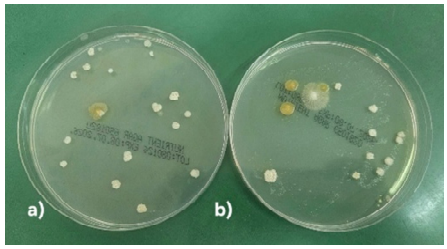
Nakon uzgoja bakterija iz uzoraka pušača i nepušača uspoređene su brojnosti kolonija i vrsti bakterija (razlikovane po morfologiji). Brojnost kolonija bakterija utvrđuje se ručnim brojenjem svake pojedine uzgojene kolonije u uzorcima te su na temelju nje utvrđene razlike u brojnosti. Rezultati su prikazani u tablici 1, a prikazi nekih od uzgojenih kultura na slikama 4, 5 i 6.

Tablica 1 Prikaz ukupne brojnosti kolonija vrsta bakterija kod pušača i nepušača

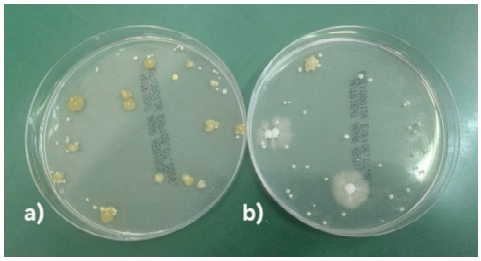
Slovo označenja	Opis – morfološka analiza	Broj kolonija kod pušača	Broj kolonija kod nepušača	Razlika u brojnosti
A	kolonije nepravilnih oblika i rubova, svijetložute boje te konveksne površine	**136**	**768**	632
B	kolonije nepravilnog oblika i nazubljenog ruba, konveksne površine te bijele boje	**73**	**80**	7
C	bijele okrugle kolonije izrazito razgranatih rubova	4	11	7
D	okrugla žuta kolonija pravilnog ruba i plosnate površine	1	2	1
E	male okrugle kolonije pravilnog ruba i konveksne površine	6	4	2



Slika 4 Prikaz uzgojenih a) pušačkih te b) nepušačkih kultura bakterija vrste A



Slika 5 Prikaz uzgojenih a) pušačkih te b) nepušačkih kultura bakterija vrste B (uz prisutnost vrste A kod pušačkog i vrsta A i C kod nepušačkog mikrobioma)



Slika 6 Prikaz uzgojenih bakterijskih kultura a) pušačkog mikrobioma – uključujući vrste A, D i E; b) nepušačkog mikrobioma – uključujući vrste A, C i E

U obje skupine su nađene iste vrste bakterija bez značajne razlike u brojnosti kolonija (osim kod vrste A). Sve su, izuzev vrste E, pronađene vrste iz uzetih uzoraka imale veću brojnost u skupini nepušača u odnosu na skupinu pušača. Za daljnje testiranje su izabrane kolonije koje su bile najbrojnije u obje skupine – vrsta bakterije A i vrsta bakterije B radi prikupljanja većeg broja uzoraka.

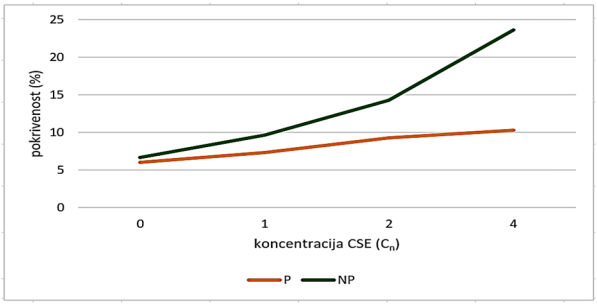
Testiranje otpornosti uzoraka na duhanski dim

Rezultati mjerenja udjela pokrivene hranjive podloge prikazani su u tablici 2, a srednje vrijednosti mjerenja udjela pokrivenosti hranjive površine po skupinama (pušačka kultura A, nepušačka kultura A, pušačka kultura B, nepušačka kultura B) prikazane su na slikama 7 i 8.

Tablica 2 Ovisnost udjela pokrivene površine Petrijeve zdjelice o koncentraciji CSE-a

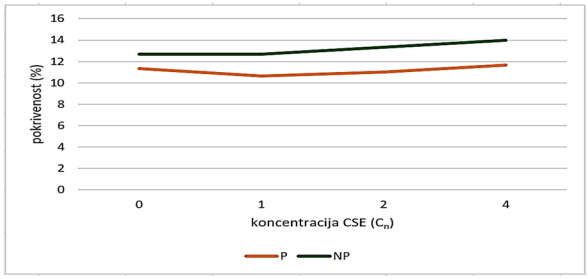
	Pokrivenost / %											
C_n	Vrsta A (pušači)			Vrsta A (nepušači)			Vrsta B (pušači)			Vrsta B (nepušači)		
C_0	8,00	5,00	5,00	6,00	8,00	6,00	11,00	10,00	13,00	13,00	11,00	14,00
C_1	9,00	7,00	6,00	8,00	9,00	11,00	10,00	12,00	10,00	13,00	12,00	13,00
C_2	11,00	7,00	10,00	13,00	17,00	13,00	12,00	12,00	9,00	12,00	13,00	15,00
C_4	10,00	12,00	9,00	24,00	25,00	22,00	13,00	10,00	12,00	14,00	16,00	12,00

Povećanje koncentracije CSE-a povećava udio pokrivenosti hranjive podloge vrstom A. Kod bakterija porijeklom iz nepušačkog mikrobioma taj je utjecaj intenzivniji nego kod bakterija iz mikrobioma pušača (slika 7).



Slika 7 Prikaz ovisnosti udjela pokrivenosti hranjive podloge o koncentraciji CSE-a – bakterijske kulture vrste A kod pušača (P) i nepušača (NP)

Povećanje koncentracije CSE-a nije utjecala na razvoj kolonija vrste B, koja se razvija s većom brojnosti u skupini nepušačkih bakterija vrste B (slika 8). Razlike u pokrivenosti hranjive podloge u odnosu na povećanje koncentracije CSE-a minimalne su.



Slika 8 Prikaz ovisnosti udjela pokrivenosti hranjive podloge o koncentraciji CSE-a – bakterijske kulture vrste B kod pušača (P) i nepušača (NP)

RASPRAVA

Rezultati ovog učeničkog rada pokazuju kako se razlike u mikrobiomima prvenstveno odnose na brojnost bakterijskih kolonija, dok sama bioraznolikost mikrobioma ostaje uglavnom nepromijenjena neovisno o pušenju kao životnoj navici, odnosno sam oralni mikrobiom pušača čine iste vrte bakterija kao i kod nepušača. Sukladno tomu, prva je pretpostavka ovog istraživanja opovrgnuta, odnosno, može

se zaključiti kako pušenje nema izražen utjecaj na brojnost kolonija većine bakterijskih vrsta koje prirodno nastanjuju usnu šupljinu, što upućuje na relativnu stabilnost oralnog mikrobioma. Slični su rezultati dobiveni u brojnim istraživanjima, poput Studije oralnog mikrobioma u Kathmandu – istraživanje pokazuje da mikrobna bioraznolikost nije značajno različita između pušača i nepušača, iako se kvalitativni sastav mikrobioma razlikuje među skupinama. To znači da ukupna bioraznolikost ostaje slična, ali određene vrste bakterija stvaraju biofilm u izraženo različitoj brojnosti u pušača u odnosu na nepušače (Bhattarai i sur., 2025). Ovo proizlazi iz inherentnih svojstava bakterija te njihovoj sposobnosti da stvaraju stabline kolonije i biofilm neovisno o uvjetima.

Iako, važno je istaknuti određene specifične obrasce koji ukazuju na suptilnije učinke pušenja. Iz rezultata je vidljivo kako je vrsta A najbrojnija i u oralnim mikrobiomima pušača i nepušača te kako kod nepušača dolazi do izraženo većeg broja razvijenih kolonija (tablica 1) što implicira kako duhanski dim ipak ima negativni dugoročni utjecaj na neke bakterijske vrste. Smatra se da duhanski dim mijenja imunološke i kemijske uvjete usne šupljine, uključujući promjene pH-vrijednosti i viskoznosti sline, povećani oksidativni stres te smanjenu dostupnost kisika. Takve promjene otežavaju stvaranje stabilnog biofilma i dugoročnu kolonizaciju, čime se narušava optimalno bakterijsko okruženje. Umjesto stabilnih i raznolikih mikrobnih zajednica, kod pušača se češće razvijaju nestabilne i funkcionalno izmijenjene zajednice, što dugoročno može dovesti do disbioze (neuravnoteženog i nestabilnog mikrobioma), čak i ako ukupna bioraznolikost na prvi pogled ne pokazuje značajne razlike (Rajasekaran i sur., 2024).

Cilj drugog dijela istraživanja bio je provjeriti razvijaju li bakterije stalnom izloženošću duhanskom dimu određenu razinu otpornosti ili prilagodbu na takav kemijski stres. Analizom grafičkih prikaza jasno je prikazano da izloženost duhanskom dimu nije imala značajan učinak na razvoj kolonija vrste B. Njezino se razmnožavanje odvijalo gotovo potpuno neovisno o koncentraciji CSE-a, što ukazuje na visoku toleranciju na kemijski stres. Istraživanja su pokazala kako kod određenih bakterijskih vrsta postoji visoka razina tolerancije na komponente duhanskog dima, a u nekim slučajevima čak i pojačana sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima. Navodi se kako duhanski dim može djelovati kao pritisak koji potiče aktivaciju brojnih stresnih regulacijskih mehanizama (Hutcherson i sur., 2015). Iako je s porastom koncentracije zabilježen blag porast pokrivenosti kolonija, taj je trend zanemariv s obzirom na ograničenu veličinu uzorka te ne omogućuje donošenje čvrstih zaključaka o učinku na temelju njega.

Suprotno tome, vrsta A pokazala je izražen odgovor na povećanje koncentracije CSE-a, i to neovisno o tome potječu li uzorci od pušača ili nepušača. Povećana koncentracija CSE-a rezultirala je većom brojnošću i bržim rastom kolonija, što upućuje na to da je CSE u ovom slučaju djelovao kao poticaj za rast kolonija. Brojne komponente duhanskog dima, uključujući nikotin, njegove derivate te različite male organske molekule, bakterijama mogu poslužiti kao dodatni izvor ugljika i dušika. Uz to, nagla izloženost kemijskom stresu može aktivirati stresne regulatorne mehanizme u bakterijskim stanicama, što dovodi do ubrzane proliferacije i pojačane metaboličke aktivnosti kao oblika adaptacije. Prijašnja su istraživanja (*S. aureus u kontroliranom i stabilnom in vitro modelu*) dokazala kako izloženost duhanskom dimu povećava formaciju biofilma i adherenciju bakterije. Smatra se da je razlog tomu aktivacija oksidativnih odgovora bakterija koje potiču formaciju biofilma (Kulkarni i sur., 2012).

Proliferacija bakterija vrste A kod pušača ostvarila se na manjoj razini nego kod nepušača, iz čega se može zaključiti kako nepušačke kulture bolje reagiraju na nagle i stresne situacije. Također, CSE im je novi stimulans što izaziva jači metabolički odgovor i veću proliferaciju. Ovo se također očituje zbog

izoliranog utjecaja CSE-a na proliferaciju i razvoj kolonija koristeći se *in vitro* modelom, isključujući njegov utjecaj na stanični okoliš i ostale vrste s kojima su bakterije u kompeticiji. S druge strane, bakterije vrste A autohtone pušačima već su navikle na ovaj stimulans, što znači da su njihovi stresni i adapcijski mehanizmi već prilagođeni za optimalan rast uz kontinuiranu prisutnost duhanskog dima. Iz svega navedenog slijedi kako je CSE za vrstu A pozitivan modulator rasta, ali da jačina njegovog učinka ovisi o prethodnoj izloženosti duhanskom dimu. Ovo je potvrđeno brojnim istraživanjima u kojima se pokazalo da bakterije autohtone pušačima razvijaju adaptivne mehanizme koji ih čine manje osjetljivima na stimulativne učinke CSE-a, dok nepušačke kulture pokazuju veći metabolički i proliferacijski odgovor pri prvom izlaganju. Ovo potvrđuje ideju da je prethodna adaptacija na duhanski dim ključna za modulaciju rasta i metaboličkog odgovora (Kulkarni i sur., 2012; Wu i sur., 2019).

Zbog navedenih je razloga i druga pretpostavka ovog učeničkoga rada opovrgnuta. Iz zabilježenih rezultata jasno je kako na otpornost bakterija prema duhanskom dimu, osim inherentno različitih svojstava, utječu prijašnja kontinuirana izlaganja duhanskom dimu. Na određene bakterijske vrste akutna izloženost CSE-u različitih koncentracija nije imala utjecaj na razvoj kolonija, dok na drugu vrstu ima izuzetno pozitivan utjecaj. Razlika u prethodnoj izloženosti duhanskom dimu kod uzoraka obje vrste bakterija očituje se u smanjenom udjelu pokrivenosti Petrijeve zdjelice kod bakterija nađenih u mikrobiomu pušača te u smanjenom porastu udjela pokrivenosti zbog kroničnog bakterijskog stresa.

Kada se istovremeno promatraju rezultati oba dijela istraživanja, vidljivo je kako je sveukupni utjecaj izloženosti duhanskome dimu na brojnost bakterija negativan. To ne proizlazi iz njegovog negativnog učinka na same bakterijske kulture, već iz izuzetnog utjecaja na stanični okoliš promjenom pH-vrijednosti i viskoznosti sline, povećanim oksidativnim stresom te smanjenom dostupnosti kisika što dovodi do otežanog stvaranja biofilma i uspješne i funkcionalne kolonizacije usne šupljine pušača.

U istraživanju nije provedena statistička analiza rezultata, što ograničava njihovu pouzdanost. Povećanjem broja uzoraka uzgojenih bakterija u budućim istraživanjima omogućila bi se statistička obrada podataka, čime bi se dobili precizniji rezultati s većom stopom sigurnosti. Također, istraživanje bi moglo u budućnosti uključivati i brojne druge vrste prisutne u mikrobiomu pušača i nepušača. U ovome su istraživanju korištene samo one koje su u najbrojnije u mikrobiomu obje skupine. Za veću bioraznolikost mikrobioma, valjalo bi povećati uzorak ispitanika (i pušača i nepušača).

ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata ovog učeničkog istraživačkog projekta moguće je zaključiti sljedeće:

- oralni mikrobiomi pušača i nepušača ne razlikuju se znatno te uglavnom sadrže iste vrste bakterija, dok se njihove razlike očituju u različitoj brojnosti bakterijskih kolonija;
- povećanje koncentracija CSE-a pojačava i ubrzava proliferaciju vrste A, dok na proliferaciju vrste B ne utječe;
- proliferacija je intenzivnija kod bakterija nepušačkog mikrobioma zbog noviteta stimulansa;
- dugoročni utjecaj pušenja na vrstu bakterije A je negativan, što se očituje u ukupnoj količini njezinih kolonija u pušačkim kulturama zbog utjecaja dima na stanični okoliš, odnosno usnu šupljinu.

LITERATURA

Bhattarai K., Kafle S., Adhikari B., Tamang M., Raut R., Sah R., Baral S., Thapa C. 2025. Oral microbiome differences between smokers and non-smokers highlight a small unique cluster. Nepal Journal of Biotechnology 13(2): 168–175.

Dewhirst F. E., Chen T., Izard J., Paster B. J., Tanner A. C., Yu W. H., Lakshmanan A., Wade W. G. 2010. The human oral microbiome. Journal of Bacteriology 192(19): 5002–5017.

Gellner C. A., Reynaga D. D., Leslie F. M. 2016. Cigarette smoke extract: a preclinical model of tobacco dependence. Current Protocols in Neuroscience 77: 9.

Hutcherson J. A., Scott D. A., Bagaitkar J. 2015. Scratching the surface – tobacco-induced bacterial biofilms. Tobacco Induced Diseases 13(1): 1.

Kulkarni R., Antala S., Wang A., Amaral F. E., Rampersaud R., LaRussa S. J., Planet P. J., Ratner A. J. 2012. Cigarette smoke increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress. Infection and Immunity 80(11): 3804–3811.

Merriam-Webster. 2026. Mikrobiom. Rječnik Merriam-Webster.com, https://www.merriamwebster.com/dictionary/microbiome, pristupljeno 18.1.2026.

Rajasekaran J. J., Krishnamurthy H. K., Bosco J., Jayaraman V., Krishna K., Wang T., Bei K. 2024. Oral microbiome: a review of its impact on oral and systemic health. Microorganisms 12(9): 1797.

WHO. 2025. Tobacco trends report: 1 in 5 adults still addicted to tobacco, https://www.who.int/news/item/06-10-2025-who-tobacco-trends-report-1-in-5-adults-stilladdicted-to-tobacco, pristupljeno 18.1.2026.

Wu J., Peters B.A., Dominianni C., Zhang Y., Pei Z., Yang L., Ma Y., Purdue P.M., Jacobs E.J., 2019. The effect of smoking on caries-related microorganisms. Tobacco Induced Diseases 17: 32.