

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego



Adam Michcik

***Ocena zdolności do proliferacji i śmierci
komórek nabłonka jamy ustnej
u osób niepalących i palących tytoń***

ROZPRAWA DOKTORSKA

Praca wykonana w Zakładzie Embriologii Katedry Anatomii GUMed

Promotor: dr hab. Mirosława Cichorek

Gdańsk 2013

Pragnę szczególnie podziękować mojej Promotor
Pani dr hab. Mirosławie Cichorek za nieocenioną pomoc w trakcie prowadzonych
badań, cenne uwagi oraz nadzór merytoryczny podczas redagowania niniejszej pracy.

Serdeczne podziękowania dla Pana Prof. dr hab. n. med. Adama Włodarkiewicza za
okazywaną każdego dnia życzliwość i wyrozumiałość oraz sprawowaną opiekę w
trakcie rozwoju zawodowego.

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Kliniki Chirurgii Szcękowo – Twarzowej
i Stomatologicznej, Zakładu Embriologii Katedry Anatomii oraz Katedry i Zakładu
Patomorfologii GUMed za okazaną pomoc w trakcie powstawania pracy.

Rodzinie i Najbliższym dziękuję za wsparcie i zrozumienie.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	6
2. UZASADNIENIE I CEL PRACY	20
3. MATERIAŁ	22
3.1. Pobieranie materiału do badań.....	22
3.2. Charakterystyka pacjentów stanowiących badane grupy	23
4. METODY	24
4.1. Izolacja komórek nabłonka jamy ustnej.....	24
4.2. Ocena zróżnicowania morfologicznego izolowanych komórek nabłonka jamy ustnej	25
4.2.1. Parametr FSC (wielkość komórki) i SSC (ziarnistość komórki)	25
4.2.2. Obraz komórek w mikroskopie konfokalnym	26
4.3. Ocena cyklu komórkowego	26
4.4. Metody oceniające odsetek komórek ginących	26
4.4.1. Zmiany w strukturze błony komórkowej – eksternalizacja fosfatydyloseryny – jednoczesne barwienie aneksyną V oraz jodkiem propidyny.....	27
4.4.2. Aktywacja kaspaz – metoda FLICA.....	27
4.5. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	28
5. WYNIKI	29
5.1. Ocena cyklu komórkowego w komórkach nabłonka jamy ustnej.....	29
5.2. Ocena zróżnicowania komórek nabłonka	30
5.2.1. Ocena zróżnicowania komórek nabłonka jamy ustnej ze względu na parametry FSC i SSC.....	30
5.2.2. Ocena zawartości komórek z aktywnymi kaspazami wśród izolowanych komórek nabłonka jamy ustnej	33
5.2.3. Ocena zróżnicowania morfologicznego komórek nabłonka jamy ustnej w powiązaniu z eksternalizacją fosfatydyloseryny	40
5.3. Ocena zawartości komórek o cechach apoptotycznych	44
5.4. Ocena różnic pomiędzy grupą osób niepalących i grupą o średniej paczkolet 1,4	44
5.4.1. Ocena aktywności kaspaz.....	44
5.4.2. Ocena eksternalizacji fosfatydyloseryny.....	44

5.5. Ocena różnic pomiędzy grupą osób niepalących i grupą o średniej paczkolet 5.6	46
5.5.1. Ocena aktywności kaspaz.....	46
5.5.2. Ocena eksternalizacji fosfatydyloseryny.....	47
5.6. Ocena różnic pomiędzy grupą osób niepalących i grupą o średniej paczkolet 26,9 („kontrola pozytywna”)	47
5.6.1. Ocena aktywności kaspaz.....	48
5.6.2. Ocena eksternalizacji fosfatydyloseryny.....	49
5.6.3. Ocena komórek o obniżonej zawartości DNA	52
6. OMÓWIENIE WYNIKÓW	53
7. WNIOSKI.....	61
8. STRESZCZENIE.....	62
9. PIŚMIENNICTWO.....	64

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY

An+/PI+	komórki wiążące aneksynę i barwiące się jodkiem propidyny; komórki późnoapoptyczne/nekrotyczne.
An+/PI-	komórki wiążące aneksynę, ale nie barwiące się jodkiem propidyny komórki wczesnoapoptyczne.
FITC	izotiocyjanian fluoresceiny
FLICA	<i>Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases</i> ; metoda oceny aktywności kaspaz polegająca na wiązaniu się z centrum aktywnym kaspazy inhibitora połączonego z fluorochromem
FSC	parametr w cytometrii <i>forward scatter channel</i> służący do względnej oceny wielkości komórki
SSC	parametr w cytometrii <i>side scatter channel</i> służący do względnej oceny złożoności struktury wewnętrznej, np. obecność ziarnistości
G0/G1; S; G2/M-	fazy cyklu komórkowego subG0 komórki o obniżonej zawartości DNA.
K+/PI-	komórki wykazujące aktywność kaspaz, ale nie barwiące się jodkiem propidyny; komórki wczesnoapoptyczne.
K+/PI+	komórki wykazujące aktywność kaspaz i barwiące się jodkiem propidyny; komórki późnoapoptyczne/nekrotyczne.
K-/PI+	komórki nie wykazujące aktywności kaspaz i barwiące się jodkiem propidyny; komórki w finalnej fazie apoptozy.
paczkolata	wystandaryzowany wskaźnik intensywności palenia tytoniu; jeden paczkorok jest to wypalana codziennie jedna paczka papierosów (20 sztuk) przez rok
PI	jodek propidyny.
PS	fosfatydyloseryna.
VAD-FMK – FITC	znakowany FITC pan-inhibitor kaspaz.
CSE	cigarette smoke extract

1. WSTĘP

Palenie tytoniu jest problemem cywilizacyjnym o światowym zasięgu, liczbę palaczy tytoniu obecnie szacuje się na 1,3 biliona [94,100,126], z czego około 83% to ludność krajów rozwijających się [125]. Pomimo szerokiej wiedzy na temat szkodliwości dymu tytoniowego, badania przeprowadzone w Polsce w roku 2004 wykazały, że 35% osób powyżej 15. roku życia pali tytoń [58,134]. Dym tytoniowy w skali światowej jest najważniejszym czynnikiem powodującym choroby układu sercowo-naczyniowego [94,100,124,122], przewlekła ekspozycja wiąże się z trzykrotnie większym ryzykiem wystąpienia zawału mięśnia sercowego [100], a ryzyko rośnie proporcjonalnie do liczby wypalanych dziennie papierosów [125]. Należy zwrócić uwagę na długotrwałe utrzymujący się wpływ dymu tytoniowego na układ sercowo-naczyniowy; u osób, które nie palą od 20. i więcej lat ryzyko wystąpienia ostrego epizodu wieńcowego jest większe o 22% w stosunku do osób, które nigdy nie paliły tytoniu [125]. Badania epidemiologiczne wykazują, że 1/3 palaczy tytoniu umiera z powodu chorób serca oraz naczyń krwionośnych [72,100]. Naczynia krwionośne palaczy cechują się większą przepuszczalnością niż naczynia krwionośne osób niepalących tytoń, wynika to z dysfunkcji śródbłonna naczyń, aktywacji leukocytów oraz zaburzeń wydzielania tlenku azotu (NO) [97,120]. Zmienione naczynia krwionośne predysponują do powstawania udarów mózgu [30,37,42,48,58,111]. W badaniach *in vitro* wykazano, że nikotyna stymuluje komórki śródbłonna do uwalniania czynników sprzyjających neoangiogenezie np. VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyń), FGF (czynnik wzrostu fibroblastów), a regulacja tego procesu związana jest z uwalnianiem acetylocholin (ACh) [21,22]. Ekspozycja komórek na dym tytoniowy, jako źródło wolnych rodników prowadzi do peroksydacji lipidów. Utlenianie lipidów o niskiej gęstości (LDL), zwiększa ryzyko udaru [80]. Zmniejszona jest także skuteczność leczenia nadciśnienia tętniczego, odnotowywano także przypadki nadciśnienia złośliwego. Częstość występowania przewlekłej, obturacyjnej choroby płuc u osób palących także jest wyższa w stosunku do osób niepalących [50,116]. Etiologia astmy oskrzelowej również związana jest z paleniem tytoniu, a 35% osób chorujących stanowią palacze [47,97,120]. Statystycznie długość życia osób palących tytoń jest o 15 lat krótsza w stosunku do osób niepalących [27,59]. Działanie dymu tytoniowego oprócz zwiększonego ryzyka wystąpienia schorzeń ogólnoustrojowych, wiąże się także z ryzykiem kancerogenezy [58,136]. Wśród nowotworów, których patogenezę wiąże się z paleniem tytoniu, najlepiej poznany jest rak płuca, najczęstszy nowotwór w krajach

rozwinętych [27,58,59,76,132]. W Polsce notuje się około 20 000 nowych przypadków zachorowań rocznie i niemal taką samą liczbę zgonów z powodu raka płuca, a przeżywalność pięcioletnia wynosi zaledwie 15% [59,127]. Innymi nowotworami złośliwymi, których rozwój jest wynikiem ekspozycji na dym tytoniowy są między innymi: rak krtani, rak gardła (części nosowej gardła, części ustnej gardła oraz części krtaniowej gardła), a także rak jamy ustnej [2]. Należy jednak pamiętać, że wpływ szkodliwych składników dymu tytoniowego nie ogranicza się do opisanego działania ogólnoustrojowego. Dym tytoniowy składa się z ponad 4000 związków mających wpływ na ludzki organizm, z których kilkadziesiąt (około 60) ma udowodnione działanie rakotwórcze [83,93]. Dym tytoniowy pod względem fizycznym to heterogeny aerol, powstający wskutek niecałkowitego spalania tytoniu. W trakcie spalania cząsteczki ulegają pirolizie (rozkładowi pod wpływem temperatury), łącząc się ze sobą w procesie pirosyntezy [74]. Podczas wypalania jednego papierosa palacz wchłania ok. 500 mg dymu, z czego około 65% to azot i tlen, pozostałe 35% to substancje czynne biologicznie [75]. W zależności od sposobu oddziaływania składnika dymu tytoniowego na organizm, wyróżniamy substancje drażniące (tlenek siarki, amoniak, formaldehyd), substancje toksyczne (tlenek węgla, amoniak, tlenek azotu), substancje blokujące enzymy oddechowe (cyjanowodor, aldehyd octowy) oraz kancerogeny (etylometylonitrozoamina, hydrazyna, chlorek winylu, dwumetylonitrozoamina). [74]. Podczas palenia tytoniu, w bezpośrednim kontakcie ze szkodliwymi substancjami znajduje się wiele narządów, w tym głównie elementy układu oddechowego np. płuca, oskrzela. Jama ustna jest obszarem najmniej zbadanym, a przecież narażonym w równym stopniu z pozostałymi obszarami anatomicznymi mającymi kontakt z dymem tytoniowym.

Główne informacje o wpływie nikotyny, czy innych składników dymu tytoniowego dotyczą pneumocytów oraz komórek nabłonków wyściełających górne drogi oddechowe. Wpływ dymu tytoniowego na komórki pęcherzyków płucnych oraz komórki nabłonków wyściełających drogi oddechowe jest dobrze udokumentowany [95,112,119]. Szkodliwe substancje dymu tytoniowego mogą działać przez aktywne cząstki powstające podczas ich metabolizowania w komórkach błony śluzowej układu oddechowego lub wiązanie się z receptorami komórkowymi, co prowadzi do zaburzeń takich procesów jak: proliferacja, apoptoza czy różnicowanie [49]. Wśród palących tytoń, wyróżnić możemy osoby o zróżnicowanej wrażliwości na szkodliwe składniki dymu tytoniowego, co wiąże się z polimorfizmem genów związanych z naprawą DNA [140]. Działanie dymu tytoniowego na organizm obniża jego reakcje obronne i zwiększa m.in. ryzyko wystąpienia zakażeń dróg oddechowych, co może również sprzyjać rozwojowi zmian nowotworowych [136]. Należy jednak zaznaczyć, że

uszkodzenia DNA wywołane nikotyną powstają zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i nienabłonkowych [41]. W wyniku zmian wewnątrzkomórkowych może dojść do powstawania mutacji, które powstaną w przypadku niewydolności mechanizmów naprawczych a także blokowania ścieżek apoptozy. Badania genetyczne wykazały, że komórki nabłonka oddechowego poddane działaniu dymu tytoniowego wykazują odmienną ekspresję genów w porównaniu z komórkami nabłonka osób niepalących [95,119]. U palaczy nadekspresji ulegają geny, których produkty biorą udział w procesach unieszkodliwiania substancji toksycznych (np. gen dla transferazy glutationowej; GST1) związanych z metabolizmem ksenobiotyków (m.in. geny cytochromu P450: CYP1A1,CYP1B1; dehydrogenaza AKR1C1), stresem oksydacyjnym (gen dehydrogenazy aldehydowej ALDH3A1), a także adhezją komórek (gen antygeny rakowo płodowego CEACaM1) [18,92,119,137].

Ponadto, komórki nabłonków dróg oddechowych palaczy wykazują obniżoną ekspresję genów kodujących interleukiny np. IL-6, IL-8 oraz metaloproteazy np. MMP1 [119]. U osób palących w błonie śluzowej dróg oddechowych odnaleźć można tzw. pola kancerogenezy, umiejscowione najczęściej w okolicy rozwidleń dużych oskrzeli. Stanowią one miejsca potencjalnej metaplastji lub dysplastji nabłonka, a komórki tam znajdujące się wykazują zmiany w genach supresorowych i protoonkogenach np. p53, K-Ras [18,58,119] oraz innych np. kodujących mucyny – składniki śluzu [119]. Choć dokładne mechanizmy nikotynozależnych uszkodzeń DNA nie są w pełni poznane, stres oksydacyjny wydaje się odgrywać kluczową rolę. Teorię tą potwierdzono doświadczalnie, wykazując wywołanie przez nikotynę, stresu oksydacyjnego komórek przełyku szczura z udziałem nadtlenu wodoru [135]. Udowodniono, że nikotyna wiążąc się z receptorem nAChRs (acetylocholinergiczny receptor nikotynowy) komórek nabłonka dróg oddechowych, w istotny sposób modyfikuje proliferację i różnicowanie komórek zwiększając nasilenie tego procesu w warstwie podstawnej nabłonka [79]. W badaniach *in vitro* komórek nabłonka wyścielającego drogi oddechowe stwierdzono indukowaną nikotyną (jednym ze składników dymu tytoniowego) aktywację kinazy Akt [41,133]. Serynowo-treoninowa kinaza białkowa Akt odgrywa istotną rolę w regulacji procesów związanych z metabolizmem, proliferacją oraz przeżyciem komórek. [67,134]. Spośród wielu fosforylowanych przez tę kinazę białek są: proapoptyczne białko Bad, prokaspaza 9, kinaza Htra2/Omi (proteaza serynowa, odpowiada za proteolizę inhibitorów apoptozy IAP); czynniki transkrypcyjne rodziny FOXO, białko MDM2 (E3 ligaza ubikwitynowa), białko YAP (białko powiązane z białkiem YES, YES Associated Protein), a także czynnik indukujący apoptozę AIF (Apoptosis Inducing Factor) [66]. Fosforylacja tych czynników zwiększa szansę przeżycia komórki, m.in.

hamując proces apoptozy, co pośrednio może tłumaczyć zwiększoną aktywację kinazy Akt w wielu nowotworach człowieka [23].

Należy także zwrócić uwagę na wynik doświadczenia przeprowadzonego przez West i wsp., w którym oceniano fosforylację Akt w komórkach pobranych od chorych z rakiem płuc. Na 10 pobranych wycinków fosforylację Akt stwierdzono u 10 chorych [133].

Wykazano także doświadczalnie, że nikotyna promuje proliferację komórek – niedrobnokomórkowego raka płuc (NDRP) oraz stymuluje ekspresję fibronektyny. Fibronektyna jest glikoproteiną macierzy zewnątrzkomórkowej, która reguluje ważne procesy komórkowe, takie jak adhezja, proliferacja oraz różnicowanie [141].

I choć wiadomo, że przewlekła ekspozycja komórek na działanie nikotyny prowadzi do nieodwracalnych zmian, które mogą powodować zaburzenia podstawowych procesów zachodzących w komórce, to jednak powyższe wyniki pochodzą głównie z obserwacji linii komórkowych lub komórek nabłonka hodowanych *in vitro*, które poddawano działaniu ekstraktu nikotyny [1,44,54,102]. Sama hodowla, a więc utrzymywanie komórek w środowisku sztucznym może zaburzać homeostazę procesów wewnątrzkomórkowych. Trudno również porównać wpływ dymu tytoniowego *in vivo*, gdzie komórki mają kontakt z substancjami smolistymi najczęściej przez długi czas, z warunkami stworzonymi w czasie hodowli. W warunkach doświadczalnych podawane ekstrakty z substancji smolistych czy nikotyny, działają na komórki znacznie krócej. Niezwykle trudne jest także określenie ilości nikotyny jaką należałoby podać hodowanym komórkom, aby odpowiadała ona ilości na którą narażone są komórki w trakcie ekspozycji u palaczy [139]. Dyskusyjne jest także założenie, że komórki poddane w warunkach *in vitro* jednorazowemu działaniu ekstraktu z nikotyny zareagują w ten sam sposób jak komórki osób palących, które narażone są na działanie nikotyny i składników dymu tytoniowego wielokrotnie każdego dnia i często przez wiele lat.

Spośród wszystkich struktur anatomicznych, które poddane są ekspozycji podczas palenia tytoniu, jama ustna jest obszarem najslabiej zbadanym, a przecież to komórki nabłonka jamy ustnej jako pierwsze są narażone na niekorzystny wpływ substancji zawartych w dymie tytoniowym, natomiast o indukowanych paleniem tytoniu zmianach w tych komórkach wiadomo dotąd bardzo mało.

Nieliczne badania molekularne wskazują, iż w komórkach nabłonka jamy ustnej (policzek) dochodzi do zmiany ekspresji podobnego zestawu genów, jak w komórkach nabłonka oddechowego [18,119]. Wyłoniono około 40 genów których ekspresja ulegała zmianie zarówno w nabłonku oskrzeli, jam nosowych, jak i nabłonku jamy ustnej (policzek) u osób palących tytoń. Były to geny kodujące białka uczestniczące w procesie detoksykacji, regulujące cykl komórkowy i adhezję [18,119]. Oprócz tej

wspólnej grupy genów w każdym z badanych miejsc narażonych na działanie dymu tytoniowego występowały odmienne geny o zmienionej ekspresji np. gen MUC1 w komórkach nabłonka oddechowego ulegał nadekspresji, a w komórkach nabłonka jamy ustnej jego ekspresja była obniżona [119]. Inne prace wskazują, iż ekspresja genu białka p16, inhibitora kinaz zależnych od cyklu, ulega zmianie u osób palących [14,123].

Oprócz czynników środowiskowych takich jak styl życia, wykonywany zawód, ogólnoświatowy projekt o nazwie HUMN_{XL} (The Human Micronucleus Project on Exfoliated Buccal Cells), wykorzystujący biopsję złuszczeniową komórek nabłonka policzka, ocenił również wpływ palenia tytoniu na komórki nabłonka jamy ustnej [15]. Wykorzystany w tych badaniach materiał stanowiły komórki pobrane z warstw powierzchniowych nabłonka wielowarstwowego płaskiego policzka osób palących tytoń. Przebadano 5424 pacjentów, stwierdzając znaczący wzrost występowania mikronukleacji jądra komórkowego (rozpadu jądra na liczne drobne fragmenty) keratynocytów nabłonka jamy ustnej wśród badanej grupy palaczy w porównaniu do osób niepalących. Mikronukleacja jądra komórkowego uważana jest za biomarker ryzyka rozwoju raka [85]. Potwierdzeniem tych wyników są także prace innych autorów, wśród których odnaleźć można informacje na temat kondensacji chromatyny czy piknozy jądra komórkowego komórek nabłonka jamy ustnej pod wpływem palenia tytoniu [86].

Nieliczne prace porównujące morfologię nabłonka jamy ustnej palaczy oraz osób niepalących wskazują na wzrost grubości nabłonka oraz wzrost zawartości cytokeratyn w komórkach u osób palących [46,51,129]. Powszechnie wiadomo, iż nabłonki narażone na działanie niekorzystnych czynników chemicznych czy fizycznych, bronią się poprzez zwiększenie zawartości cytokeratyn [98,99]. Nieliczne obserwacje struktury komórek nabłonka jamy ustnej palaczy wykazują zmiany np. obniżenie zawartości desmogleiny 3 (białko biorące udział w adhezji komórek w nabłonku) i cytokeratyny 10 [29], czy zmniejszenie wielkości jądra komórkowego [108].

O prawidłowym funkcjonowaniu nabłonka jamy ustnej decyduje proliferacja komórek oraz ich różnicowanie w procesie keratynizacji, który jest procesem zaprogramowanej śmierci komórek. Znajdująca się w warstwie podstawnej pula komórek progenitorowych zawiera komórki o wysokim potencjale proliferacyjnym [71,96]. Wymiana komórek w nabłonku warunkuje utrzymanie prawidłowej homeostazy oraz umożliwia zachowanie właściwości izolacyjnych, które są niezbędne dla prawidłowego pełnienia funkcji przypisanych nabłonkowi jamy ustnej [117]. Zawarte w dostępnym piśmiennictwie dane na temat wpływu dymu tytoniowego na proliferację komórek nabłonka jamy ustnej są niejednoznaczne, a uzyskane wyniki często ze sobą

sprzeczne. W swoim doświadczeniu Schwartz i wsp. oceniając keratynocyty nabłonka jamy ustnej pozyskane metodą biopsji złuszczeniowej z policzków badanych osób (osoby niepalące i palące tytoń), stwierdził wzrost liczby komórek dzielących się wśród grupy palaczy w stosunku do komórek osób niepalących [108], natomiast Hwa-Jeong oceniając wpływ nikotyny na inkorporowane wirusem HPV keratynocyty nabłonka jamy ustnej stwierdził, hamowanie proliferacji keratynocytów pod wpływem nikotyny [54]. Reno i wsp. wykazali, iż nikotyna hamuje proliferację keratynocytów nabłonka jamy ustnej, a także zmniejsza tzw. boczną migrację – niezbędną do prawidłowego gojenia ran błony śluzowej, poprzez zmniejszenie ekspresji metaloproteaz takich jak: MMP-9 gelatynazyna B oraz MMP-28, a stopień hamowania ekspresji uzależniony był od podanego stężenia ekstraktu nikotyny hodowanym komórkom [102]. Metaloproteaza MMP-28 pojawia się już w keratynocytach warstwy podstawnej nabłonka. Nikotynozależne zwiększenie ekspresji MMP-28 związane jest z nasileniem różnicowania oraz spowolnieniem migracji tych komórek w kierunku powierzchniowych warstw nabłonka [102,104].

Ponadto, komórki nabłonka jamy ustnej osób palących posiadają zwiększoną zawartość filagryny – białka określanego jako marker różnicowania keratynocytów [44,54,102,103]. Podobnej obserwacji dokonali Grando i wsp. wykazując zwiększenie zawartości cytofilamentów w keratynocytach naskórka poddanych działaniu nikotyny (10 $\mu\text{mL/L}$), zwiększenie zawartości markerów różnicowania np. filagryny jak i lorykryny [44].

Badania innych autorów, wykazały także, iż ekspozycja na dym tytoniowy komórek nabłonka jamy ustnej szcztura prowadzi do aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych związanych z regulacją proliferacji (nasilenie proliferacji – nadekspresja czynników transkrypcyjnych: GATA-2, STAT-3) [7,109].

Liczne badania wskazują, iż nikotyna oddziałuje na komórki nabłonka jamy ustnej poprzez receptory acetylocholinylne nAChRs, których obecność stwierdzono w keratynocytach jamy ustnej [5,6,7,87]. Receptory nAChRs kontrolują homeostazę nabłonka między innymi poprzez wpływ na keratynizację i proliferację. Nikotyna jako agonista naturalnego ligandu (acetylocholinylne) wpływa na te procesy poprzez nAChRs [6,62]. Wyróżniamy kilka podtypów nikotynowego receptora acetylocholinylne m.in.: $\alpha 3(\beta 2/\beta 4)$, $\alpha 5$ a także $\alpha 7$. Spośród trzech rodzajów receptorów nAChRs, podtypy $\alpha 3$ oraz $\alpha 7$ związane głównie są z keratynocytami nabłonka jamy ustnej, przy czym podtyp $\alpha 7$ występuje tylko w keratynocytach w końcowej fazie różnicowania [102]. Aktywacja nAChRs wywołuje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia [8,99,105], które są ważnym regulatorem procesu różnicowania keratynocytów [40], a także reguluje poziom jonów sodu i potasu [21]. Ekspozycja na produkty nikotynowe

powoduje wzrost ekspresji $\alpha 3(\beta 2/\beta 4)\alpha 5$ oraz $\alpha 7$ podjednostek tej klasy receptorów w keratynocytach nabłonka jamy ustnej [5,7]. Zmiany podjednostki $\alpha 7$ indukowane nikotyną wiąże się z aktywacją szlaku Ras/Raf-1/MEK1/ERK prowadząc do nadekspresji STAT-3 jak także fosforylacji JAK-2. Nikotynezależna reakcja receptorów nAChR zależy od czasu i powtarzalności kontaktu komórki z nikotyną, a wzrost siły reakcji komórki wiązany jest ze zwiększającą się liczbą receptorów acetylocholiny. Mechanizm ten jednak nie jest do końca wyjaśniony [21]. Niektórzy autorzy podważają tę hipotezę sugerując, że wzrost liczby receptorów nAChRs wynika z procesów odpornościowych i reakcji prozapalnych organizmu, jako przykład podając nicienia *Caenorhabditis elegans*, u którego także odnotowuje się wzrost liczby komórkowych receptorów acetylocholiny przy braku kontaktu z nikotyną [24].

Zmiany podjednostek nAChR wiążą się ze zmianami zachodzącymi w funkcji komórki, co może zostać uznane za nową patofizjologiczną reakcję komórki na działanie nikotyny [6,21]. Zaznaczyć jednak należy, że doświadczenia prowadzone przez Arredondo i wsp. prowadzone były na hodowlach z komórek pozyskanych z dziąsła w czasie zabiegów periodontologicznych i dopiero w czasie hodowli poddawane były działaniu nikotyny (10 μ M) [5–7].

Dodatkowo wykazano, iż nikotyna wywołuje aktywację endogennego czynnika transkrypcyjnego FOXM1, może to wiązać się z utratą heterozygotyczności w chromosomie 13, co obserwowano w zmianach przednowotworowych błony śluzowej jamy ustnej, a także w przypadku raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Stwierdzenie to może wyjaśniać znacznie częstsze występowanie raka płaskonabłonkowego jamy ustnej u osób palących tytoń [21,39].

Komórki nabłonka jamy ustnej podlegają procesowi programowanej śmierci, który jest niezbędny do utrzymania homeostazy tego nabłonka.

O możliwym wpływie tytoniu na apoptozę komórek nabłonka jamy ustnej wiadomo bardzo niewiele, a poczynione obserwacje są zróżnicowane od braku zmian w poziomie apoptozy w nabłonku osób palących i niepalących [29] do wyników badań na zwierzętach wykazujących podwyższenie zawartości białka antyapoptycznego Bcl-2 [8]. Czynniki NF κ B, który pośredniczy w nikotynezależnym hamowaniu procesu apoptozy w komórkach raka płuca, w komórkach nabłonka jamy ustnej poddanych działaniu nikotyny także ulega nadekspresji [5].

Należy jednak zaznaczyć, że wszystkie dostępne w piśmiennictwie informacje na temat zmian w procesie apoptozy indukowanych składnikami dymu tytoniowego dotyczą keratynocytów hodowanych *in vitro* lub pochodzących od zwierząt doświadczalnych. Abhijit i wsp. w przeprowadzonej próbie oceny wpływu nikotyny na keratynocyty błony śluzowej jamy ustnej chomika, zauważyli, że ekstrakt z nikotyny

w niskim stężeniu indukował apoptozę, natomiast wyższe stężenie nikotyny powodowało hamowanie tego procesu [1].

Główny problem określenia wpływu nikotyny na apoptozę komórek nabłonka jamy ustnej wynika z faktu, iż palacze absorbują nikotynę często przez wiele lat, a takie warunki nie są możliwe do spełnienia w przypadku hodowli komórkowych.

Błona śluzowa jamy ustnej wysłana jest nabłonkiem wielowarstwowym płaskim, który w zależności od lokalizacji możemy podzielić na nabłonek rogowaciejący oraz nierogowaciejący [107,118]. Podniebienie twarde, wyrostek zębodołowy, trójkąt zatrzonowcowy są miejscami w jamie ustnej narażonymi na urazy, m.in. podczas żucia pokarmów, dlatego pokryte są nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym [117,118]. Nabłonek rogowaciejący stanowi ok. 25% powierzchni błony śluzowej jamy ustnej i cechuje się większą odpornością na urazy mechaniczne i chemiczne niż nabłonek nierogowaciejący, który stanowi 65% powierzchni błony śluzowej jamy ustnej. Grzbietowa powierzchnia języka pokryta nabłonkiem wyspecjalizowanym stanowi 15% błony śluzowej jamy ustnej [118]. Nabłonek rogowaciejący i nierogowaciejący różnią się budową, między innymi warstwy zewnętrznej. Komórki tej warstwy w nabłonku nierogowaciejącym są płaskie, przebudowują błonę komórkową, ale zachowują jądro i inne organella [19,118]. Natomiast komórki nabłonka rogowaciejącego stają się komórkami martwymi, tracą jądro i organelle, a ich heksagonalny kształt jest utrzymywany przez utworzoną pod błoną plazmatyczną tzw. kopertę rogową (cornified envelope) [19,117]. W wyniku tych zmian nabłonek staje się odporny na mechaniczne urazy, maleje jego przepuszczalność.

Oprócz keratynocytów, które stanowią około 90% komórek budujących nabłonek jamy ustnej, 10% stanowią inne komórki, wyróżniamy między innymi melanocyty, komórki Langerhansa, komórki Merkla. [10,11]. W nabłonku wielowarstwowym płaskim znajdują się także komórki układu odpornościowego, z których najliczniejsze są limfocyty. Większa liczba limfocytów zlokalizowana w nabłonku nierogowaciejącym związana jest z jego większą przepuszczalnością, co sprzyja wnikaniu patogenów [98]. Dendrytyczne komórki Langerhansa opuszczając szpik kostny drogą naczyń krwionośnych docierają do tkanek, gdzie pełnią funkcję komórek prezentujących antygeny [10]. W nabłonku jamy ustnej lokalizują się powyżej warstwy podstawnej. Zlokalizowane również w tej warstwie komórki Merkla odpowiedzialne są za odbieranie bodźców czuciowych. Komórki Merkla występują liczniej w nabłonku rogowaciejącym – bardziej narażonym na urazy, nabłonek nierogowaciejący zawiera mniej komórek czuciowych.

Zachowanie prawidłowej homeostazy nabłonka wymaga zrównoważonych procesów powstawania oraz eliminacji komórek. Pełny cykl odnowy tzn. wędrowki

komórek z warstwy rozrodczej do najbardziej powierzchniowej wynosi około 25 dni dla nabłonka nierogowaciejącego oraz około 55 dni dla nabłonka rogowaciejącego [32].

Kornifikacja, czyli proces terminalnego różnicowania keratynocytów, jest drogą programowanej śmierci komórki i mimo wspólnych cech z apoptozą, uważany jest za odrębny szlak fizjologicznej śmierci komórki [57,138].

Zasadnicza różnica dotyczy efektu apoptozy i kornifikacji. W apoptozie komórka rozpada się na ciała apoptotyczne, podczas gdy w kornifikacji komórka zachowuje swoją integralność. Różnice dotyczą również zmian zachodzących w jądrze i tak w apoptozie zachodzi kondensacja chromatyny i rozpad na charakterystyczne fragmenty (tzw. drabinka apoptyczna), a podczas kornifikacji jądro zanika na drodze niepoznanego jeszcze mechanizmu [138]. Obecnie uważa się, że zaprogramowana śmierć keratynocytów w czasie procesu rogowacenia jest niezależną od apoptozy drogą fizjologicznej śmierci komórek, ale zachodzącą z wykorzystaniem jej mechanizmów [117,121,143].

Sekwencja molekularnych zdarzeń zachodzących w czasie apoptozy zależy od rodzaju czynnika wywołującego śmierć oraz typu komórki. Do indukcji apoptozy dochodzi w wyniku aktywacji drogi receptorowej oraz mitochondrialnej [43]. W drodze zewnątrzpochodnej (receptorowej) następuje aktywacja receptorów błonowych z tzw. domenami śmierci (TNFR1, Fas, TRAILR1/R2) prowadząca do aktywacji prokaspazy 8, a następnie głównej kaspazy wykonawczej – prokaspazy 3, aktywującej dalsze czynniki zaangażowane w fazę samozniszczenia komórki [17,78]. Aktywacja kaspaz zaczyna się od rekrutacji receptora śmierci, co prowadzi do utworzenia aktywnego kompleksu DISC (Death Inducing Signaling Complex), w którym następuje aktywacja prokaspazy 8 [17,52].

Kaspaza 3 indukuje mechanizmy doprowadzające do proteolizy ważnych dla życia komórek białek m.in. polimerazy poli (ADP-rybozy) (PARP), białek cytoszkieletu oraz aktywacji endonukleazy tnącej DNA na fragmenty oligonukleosomalne [36,142].

W drodze wewnątrzpochodnej (mitochondrialnej) czynnik indukujący apoptozę pochodzi z wnętrza komórki (uszkodzenie DNA, wzrost stężenia reaktywnych form tlenu – ROS, stres oksydacyjny, zaburzenia transportu elektrolitów), a zasadniczą rolę odgrywają tu mitochondria [28,78,89,91]. Jedną z najwcześniejszych zmian w tych organellach jest spadek potencjału transbłonowego, po którym następuje uwolnienie z przestrzeni międzymbłonowej czynników prowadzących do aktywacji kaskady kaspaz, co w rezultacie prowadzi do śmierci komórki [78,91].

W wyniku opisanych zmian dochodzi do uwolnienia z mitochondrium około 40 białek m.in. cytochromu c, endonukleazy G, czynnika indukującego apoptozę (AIF). Cytochrom c w czasie apoptozy, wydostaje się z mitochondriów i wraz z czynnikiem

cytoplazmatycznym Apaf 1 tworzy apoptosom, który aktywuje prokaspazę 9 a ta aktywuje prokaspazę 3 [61,64,84,91,115]. Jedną z pierwszych morfologicznych zmian w komórce apoptycznej jest przemieszczenie fosfolipidu – fosfatydyloseryny (PS) z wewnętrznej warstwy do zewnętrznej warstwy dwuwarstwy lipidowej w błonie komórkowej [9]. Utrata asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów w błonie komórkowej prowadzi do zmian w oddziaływaniach komórka – komórka oraz komórka – białka wewnątrzkomórkowe [9,80]. Spośród wielu czynników regulujących rozmieszczenie fosfolipidów błonowych najważniejszym wydaje się być lipidowa translokaza aminokwasowa APT II. Czynniki utleniające modyfikują grupę SH translokazy i w ten sposób hamują jej aktywność [34]. W programowanej śmierci komórki drogą apoptozy regulatorami rozmieszczenia fosfatydyloseryny są: rodzina białek ABC (głównie białko ABCA1); jony wapnia, skramblazy [16,35,77], jednak według innych autorów udział tych białek w regulacji rozmieszczenia fosfatydyloseryny jest znikomy [114]. Eksternalizacja PS jest sygnałem do makrofagów typu „zjedz mnie” [12].

Ważnymi regulatorami procesu apoptozy są białka z rodziny Bcl-2, wśród których są zarówno białka hamujące apoptozę np. Bcl-2, Bcl-XL jak i promujące ten proces np. Bax, Bad, Puma, Noxa. Białka te poprzez regulację przepuszczalności błony mitochondrialnych wpływają na uwalnianie cytochromu c, AIF i innych czynników zgromadzonych w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [63,81,113].

Kornifikacja jako szczególny rodzaj śmierci fizjologicznej komórki jest złożonym procesem, w którym biorą udział różne czynniki m.in. transglutaminazy (TG1, TG3 TG5), lorykryna, involukryna, SPRR2 (Small Proline-Rich Proteins), białka z rodziny S100 (S100A7, S100A10; S100A11) oraz keratyny [7,65,77,139]. W wyniku tego procesu powstaje warstwa rogowa nabłonka, utworzona z korneocytów – terminalnie zróżnicowanych keratynocytów, martwych spłaszczonych komórek pozbawionych jądra komórkowego, zawierających tuż pod błoną komórkową duże ilości filamentów keratynowych tworzących kopertę rogową osadzonych w matrycy utworzonej przez filagrynę, pokrytych otoczką lipidową (m.in. zawierają ceramidy) [40].

Lorykryna jest białkiem bogatym w glicynę, serynę a także cysteinę, które występuje w dużych ilościach w komórkach warstwy rogowej, involukryna jest białkiem występującym tylko w dojrzałych keratynocytach [40,98]. W komórkach nabłonka nierogowaciejącego involukrynę i białka SPRR2 odnaleźć można w warstwach powierzchniowych nabłonka, natomiast lorykryna jest w tych komórkach nieobecna. Odmienne zawartość białek związanych z różnicowaniem komórek budujących poszczególne warstwy nabłonków podkreśla różnice strukturalne nabłonka rogowaciejącego i nierogowaciejącego [40]. Różnicowanie keratynocytów rozpoczyna

się migracją komórek ku powierzchniowym warstwom nabłonka. W wyniku tego procesu komórki ulegają szeregowi dalszych przemian, zastępując korneocyty, które uległy keratynizacji i zostały złuszczone.

Rozpoczęcie procesu keratynizacji komórki nabłonkowej nie jest do końca jasne. Wiadomo, że nie jest ono wyłącznie związane z oddalaniem się komórki od blaszki właściwej, w przypadku komórek nie mających możliwości migracji różnicowanie także występuje. Zapoczątkowanie procesu różnicowania zmniejsza właściwości adhezyjne komórek, co może powodować przyspieszenie tempa migracji w kierunku powierzchniowych warstw nabłonka [40,98].

Powyżej warstwy podstawnej nabłonka leżą komórki okrągłe oraz owalne tworzące warstwę kolczystą. Komórki te są większe oraz bardziej dojrzałe w porównaniu do komórek warstwy podstawnej. Charakterystyczne jest także występowanie innych typów cytokeratyn (CK). CK5 oraz CK14 związane są z komórkami warstwy podstawnej, aczkolwiek CK14 występuje również w warstwach powierzchniowych. Jako marker keratynocytów warstwy podstawnej oznaczana jest CK19. Cytokeratyny CK6 oraz CK16 występują w nabłonku cechującym się szybką wymianą komórek. Należy także stwierdzić, że w nabłonku nierogowaciejącym liczba CK jest mniejsza i inny jest ich zestaw w porównaniu z nabłonkiem rogowaciejącym; CK4 i CK13 występują w komórkach nabłonka nierogowaciejącego, zaś CK1 i CK10 w komórkach nabłonka rogowaciejącego [40,98,99] i związane są z końcową fazą keratynizacji [13]. W górnej części warstwy kolczystej pojawiają się małe, wewnątrzkomórkowe ziarnistości, bogate w fosfolipidy, w nabłonku rogowaciejącym zbudowane z równoległych blaszek. Liczba wewnątrzkomórkowych ziarnistości zwiększa się wraz z zaawansowaniem procesu keratynizacji, w komórkach warstwy ziarnistej pojawiają się wewnątrzkomórkowe ziarnistości keratohialinowe. Komórki nabłonkowe oddalając się od warstwy podstawnej stają się większe, bardziej płaskie, uboższe w organella komórkowe, a ich przestrzeń cytoplazmatyczna wypełnia się filamentami cytokeratyny. W początkowej fazie kornifikacji pojawia się białko – profilagryna, która w rezultacie przekształca się w komórkach warstwy zrogowaciejącej w filagrynę [25,67]. Filagryna jest białkiem wiążącym filamenty cytokeratyny w gęstą masę rogową. Występują liczne desmosomy, które wraz z bogatymi w tłuszcze ziarnistościami wewnątrzkomórkowymi zmniejszają przepuszczalność nabłonka, przyczyniając się do zmniejszenia utraty wody. Komórki docierające do warstwy zewnętrznej nabłonka rogowaciejącego są płaskie, mają heksagonalny kształt, brak jądra i innych organelli komórkowych, liczne włókna cytoszkieletu oraz wysokie stężenie jonów wapnia [67,118].

Połączenia międzykomórkowe tworzą korneodesmosomy –zmodyfikowane podczas różnicowania desmosomy [19,20]. Cechą charakterystyczną komórek warstwy rogowej jest ich ściśle przyleganie oraz zwiększona odporność na urazy mechaniczne [20,77,98,99].

Nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący jamy ustnej posiada grubszą warstwę rogową (wysokość do 20 komórek), niż w przypadku większości obszarów skóry (oprócz naskórka dłoni oraz stóp) [11]. Jednak procesy związane z kontrolowaniem proliferacji oraz dojrzewania keratynocytów nabłonka jamy ustnej nie są w pełni poznane. Wiele czynników takich jak: naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), transformujący czynnik wzrostu (TGF), czynnik wzrostu płytek krwi (PDGF), czynnik wzrostu keratynocytów (KGF), mogą kontrolować proliferację oraz różnicowanie keratynocytów.

Udział kaspaz związanych z apoptozą w procesie różnicowania keratynocytów nabłonka wielowarstwowego płaskiego jest kontrowersyjny [70,69,88]. Badania Lippens i wspł. wykazały, że aktywacja proapoptycznych kaspaz nie jest wymagana do indukcji procesu różnicowania keratynocytów nabłonka [73], inne publikacje zaś donoszą o udziale tych proteaz w procesie dojrzewania keratynocytów [138].

Ze względu na brak wyczerpujących informacji na temat procesu kornifikacji nabłonka jamy ustnej w dostępnym piśmiennictwie, odnieść należy się do wiadomości zawartych w publikacjach dotyczących procesu dojrzewania keratynocytów naskórka. Janes i wsp. wykazali w swoich doświadczeniach prowadzonych na hodowanych keratynocytach naskórka, wiele wspólnych cech obu procesów programowanej śmierci komórki: kornifikacji i apoptozy [55]. Już w początkowej fazie kornifikacji, zaraz po opuszczeniu przez keratynocyty warstwy podstawnej, stwierdzili obecność aktywnej kaspazy 8 oraz kaspazy 9, tak więc wydaje się, iż oba szlaki (zewnętrzny i wewnętrzny) apoptozy zaangażowane są także w procesie dojrzewania keratynocytów [55,128]. Szlak zewnątrzpochodny procesu apoptozy wydaje się odgrywać istotniejszą rolę w procesie keratynizacji komórek naskórka w porównaniu do szlaku wewnątrzpochodnego [55]. Poza aktywacją kaspaz, stwierdzono również w trakcie procesu kornifikacji keratynocytów naskórka inne elementy z mechanizmów uczestniczących w apoptozie np. spadek potencjału transbłonowego mitochondriów, uwalnianie cytochromu c do cytoplazmy keratynocyta [4,55,131]. Niektórzy autorzy obserwowali, iż dojrzewające keratynocyty nie wykazywały eksternalizacji fosfatydyloseryny (nie wiązały aneksyny) oraz wzrostu ilości reaktywnych form tlenu [55], co jest cechą charakterystyczną dla procesu apoptozy [77,90]. W badaniach Janes i wsp. zanotowali udział kaspazy 3 oraz kaspazy 14 w późnych fazach keratynizacji naskórka [55].

Kaspazy należą do rodziny proteaz cysteinowych, biorących udział zarówno w fazie początkowej, jak także wykonawczej apoptozy. Niektóre z nich zaangażowane są w procesy zapalne. Kaspazy występują w komórkach w postaci nieczynnych zymogenów – prokaspaz. Aktywacja tych enzymów może odbywać się w wyniku indukcji apoptozy z udziałem elementów szlaku zewnętrznego lub wewnętrznego [52]. W badaniach keratynocytów naskórka stwierdzono bezpośredni udział kaspazy 14 w procesie keratynizacji. W przeciwieństwie do kaspaz związanych z apoptozą, które ewolucyjnie występują już u organizmów niższych np. owadów oraz kręgowców kaspazę 14 stwierdzono tylko u naziemnych ssaków [26,69]. Przedmiotem dyskusji jest obecność kaspazy 14 w nabłonku jamy ustnej i jej rola w procesie różnicowania komórek tego nabłonka [69,88]. W naskórku kaspaza 14 ulega aktywacji tylko w różnicujących się keratynocytach, badania *in vitro* wykazały, że proliferujące keratynocyty mają nieaktywną kaspazę 14 [101]. Analiza ultrastrukturalna keratynocytów warstwy ziarnistej, wykazała związek kaspazy 14 z jądrem komórki, ziarnistościami keratohialinowymi, podczas gdy w korneocytach kaspaza 14 znajduje się w cytoplazmie i jest związana z korneodemomami oraz resztkami jądra, co może według niektórych autorów sugerować udział kaspazy 14 w procesie rozpadu jądra komórkowego w trakcie kornifikacji [33]. Aktywacja prokaspazy 14 odbywa się poprzez proteolityczne cięcie podjednostek dużej (20p) oraz małej (10p) [26] przez kaspazę 8 oraz kaspazę 10 [3,26]. Bezpośrednia rola kaspazy 14 w procesie kornifikacji polega na obróbce profilagryny umożliwieniu przekształcenia jej w filagrynę [26].

Proces programowanej śmierci komórek zachodzący w komórkach nabłonka jamy ustnej, mimo wielu przeprowadzonych badań, nie został jak do tej pory w pełni poznany. Przebieg procesu kornifikacji poznano głównie w keratynocytach naskórka. Pomimo oczywistych podobieństw między komórkami naskórka oraz komórkami nabłonka jamy ustnej, o biologii tych ostatnich, zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych, wiadomo znacznie mniej, a obserwacje poczynione na tych pierwszych nie mają tak oczywistego przełożenia na komórki nabłonka jamy ustnej [31].

Zdolności do proliferacji i śmierci komórek stanowią podstawowe procesy gwarantujące utrzymanie homeostazy struktury nabłonka. Efekty zaburzeń tej równowagi prowadzą do nieodwracalnych zmian w biologii samych komórek a w rezultacie mogą stać się podłożem dla procesu nowotworzenia.

Wiele nowotworów jamy ustnej, w tym głównie rak płaskonabłonkowy, uważane są jako nikotynozależne. Większość chorych to nałogowi palacze, brak jednak bezpośrednich dowodów uzyskanych na materiale ludzkim w jaki sposób, krok po kroku nikotyna i inne składowe dymu tytoniowego przyczyniają się do rozwoju procesu

nowotworowego w obrębie jamy ustnej. Z tego powodu poznanie wpływu dymu tytoniowego na komórki nabłonka jamy ustnej może pozwolić na lepsze zrozumienie inicjacji procesów patologicznych takich jak powstawanie leukoplakii czy nowotworów.

2. UZASADNIENIE I CEL PRACY

Wyniki doświadczeń różnych autorów sygnalizują, iż palenie tytoniu wpływa na procesy biologiczne komórek nabłonka jamy ustnej, jednak zachodzące pod wpływem składników dymu tytoniowego mechanizmy prowadzące do zaburzenia homeostazy nabłonka jamy ustnej nie zostały jak do tej pory w pełni poznane. Główne obserwacje o wpływie dymu tytoniowego dotyczą komórek oskrzeli i płuc.

Dane dotyczące wpływu dymu tytoniowego na proliferację keratynocytów nabłonka jamy ustnej są fragmentaryczne, a także często opisywane na podstawie analizy mało licznych grup osób palących tytoń. Natomiast drogi fizjologicznej śmierci keratynocytów, odpowiadające za prawidłową wymianę komórek w nabłonku opisywane są ogólnie, bez wnikania w poszczególne fazy tych procesów. Opisywane przez innych autorów indukowane paleniem tytoniu zmiany w procesie apoptozy keratynocytów nabłonka jamy ustnej są niejednoznaczne. Większość informacji o wpływie tytoniu na komórki nabłonka jamy ustnej pochodzi z doświadczeń, w których hodowane komórki nabłonka jamy ustnej poddaje się w warunkach *in vitro* działaniu składników dymu tytoniowego, w tym i nikotyny. Nieliczne prace oparte są na materiale pobranym bezpośrednio od osób palących tytoń. Zaznaczyć jednak należy, iż w takim przypadku komórki pozyskiwane były głównie metodą biopsji złuszczeniowej, a więc oceniane keratynocyty pochodziły wyłącznie z powierzchniowych warstw nabłonka.

Na temat wpływu dymu tytoniowego na proces fizjologicznej śmierci keratynocytów nabłonka jamy ustnej wiadomo bardzo niewiele, z tego powodu również istotne wydaje się określenie wpływu palenia tytoniu na ten proces. Niezbędną dla utrzymania homeostazy nabłonka jest fizjologiczna śmierć komórek, dzięki której m.in. tworzy się warstwa ochronna na powierzchni nabłonka jamy ustnej zbudowana z martwych komórek, korneocytów.

Przebieg tego procesu oraz ewentualne zmiany indukowane paleniem tytoniu mają kluczowe znaczenie dla funkcjonowania nabłonka. Ponieważ proces keratynizacji komórek nabłonka jamy ustnej przebiega z wykorzystaniem mechanizmów apoptozy, dlatego celowa wydaje się ocena parametrów tego procesu. Natomiast jama ustna, choć jest pierwszym miejscem kontaktu organizmu z dymem tytoniowym, jest najmniej zbadana.

W związku z niejednoznacznymi informacjami na temat wpływu palenia tytoniu na komórki nabłonka jamy ustnej, zbadanie keratynocytów pobranych bezpośrednio od palaczy oraz porównanie tych wyników z grupą osób niepalących mogłoby dostarczyć

istotnych informacji o wpływie palenia tytoniu na biologię nabłonka jamy ustnej. Jak do tej pory nie określono markerów, które by odzwierciedlały zmiany w biologii keratynocytów nabłonka jamy ustnej pod wpływem palenia tytoniu, przed wystąpieniem klinicznych zmian.

W związku z bardzo fragmentaryczną wiedzą o wpływie tytoniu na jamę ustną, zaplanowano przeprowadzenie oznaczeń umożliwiających porównanie zasadniczych procesów z biologii keratynocytów pobranych od osób niepalących i palących tytoń poprzez:

1. ocenę zawartości komórek nabłonka jamy ustnej będących w poszczególnych fazach cyklu komórkowego
2. analizę zróżnicowania morfologicznego keratynocytów przy pomocy parametrów cytometrycznych oceniających wielkość (FSC) i ziarnistość (SSC)
3. analizę wybranych parametrów procesu apoptozy, takich jak aktywność kaspaz oraz stopień eksternalizacji fosfatydyloseryny.

Wyniki z przedstawionych założeń badawczych być może pozwolą odpowiedzieć na pytanie: **czy i w jakim stopniu palenie tytoniu wpływa na proliferację i śmierć komórek nabłonka jamy ustnej, podstawowe procesy decydujące o prawidłowej biologii tego nabłonka.**

3. MATERIAŁ

3.1. POBIERANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

Materiał do badań stanowiły komórki nabłonka jamy ustnej pozyskiwane od osób hospitalizowanych oraz leczonych ambulatoryjnie w Katedrze i Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej i Stomatologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Przychodni Chirurgii Stomatologicznej Uniwersyteckiego Centrum Stomatologicznego GUMed.

Badaniem objęte zostały osoby w wieku od 18. do 40.lat. W trakcie pozyskiwania materiału wyłoniono dodatkową grupę czterech osób intensywnie palących tytoń w przedziale wiekowym od 40. do 61.lat i określono ją jako kontrolę pozytywną wpływu intensywności palenia. Wszyscy pacjenci przed przystąpieniem do projektu wypełniali szczegółową ankietę. Formularz zawierał pytania na temat: aktualnego stanu zdrowia pacjenta, przyjmowanych leków, palenia tytoniu (określenie liczby wypalanych papierosów dziennie a także liczby lat trwania nałogu, palenia w przeszłości). Oprócz osób ogólnie obciążonych, przewlekłe przyjmujących leki, ankietę eliminowała również pacjentów spożywających alkohol w ciągu ostatnich 3. dni przed pobraniem wycinka, w związku z możliwością toksycznego wpływu alkoholu o wysokim stężeniu na nabłonek jamy ustnej. Wszyscy pacjenci przed planowanym pobraniem materiału byli badani klinicznie. Wszelkie zmiany patologiczne w obrębie błony śluzowej jamy ustnej, a także objawy stanu zapalnego, eliminowały chorych z projektu.

Tak więc pozyskane komórki pochodziły wyłącznie od osób ogólnie zdrowych, z makroskopowo niezmienną błoną śluzową.

Izolowane komórki nabłonka jamy ustnej, keratynocyty, otrzymywano ze skrawków błony śluzowej, której nadmiary rutynowo były usuwane podczas zabiegów chirurgicznych, w szczególności podczas zabiegów dłutowania zatrzymanych trzecich zębów trzonowych dolnych. Pozyskany materiał umieszczano w schłodzonym medium (PBS z zestawem antybiotyków: 100 jednostek/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny, 2µg/ml klindamycyny, 50µg/ml nystatyny) i natychmiast poddawano dalszej obróbce.

Zebrany materiał pochodzi od 77 pacjentów.

3.2. CHARAKTERYSTYKA PACJENTÓW STANOWIĄCYCH BADANE GRUPY

W badanej grupie 77. osób wyodrębniono 40. pacjentów niepalących (średnia wieku $27 \pm 6,4$ lat) oraz 33. pacjentów palących tytoń (średnia wieku $26 \pm 4,7$ lat). Grupę palących podzielono na dwie podgrupy pod względem intensywności palenia wyrażonej jako liczba paczkolet (Tab.1). Paczkoleta stanowią międzynarodowy wskaźnik intensywności palenia tytoniu. Wielkość ta, obliczana jest w następujący sposób: jeden paczkorok jest to wypalana codziennie jedna paczka papierosów (20 sztuk) przez rok [56]. Z całej grupy palaczy obliczono średnią paczkolet, która wyniosła $3,0 (\pm 2,6)$. Średnia ta pozwoliła na podzielenie grupy palaczy na: 20 osób z wartościami paczkolet równymi i poniżej $3,0$ [średnia paczkolet dla tej grupy $1,4 (\pm 1,0)$]; oraz 13 pacjentów ze średnią paczkolet powyżej $3,0$ [średnia paczkolet dla tej grupy $5,6 (\pm 2,1)$]. W materiale wyodrębniono czterosobową grupę palaczy o średniej liczbie paczkolet wynoszącej $26,9 (\pm 15,7)$. Osoby te ze względu na wyższą średnią wieku nie zostały włączone do analizy podstawowej, ale w dalszej ocenie wyników posłużyły jako kontrola pozytywna dla podkreślenia różnic między badanymi grupami.

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów biorących udział w doświadczeniu z podziałem na grupy pod względem intensywności palenia (paczkoleta) i wieku. Wartości to średnie arytmetyczne \pm OS.

Grupa	Paczkoleta	Wiek (lata)	Liczba Pacjentów
1	0	$27 \pm 6,4$	40
2	$1,4 \pm 1,0$	$25 \pm 5,1$	20
3	$5,6 \pm 2,1$	$27 \pm 4,2$	13
4	$26,9 \pm 15,7$	$51 \pm 9,5$	4

4. METODY

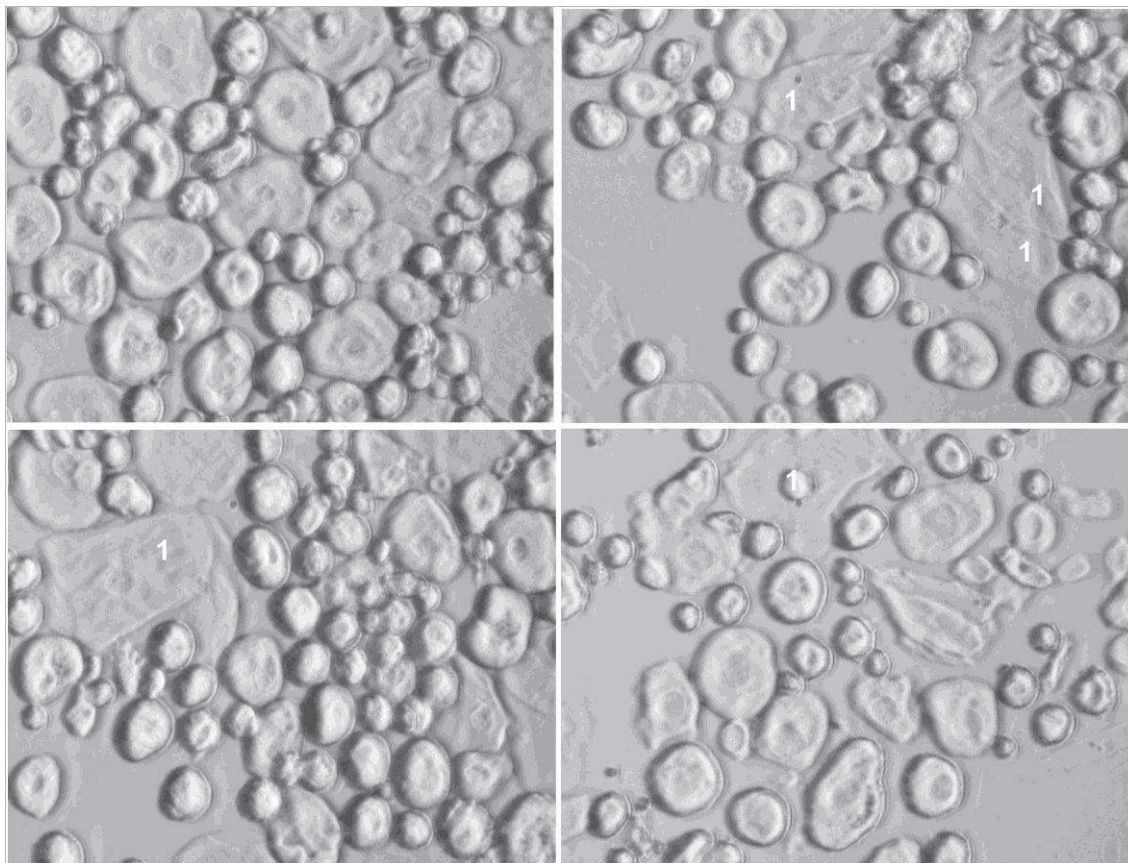
Odczyty wyników testów oceniających procesy biologiczne (śmierć komórek, proliferację) z wykorzystaniem przeciwciał sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi zostały wykonywane z wykorzystaniem cytometru przepływowego FAC Calibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA) w Katedrze i Zakładzie Fizjopatologii GUMed.

4.1. IZOLACJA KOMÓREK NABŁONKA JAMY USTNEJ

Fragmenty błony śluzowej umieszczano w roztworze dyspazy o stężeniu 5 mg/ml (*GIBCO*); po całonocnej inkubacji w 4°C oddzielony mechanicznie nabłonek od warstwy podnabłonkowej umieszczano w roztworze 0,25% trypsyny z EDTA (*SIGMA-ALDRICH*) na 30 minut w temperaturze 37°C [31]. Po tym czasie neutralizowano enzym poprzez dodanie medium DMEM z 10% surowicą bydlęcą (*SIGMA-ALDRICH*, *GIBCO*). Następnie komórki płukano dwukrotnie w roztworze PBS. Otrzymana w ten sposób zawiesina pojedynczych komórek stanowiła materiał do dalszych badań. Z fragmentu błony śluzowej od jednego pacjenta uzyskiwano od $0,6 \times 10^6$ do $1,2 \times 10^6$ komórek nabłonka o żywotności powyżej 80% ocenianej błękitem trypanu.

W celu oceny zawartości keratynocytów, izolowane komórki znakowano mieszaniną przeciwciał monoklonalnych wykrywających większość ludzkich cytokeratyn nabłonków [anti human cytokeratin clone AE1/AE3 (*DAKO*)]; oznaczenia wykonano w Zakładzie Patomorfologii GUMed. To badanie immunohistochemiczne wykazało, iż w pozyskiwanym materiale około 97% komórek stanowiły keratynocyty.

Rycina 1 ilustruje morfologiczne zróżnicowanie pozyskiwanych komórek nabłonka jamy ustnej.



Rycina 1. Zróżnicowana morfologia komórek nabłonka jamy ustnej po izolacji widziana w mikroskopie świetlnym w kontraście Hoffmana. Numerem 1 oznaczono komórki duże, płaskie z warstw górnych nabłonka. Mikroskop NIKON TS-100F (powiększenie 200×); Katedra i Zakład Fizjopatologii GUMed.

4.2. OCENA ZRÓŻNICOWANIA MORFOLOGICZNEGO IZOLOWANYCH KOMÓREK NABŁONKA JAMY USTNEJ

4.2.1. Parametr FSC (wielkość komórki) i SSC (ziarnistość komórki)

Wykorzystanie metody cytometrii przepływowej, umożliwiło analizę parametrów morfometrycznych takich jak FSC (Farward Side Channel; sygnał rozproszenia światła laserowego do przodu) – względna wielkość komórki, oraz SSC (Scatt Side Channel; sygnał rozproszenia bocznego światła laserowego) – złożoność struktury wewnętrznej, np. obecność ziarnistości, co pozwala na ocenę morfologicznego zróżnicowania badanych komórek.

Przeprowadzona w ten sposób ocena umożliwiła porównanie wielkości oraz stopnia dojrzałości komórek wszystkich badanych pacjentów. Dodatkowo oceniano stopień aktywacji kaspaz w odniesieniu do wielkości i ziarnistości komórek, co pozwoliło na stwierdzenie, czy aktywność tych proteaz zmienia się wraz ze zmianą

wielkości komórki i ilości wewnątrzkomórkowych ziarnistości, a więc wraz z procesem dojrzewania keratynocytów.

4.2.2. Obraz komórek w mikroskopie konfokalnym

Izolowane komórki po odpowiednich barwieniach analizowano przy pomocy systemu mikroskopii konfokalnej (Nikon, Japonia) i programów: Laser Sharp 2000 i Laser Pix V. 4. 001 (BioRad, GB) w Katedrze Anatomii GUMed.

4.3. OCENA CYKLU KOMÓRKOWEGO

Ocena cytometryczna utrwalonych komórek, barwionych jodkiem propidyny (PI) (dawka PI wiążąca się z DNA), pozwala na oznaczenie zawartości DNA i określenie odsetka komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego: G0/G1, S i G2/M. Metoda ta określa również odsetek komórek o obniżonej zawartości DNA (m.in. komórki apoptyczne będące w fazie rozpadu na ciała apoptyczne), lokalizujące się w obszarze sub G0/G1. Izolowane keratynocyty nabłonka jamy ustnej zawieszano w PBS, następnie utrwalano przez minimum 24 godz. w temperaturze -20°C w 70% alkoholu etylowym. Po odpłukaniu alkoholu etylowego roztworem PBS, komórki zawieszano w 1 ml roztworu barwiącego (RNaza A 100 µg/ml, PI 40µg/ml w PBS), inkubowano przez 30 minut w 37°C w ciemności. Następnie przy pomocy cytometrii przepływowej oceniano zawartość DNA oraz odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu. Dane z 20000 komórek w każdym doświadczeniu analizowano przy pomocy programu Cyflogic 1.2.1 (CyFloLtd.).

4.4. METODY OCENIAJĄCE ODSETEK KOMÓREK GINĄCYCH

Ze względu na złożony mechanizm śmierci komórki, w tym apoptozy, i różnorodne drogi jej przebiegu Komitet ds. Nomenklatury Śmierci Komórki (Nomenclature Committee on Cell Death) proponuje, aby przy ocenie tego procesu wybierać kilka testów obrazujących różne parametry apoptozy i szczegółowo je nazywać opisując wyniki. Jest to niezmiernie ważne, aby móc porównywać wyniki poszczególnych prac dotyczących śmierci komórek. Proces dojrzewania komórek nabłonka jamy ustnej prowadzi do fizjologicznej śmierci komórek, przebiegającej z wykorzystaniem mechanizmów apoptozy – głównej drogi fizjologicznej śmierci komórek. W związku z powyższym w obecnej pracy, aby określić odsetek komórek ginących drogą apoptozy wybrano ocenę zmian w strukturze błony komórkowej polegającą na przemieszczeniu

fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej (tzw. eksternalizacja PS) oraz aktywację kaspaz, proteaz szczególnie zaangażowanych w tę drogę śmierci komórek.

4.4.1. Zmiany w strukturze błony komórkowej – eksternalizacja fosfatydyloseryn – jednoczesne barwienie aneksyną V oraz jodkiem propidyny

Jedną z wczesnych zmian w komórce podczas procesu apoptozy jest przemieszczenie fosfatydyloseryny (PS) z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej błony komórkowej (tzw. eksternalizacja fosfatydyloseryny).

Obecność fosfatydyloseryny w błonie komórkowej wykrywana jest dzięki aneksynie V swoiście wiążącej się z PS. Zastosowanie jednoczesnego barwienia aneksyną V sprzężoną z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) i jodkiem propidyny PI (wiążę się z DNA) pozwala na wykrycie komórek z uszkodzoną błoną komórkową (*Annexin-V-FLUOS*, *ROCHE*). Komórki w liczbie 200×10^3 inkubowano 20 min w 50 μ l roztworu aneksyny V-FITC w buforze z PI w temperaturze pokojowej. Roztwór barwiący przygotowano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta.

Metoda ta pozwala wyróżnić następujące populacje komórek:

- nie wiążące aneksyny i nie wiążące PI (An-/PI-); komórki uznawane za komórki żywe
- wiążące aneksynę i nie wiążące PI (An +/PI-); komórki wczesnoapoptyczne
- wiążące aneksynę i wiążące PI (An+/PI+); komórki te przyjmowane są za komórki późnoapoptyczne/nekrotyczne.

Ocena stopnia wiązania aneksyny V-FITC wykonana została metodą cytometrii przepływowej. Dane z 10000-20000 komórek w każdym doświadczeniu analizowano przy pomocy programu Cyflogic 1.2.1 (CyFlo Ltd.).

4.4.2. Aktywacja kaspaz – metoda FLICA

Do oceny zawartości komórek z aktywnymi kaspazami zastosowany został test FLICA (Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspase) z wykorzystaniem znakowanego fluorochromem inhibitora kaspaz/y swoiście wiążącego się z centrum aktywnym enzymu. W wykonywanych badaniach zastosowany został znakowany FITC pan-inhibitor VAD-FMK, który wykrywa większość zaktywowanych kaspaz. Jednoczesne barwienie komórek FITC-VAD-FMK i PI pozwoliło na wyróżnienie komórek:

- wczesnoapoptycznych (kaspazo+/PI-; zaktywowane kaspazy przy nie uszkodzonej błonie komórkowej)
- późnoapoptycznych (kaspazo+/PI+; zaktywowane kaspazy oraz uszkodzenia w błonie komórkowej pozwalające na wnikanie PI do komórki)
- w finalnej fazie apoptozy (kaspazo-/PI+; komórki barwią się PI, ale nie wykazują już aktywności kaspaz)

Wyróżnienie wyżej wspomnianych komórek znajdujących się na różnych etapach apoptozy pozwala prześledzić przebieg procesu apoptozy.

Komórki w liczbie 200×10^3 inkubowano z 5 μ M FITC-VAD-FMK (caspACE™-FITC-VAD-FMK, PROMEGA PROBES) w 100 μ l przez 30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej, po odpłukaniu, umieszczano w PBS z PI o stężeniu 25 μ g/ml, a stopień natężenia fluorescencji oceniano metodą cytometrii przepływowej.

Dane z 10000-20000 komórek w każdym doświadczeniu analizowano przy pomocy programu Cyflogic 1.2.1 (CyFloItd.).

4.5. OCENA STATYSTYCZNA UZYSKANYCH WYNIKÓW

Analiza statystyczna wykonana została za pomocą programu STATISTICA 10 (StatSoft, Inc.). Dane w tabelach przedstawione zostały w postaci średnich arytmetycznych \pm odchylenie standardowe (OS). Zgodność rozkładu danych dla oznaczeń sprawdzono testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Levene'a. Analiza znamienności różnic między badanymi grupami przeprowadzona została nieparametrycznymi testami ANOVA Kruskal'a Wallis'a i testem Dunn'a; za różnice statystycznie znamienne przyjęto wartość $p \leq 0,05$.

5. WYNIKI

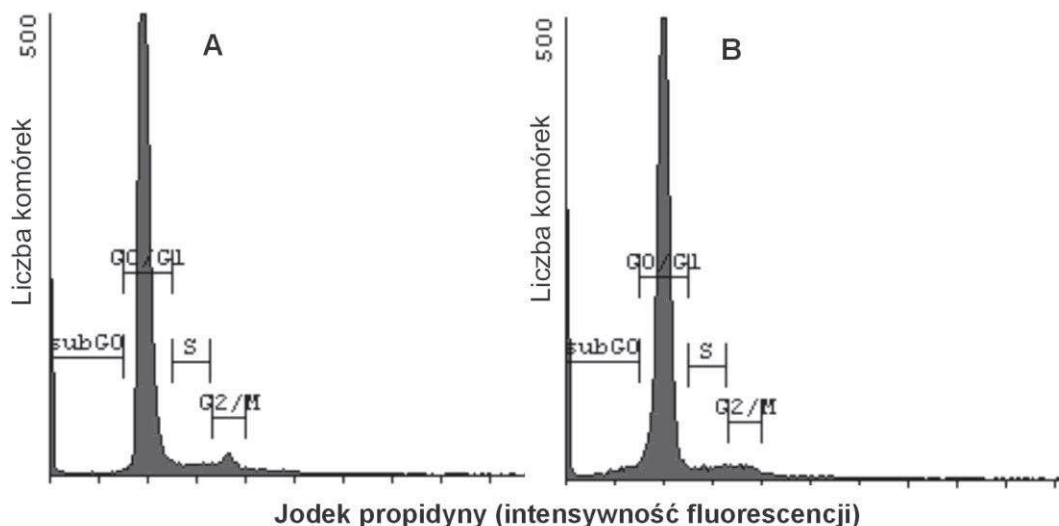
5.1. OCENA CYKLU KOMÓRKOWEGO W KOMÓRKACH NABŁONKA JAMY USTNEJ

Analiza cyklu komórkowego komórek nabłonka jamy ustnej osób niepalących wykazała, iż odsetek komórek w fazie S wyniósł 7,1%; w fazie G2/M 4,3%; a w fazie G0/G1 82,1%, zaś dla osób palących średnio 5,6 paczkolet odsetek komórek w fazie S wyniósł 8,5%, w fazie G2/M 3,4% oraz w fazie G0/G1 78,7% [Ryc. 2, Tab.2].

Analiza odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu pomiędzy badanymi grupami nie wykazała statystycznie znamiennych różnic.

Tabela 2. Analiza zawartości komórek nabłonka jamy ustnej w G0/G1, S, G2/M fazach cyklu komórkowego. Przedstawione w tabeli wartości są średnimi arytmetycznymi \pm OS

Odsetek komórek w fazie cyklu komórkowego	Liczba paczkolet		
	0	1,4	5,6
G0/G1	82,1 \pm 5,0	83,0 \pm 4	78,7 \pm 7,0
S	7,1 \pm 2,2	7,6 \pm 2,1	8,5 \pm 2,9
G2/M	4,3 \pm 1,7	3,8 \pm 1,0	3,4 \pm 1,5
Łącznie S/G2/M	11,4 \pm 3,1	11,4 \pm 2,5	12,0 \pm 4,0



Rycina 2. Przykładowe histogramy oznaczeń cytometrycznych ilości DNA w celu określenia zawartości komórek nabłonka jamy ustnej w poszczególnych fazach cyklu komórkowego u osoby niepalącej (A) oraz palącej (B, liczba paczkołat 3.5). Komórki w sub G0 wykazują obniżoną zawartość DNA (np. fragmentacja DNA w wyniku śmierci komórek).

5.2. OCENA ZRÓŻNICOWANIA KOMÓREK NABŁONKA

5.2.1. Ocena zróżnicowania komórek nabłonka jamy ustnej ze względu na parametry FSC i SSC

Cytometria przepływowa pozwala na względną ocenę wielkości (parametr FSC) i wewnętrznego zróżnicowania komórki tzw. ziarnistości (parametr SSC). Wykorzystując tą możliwość, w badanym materiale wyodrębniono trzy populacje komórek różniące się wielkością (FSC) i ziarnistością (SSC), co odzwierciedla zróżnicowanie komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego błonę śluzową jamy ustnej. Wyniki tej analizy przedstawia Tab.3 i ilustruje Ryc. 3 A. Wartości FSC i SSC przedstawiane są w jednostkach umownych fluorescencji.

Parametry FSC i SSC komórek pochodzących od osób niepalących tytoniu uznano za charakteryzujące morfologię wyróżnionych trzech populacji komórek:

- Populacja 1 to komórki małe, o niskiej ziarnistości; średnie wartości FSC i SSC wynosiły odpowiednio 225 (± 24), 110 (± 18). Komórki te stanowiły ok. 12% wśród izolowanych keratynocytów.

- Populacja 2 to komórki o większym zakresie wielkości i dużej ziarnistości; średnie wartości FSC i SSC wynosiły odpowiednio 435 (± 47), 918 (± 150). Komórki te stanowiły ok. 31% wśród izolowanych keratynocytów.
- Populacja 3 to komórki o największym zakresie wielkości ale nieco niższej ziarnistości niż grupa 2; średnie wartości FSC i SSC wynosiły odpowiednio 684 (± 59), 585 (± 87). Komórki te stanowiły ok. 33% wśród izolowanych keratynocytów.

Podane powyżej wartości FSC (wielkość komórek) i SSC (zróżnicowanie wnętrza komórki, ocena ziarnistości) dotyczą materiału pochodzącego od osób niepalących, ale dla pozostałych grup badanych były one zbliżone. Jak wykazały obecne badania, palenie tytoniu nie wpływało w istotny sposób ani na odsetek wymienionych populacji, ani na wielkość i ziarnistość komórek je tworzących.

Tabela 3. Zróżnicowanie komórek nabłonka jamy ustnej ze względu na parametry FSC (wielkość) i SSC (wewnętrzne zróżnicowanie tzw. ziarnistość). Przedstawione w tabeli wartości są średnimi arytmetycznymi \pm OS

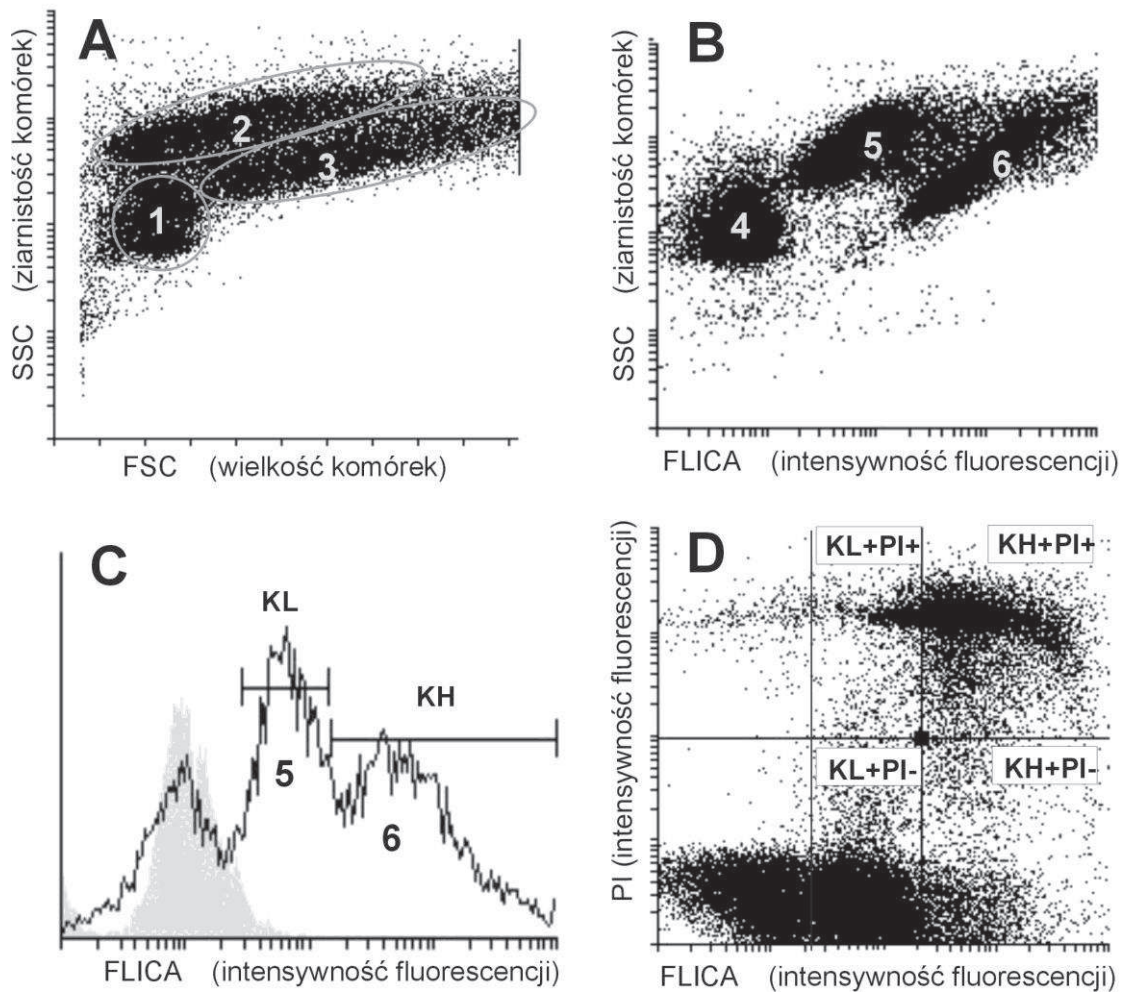
		Komórki nabłonka jamy ustnej												
Średnia liczba paczkołat	Populacja 1						Populacja 2						Populacja 3	
	%	średnia wartość fluorescencji		%	średnia wartość fluorescencji		%	średnia wartość fluorescencji		%	średnia wartość fluorescencji			
		FSC	SSC		FSC	SSC		FSC	SSC					
0	11,8 \pm 5,0	225 \pm 24	110 \pm 18	30,9 \pm 8,6	435 \pm 47	918 \pm 150	32,9 \pm 6,1	684 \pm 59	585 \pm 87					
1,4	11,7 \pm 7,7	232 \pm 14	121 \pm 18	35,1 \pm 8,6	431 \pm 37	950 \pm 101	31,8 \pm 8,8	684 \pm 27	595 \pm 63					
5,6	19,1 \pm 13,7	228 \pm 5	114 \pm 11	27,0 \pm 7,0	443 \pm 37	944 \pm 92	32,2 \pm 8,5	691 \pm 32	590 \pm 57					
26,9	19,4 \pm 10,5	229 \pm 6	116 \pm 9	36,3 \pm 18,5	413 \pm 18	955 \pm 71	26,2 \pm 4,2	649 \pm 20	556 \pm 53					

5.2.2. Ocena zawartości komórek z aktywnymi kaspazami wśród izolowanych komórek nabłonka jamy ustnej

5.2.2.1. Ocena zróżnicowania morfologicznego komórek nabłonka jamy ustnej w powiązaniu z aktywnością kaspaz

Wykorzystując parametr SSC przeanalizowano aktywność kaspaz mierzoną intensywnością fluorescencji FLICA. Na podstawie wyników umieszczonych w Tab.4 i zilustrowanych na Ryc.3B wyróżniono trzy wyraźne populacje komórek u osób niepalących tytoniu:

- Populacja 4 to komórki nie wykazujące aktywności kaspaz. Wyraźnie odpowiadają one komórkom małym o niskiej ziarnistości (SSC podobne jak w populacji 1)
- Populacja 5 wykazywała niską aktywność kaspaz średnie wartości FLICA i SSC wynosiły odpowiednio 311 (± 169), 917 (± 157) (SSC podobne jak w populacji 2). Komórki te stanowiły ok. 59% wśród izolowanych keratynocytów. Były wśród nich komórki z populacji 2 i 3.
- Populacja 6 to komórki o bardzo wysokiej aktywności kaspaz (10× większej niż w populacji 5); średnie wartości FLICA i SSC wynosiły odpowiednio 3409 (± 1542), 714 (± 200) (SSC nieco niższe niż w populacji 2 i nieco wyższe niż w populacji 3). Komórki te stanowiły ok. 22% wśród izolowanych keratynocytów. Były wśród nich komórki z populacji 2 i 3.



Rycina 3. Przykładowa analiza zawartości komórek z aktywnymi kaspazami wśród komórek nabłonka jamy ustnej w powiązaniu z parametrami FSC i SSC.

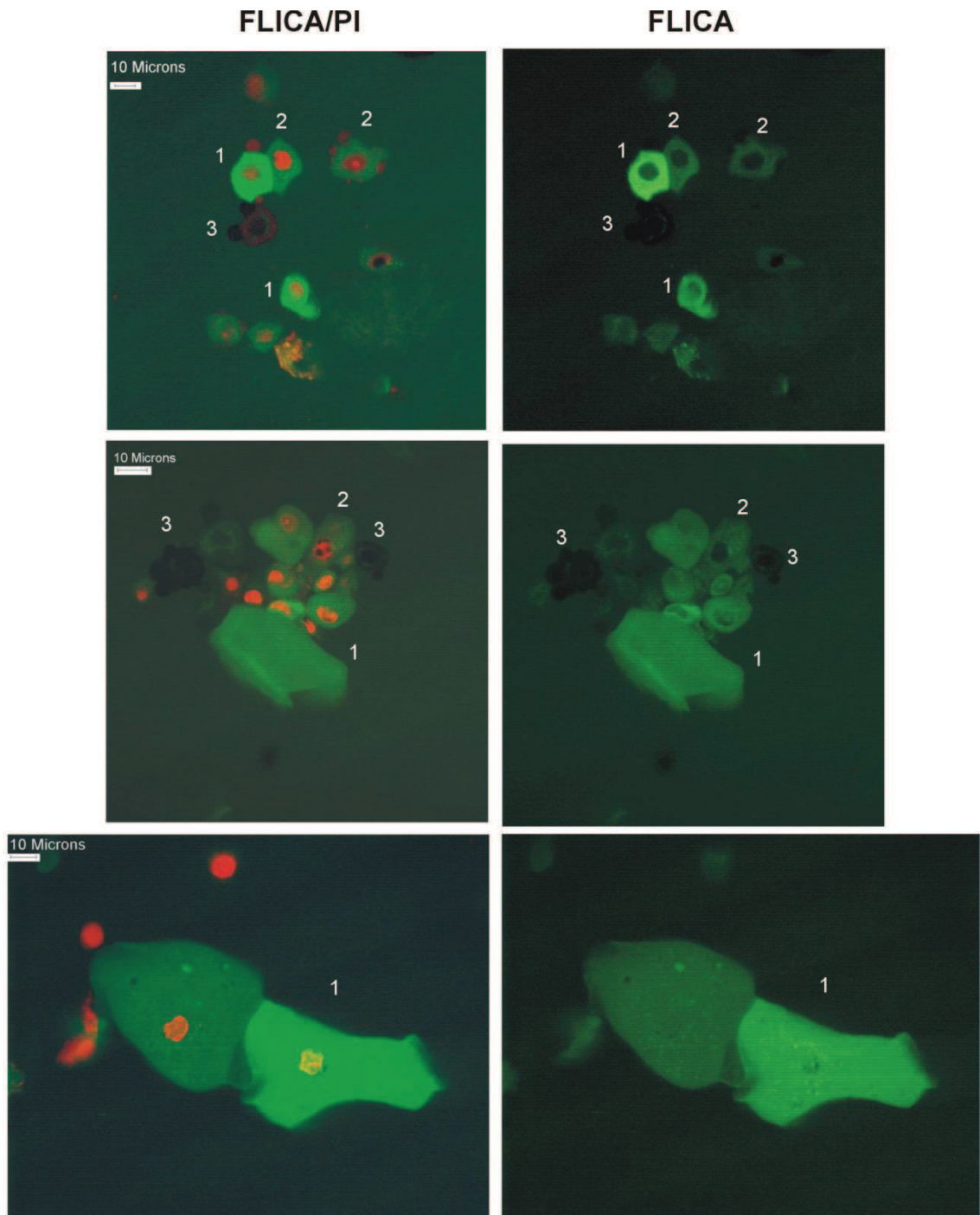
- A – grupy komórek o zróżnicowanej wielkości i ziarnistości (FSC/SSC); 1 komórki małe o niskiej ziarnistości 220/150; 2 komórki duże o dużej ziarnistości 500/900; 3 komórki duże o niższej niż populacja 2 ziarnistości 650/700
- B – grupy komórek o zróżnicowanej aktywności kaspaz (FLICA) i ziarnistości (SSC); 4 brak aktywnych kaspaz i niska ziarnistość (FLICA=10, SSC=160); 5 niska aktywność kaspaz i duża ziarnistość (FLICA=100, SSC=940); 6 wysoka aktywność kaspaz i niższa niż populacja 5 ziarnistość (FLICA=1400, SSC= 700)
- C – histogram ilustrujący zróżnicowaną aktywność kaspaz: 5 to komórki o niskiej aktywności kaspaz KL; 6 to komórki o wysokiej aktywności kaspaz KH; histogram szary przedstawia komórki niebarwione FLICA;
- D – populacje komórek wczesnoapoptycznych KH+PI- (wysoka aktywność kaspaz i zachowana ciągłość błony komórkowej) i późnoapoptycznych/nekrotycznych KH+PI+ (wysoka aktywność kaspaz i uszkodzona błona komórkowa)

Tabela 4. Zróżnicowanie komórek nabłonka jamy ustnej z aktywnymi kaspazami na dwie populacje różniące się intensywnością fluorescencji FLICA (zawartość aktywnych kaspaz w komórce) i SSC (ziarnistość). Przedstawione w tabeli wartości są średnimi arytmetycznymi \pm OS. Zaobserwowano znaczne $p < 0,05$ obniżenie intensywności fluorescencji komórek z aktywnymi kaspazami u osób palących tytoń więcej niż 5 paczkolet w porównaniu z grupą osób niepalących (*).

Średnia liczba paczkolet	Komórki nabłonka jamy ustnej					
	Populacja 5			Populacja 6		
	%	średnia wartość fluorescencji FLICA	SSC	%	średnia wartość fluorescencji FLICA	SSC
0	58,6 \pm 9,8	311 \pm 169	917 \pm 157	21,9 \pm 7,5	3409 \pm 1542	714 \pm 200
1,4	58,9 \pm 8,9	241 \pm 143	946 \pm 118	23,0 \pm 8,4	3236 \pm 1963	777 \pm 130
5,6	48,8 \pm 15,3	171\pm43 *	960 \pm 73	25,4 \pm 10,4	2045\pm689 *	716 \pm 102
26,9	44,7 \pm 22	135\pm66 *	963 \pm 60	30,3 \pm 6,6	1528\pm377 *	735 \pm 107

Palenie tytoniu wpływało na odsetek wymienionych populacji oraz aktywność kaspaz. Wraz ze wzrostem liczby paczkołat istnieje tendencja do obniżania zawartości komórek populacji 5 i wzrostu odsetka populacji 6, z komórkami o wysokiej aktywności kaspaz. W obu populacjach można zauważyć obniżającą się wartość średniej fluorescencji FLICA (mniej fluorochromu wiąże się z komórką, co oznacza spadek zawartości aktywnych kaspaz) wraz z liczbą paczkołat. Na podkreślenie zasługuje znamienne ($p=0,014$) spadek o ok. 40% wartości FLICA w populacji 6 w grupie palaczy o średniej liczbie paczkołat 5,6 w porównaniu z osobami niepalącym, przy podobnym odsetku tych komórek.

Wykonane zdjęcia w mikroskopie konfokalnym potwierdziły wewnątrzplazmatyczną obecność znakowanych fluorochromem aktywnych kaspaz w izolowanych komórkach nabłonka jamy ustnej oraz zróżnicowaną intensywność fluorescencji FLICA, co wskazuje na różną aktywność kaspaz. Wysoką fluorescencję (1) obserwowano wśród komórek o różnej wielkości, w tym w komórkach największych pochodzących z warstw zewnętrznych (Ryc.4)



Rycina 4. Obraz morfologicznego zróżnicowania oraz aktywności kaspaz (FLICA) komórek nabłonka jamy ustnej w mikroskopie konfokalnym. Komórki oznaczone jako 1 to komórki o wysokiej aktywności kaspaz (KH), 2 to komórki o niskiej aktywności kaspaz (KL), 3 komórki nie wykazujące aktywności kaspaz. PI – jodek propidyny wybarwia DNA przy uszkodzonej błonie komórkowej. Skala 10 μ m.

5.2.2.2. Ocena zróżnicowania komórek z aktywnymi kaspazami

Analiza odsetka komórek wykazujących obecność aktywnych kaspaz w poszczególnych grupach pacjentów, wykazała iż najwięcej komórek z aktywnymi kaspazami było wśród osób niepalących aż 73% (Tab.5). Wśród palaczy zawartość tych komórek malała do 62,4% (w grupie palących 1,4 paczkołat) oraz 57,8% (w grupie palących 5,6 paczkołat). Obniżanie odsetka komórek z aktywnymi kaspazami było wysoce znamienne w grupie osób palących 5,6 paczkołat w porównaniu z osobami niepalącymi ($p= 0,004$) (Tab.5).

Wśród komórek z aktywnymi kaspazami wyodrębniono dwie grupy komórek, o wysokiej aktywności kaspaz (KH) oraz o niskiej aktywności kaspaz (KL) (Tab.5, Ryc. 3C i 3D)

Wśród komórek o wysokiej aktywności kaspaz (KH+) zauważalna była tendencja do zmniejszania się odsetka komórek z aktywnymi kaspazami wraz ze wzrostem liczby wypalanych papierosów. Dodatkowe barwienie jodkiem propidyny (PI) wskazało, iż głównie spada liczba komórek, które poza wysoką aktywnością kaspaz nie wykazywały cech przerwania ciągłości błony (KH+PI-). Różnica pomiędzy komórkami osób niepalących a palących 5,6 paczkołat wyniosła ponad 5% i była znamienna statystycznie ($p= 0,03$). Natomiast odsetek komórek z wysoką aktywnością kaspaz ale z uszkodzoną błoną komórkową we wszystkich badanych grupach był zbliżony i wyniósł około 10%.

Również w grupie komórek o niskiej aktywności kaspaz (KL) obserwowano zmniejszanie się odsetka komórek wraz ze wzrostem liczby paczkołat. U osób niepalących komórki te stanowiły 43,7%, a u osób palących 5,6 paczkołat już o 11% mniej (różnica znamienna statystycznie $p= 0,01$). Obserwowany spadek był wynikiem głównie obniżania się zawartości komórek z nieuszkodzonymi błonami komórkowymi (KL+PI-). Wśród osób niepalących komórki KL+PI- stanowiły 39,1%, a u palących 5,6 paczkołat już tylko 27,0% (znamienna statystycznie różnica $p= 0,007$).

W procesie zaprogramowanej śmierci dochodzi do wzmożonej aktywności kaspaz, dlatego populacja komórek o wysokiej aktywności kaspaz (KH) została poddana dalszej analizie w badanych grupach pacjentów.

Tabela 5. Ocena zróżnicowania komórek nabłonka jamy ustnej pod względem zawartości komórek z aktywnymi kaspazami na komórki o wysokiej (KH) i niskiej (KL) aktywności kaspaz.
Przedstawione w tabeli wartości są średnimi arytmetycznymi \pm OS. Zaobserwowano znamienne 0,001 < p obniżenie odsetka komórek z aktywnymi kaspazami u osób palących powyżej 5 paczkolet w porównaniu z osobami niepalącymi. Różnice oceniano testem Kruskalla-Wallis: dla 1 p=0,004; dla 2 p=0,004; dla 3 p=0,03; dla 4 p=0,01; dla 5 p=0,007

Wyróżnione grupy komórek z aktywnymi kaspazami	Odsetek komórek z aktywnymi kaspazami		
	Liczba paczkolet		
	0	1,4	5,6
Wszystkie komórki kaspazododatnie (K+): K+PI- K+PI+ (uszkodzona błona komórkowa)	73,0 \pm 12,8 59,2 \pm 13,2 13,8 \pm 6,0	62,4 \pm 18,5 47,0 \pm 19,0 15,4 \pm 5,7	57,8 \pm 14,7 ¹ 41,5 \pm 17,3 ² 16,3 \pm 7,8
Komórki o wysokiej aktywności kaspaz(KH+): KH+/PI- KH+/PI+ (uszkodzona błona komórkowa)	29,4 \pm 8,5 20,1 \pm 6,2 9,2 \pm 4,6	26,2 \pm 9,8 16,6 \pm 7,5 9,6 \pm 4,0	25,1 \pm 6,3 14,5 \pm 5,2 ³ 10,6 \pm 4,2
Komórki o niskiej aktywności kaspaz(KL+): KL+/PI- KL+/PI+ (uszkodzona błona komórkowa)	43,7 \pm 12,6 39,1 \pm 12,0 4,6 \pm 3,1	35,8 \pm 11,6 29,6 \pm 14,4 6,2 \pm 5,3	32,7 \pm 12,4 ⁴ 27,0 \pm 13,6 ⁵ 5,6 \pm 5,4

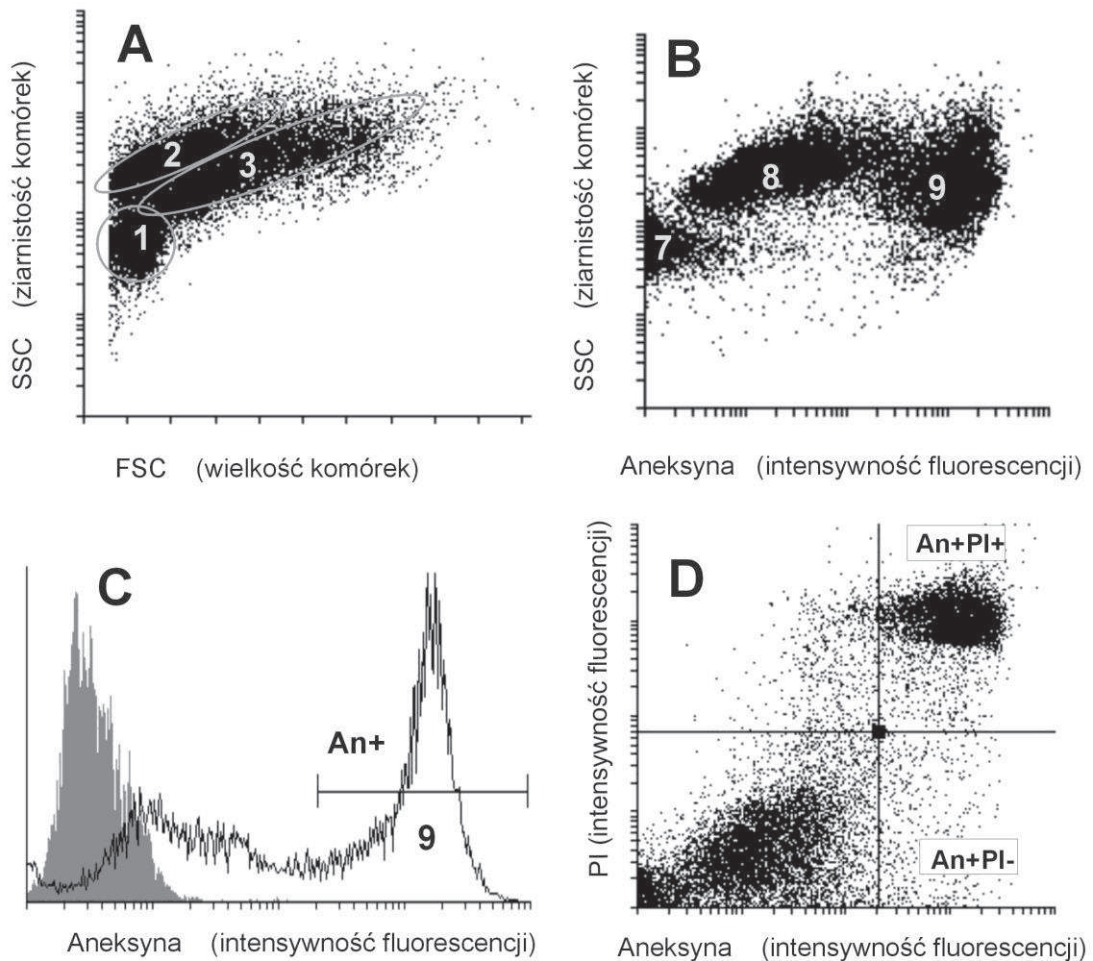
5.2.3. Ocena zróżnicowania morfologicznego komórek nabłonka jamy ustnej w powiązaniu z eksternalizacją fosfatydyloseryny

W badanym materiale podobnie jak przy ocenie kaspaz morfologicznie można wyróżnić trzy grupy komórek różniące się wielkością (FSC) i ziarnistością (SSC) (Ryc.5A). Odzwierciedlenie tego morfologicznego zróżnicowania znajduje swój wyraz w zróżnicowaniu komórek pod względem zmian w błonie komórkowej:

- Populacja 7 i 8 to komórki nie wykazujące istotnej eksternalizacji PS; średnia wartość fluorescencji dla aneksyny w populacji 8 wyniosła zaledwie 37 (± 12)
Komórki populacji 8 stanowiły ok. 58% wśród izolowanych keratynocytów.
- Populacja 9 to komórki z wyraźnym przemieszczeniem PS na zewnętrzną powierzchnię błony komórkowej (An+) (Rycina B i C). Komórki te stanowiły ok. 25% wśród izolowanych keratynocytów.

Analiza materiału wskazuje na wzrost odsetka komórek Populacji 9 z eksternalizacją fosfatydyloseryny wśród palaczy o największej liczbie paczkołat w porównaniu z osobami niepalącymi (Tab.6, Ryc.5D). Może to sugerować istnienie tendencji do wzrostu odsetka komórek z przemieszczoną do warstwy zewnętrznej fosfatydyloseryną w błonie komórkowej wraz z liczbą paczkołat.

Eksternalizacja PS to jedna z pierwszych zmian w procesie zaprogramowanej śmierci, dlatego ta populacja komórek została poddana dalszej analizie w badanych grupach pacjentów. Wykonane zdjęcia w mikroskopie konfokalnym potwierdzają błonową lokalizację Aneksyny V wiążącej się z fosfatydyloseryną. Wśród komórek wyróżnić można komórki wiążące Aneksynę V (An+) oraz z nieciąglą błoną komórkową (PI+), co pozwala na wyróżnienie komórek wczesnoapoptycznych (An+/PI-) i późnoapoptycznych (An+/PI+) (Ryc.6).



Rycina 5. Przykładowa analiza zawartości komórek z eksternalizacją fosfatydyloseryny (An+) wśród komórek nabłonka jamy ustnej.

A – grupy komórek o zróżnicowanej wielkości i ziarnistości (FSC/SSC): 1 komórki małe o niskiej ziarnistości 120/60; 2 komórki duże o dużej ziarnistości 200/400; 3 komórki duże o niższej niż populacja 2 ziarnistości 390/320

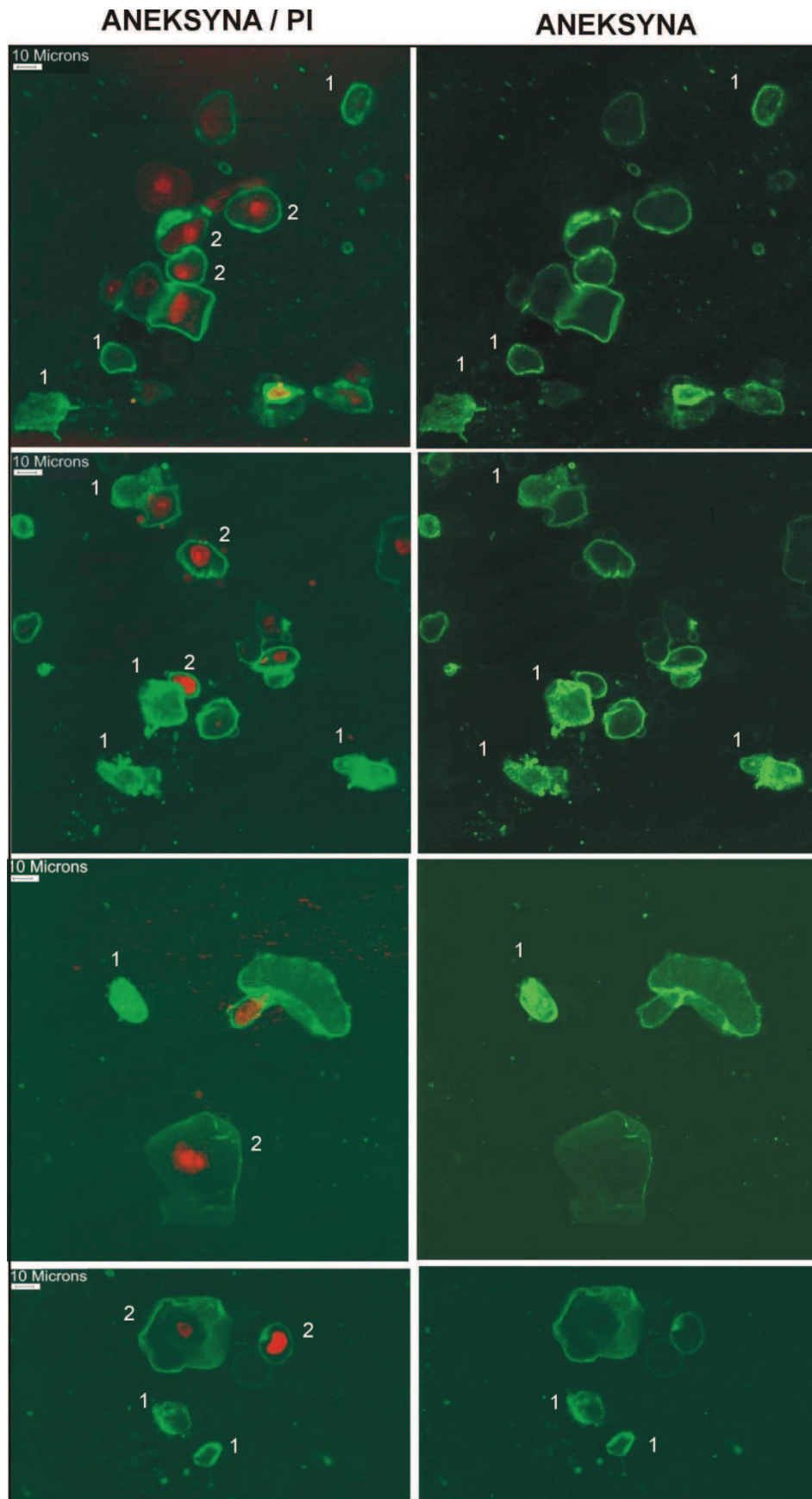
B – grupy komórek o zróżnicowanej fluorescencji aneksyny (FL1) i ziarnistości (SSC): 7 brak zmian w błonie niska ziarnistość (FL1=10, SSC=160); 8 brak zmian w błonie i duża ziarnistość (FL1=40, SSC=400); 9 zmiany w błonie, eksternalizacja PS (FL1=1230, SSC= 330)

C – populacja 9 to komórki wykazujące wyraźną eksternalizację fosfatydyloseryny (An+)

D – barwienie PI pozwoliło na zróżnicowanie populacji komórek wiążących aneksynę (An+) na: wczesnoapoptyczne charakteryzujące się eksternalizacją fosfatydyloseryny przy zachowanej ciągłości błony komórkowej (An+PI-) i późnoapoptyczne/nekrotyczne z eksternalizacją fosfatydyloseryny oraz nieciągłą błoną komórkową (An+PI+).

Tabela 6. Zróżnicowanie komórek nabłonka jamy ustnej pod względem zawartości komórek z eksternalizacją fosfatydyloseryny. Przedstawione w tabeli wartości są średnimi arytmetycznymi \pm OS.

		Komórki nabłonka jamy ustnej					
Średnia liczba paczkołat	Populacja 8			Populacja 9			
	%	średnia wartość fluorescencji		%	średnia wartość fluorescencji		
		Aneksyna	SSC		Aneksyna	SSC	
0	58,0 \pm 13,2	37 \pm 12	374 \pm 54	25,0 \pm 8,9	1572 \pm 659	469 \pm 96	
1,4	55,1 \pm 12,9	34 \pm 19	379 \pm 55	29,3 \pm 11,2	1551 \pm 1064	467 \pm 94	
5,6	51,2 \pm 9,5	32 \pm 8	394 \pm 52	29,5,4 \pm 10,8	1211 \pm 577	422 \pm 1029	
26,9	39,0 \pm 18,5	41 \pm 6	418 \pm 10	38,6 \pm 11,1	1643 \pm 405	416 \pm 70	



Rycina 6. Obraz różnicowania komórek nabłonka jamy ustnej na komórki wczesnoapoptyczne (An+/PI-; 1) oraz późnoapoptyczne (An+/PI+; 2) w mikroskopie konfokalnym. Skala 10 μ m.

5.3. OCENA ZAWARTOŚCI KOMÓREK O CECHACH APOPTOTYCZNYCH

Analiza komórek wszystkich pacjentów obejmowała ocenę odsetka komórek: z wysoką aktywnością kaspaz, przemieszczeniem fosfatydyloseryny w błonie komórkowej oraz ze zdegradowanym DNA. Wyniki zostały przedstawione w Tab. 7.

5.4. OCENA RÓŻNIC POMIĘDZY GRUPĄ OSÓB NIEPALĄCYCH I GRUPĄ O ŚREDNIEJ PACZKOLAT 1,4

5.4.1. Ocena aktywności kaspaz

Zawartość komórek z aktywnymi kaspazami wśród palących (średnio 1,4 paczkolata) była o ok 10 % niższa w porównaniu z osobami niepalącymi. Zaobserwowano głównie tendencję do obniżania komórek wczesnoapoptycznych. Jednakże obserwowane zmiany nie były znamienne statystycznie (Tab.7).

5.4.2. Ocena eksternalizacji fosfatydyloseryny

W obu porównywanych grupach komórki wczesnoapoptyczne An+/PI- stanowiły około 10%, a późnoapoptyczne An+/PI+ około 20% (Tab.7).

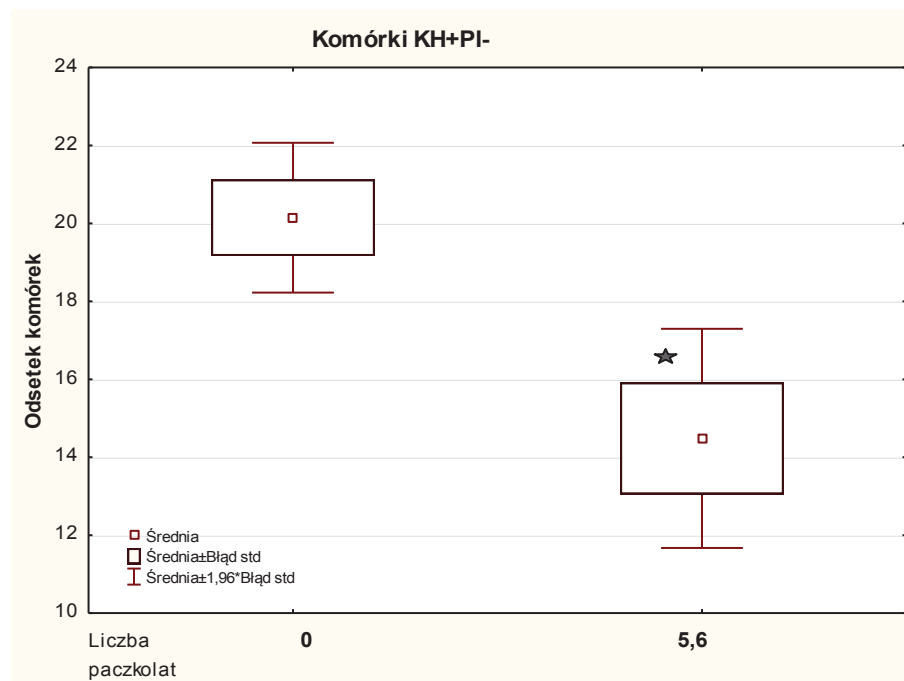
Tabela 7. Ocena zawartości komórek o cechach apoptycznych wśród izolowanych komórek nabłonka jamy ustnej. Przedstawione w tabeli wartości są średnimi arytmetycznymi \pm OS. Różnice między badanymi grupami oceniano testem Kruskalla-Wallis: dla 1 $p=0,004$; dla 2 $p=0,02$; dla 3 $p<0,05$; dla 4 $p=0,007$; dla 5 $p=0,017$.

Odsetek komórek o następujących cechach apoptozy:	Liczba paczkolet			
	0	1,4	5,6	26,9
1. Aktywne kaspazy; komórki:				
1.1. z całkowitą aktywnością kaspaz,	73,0 \pm 12,8	62,4 \pm 18,5	57,8\pm14,7 ¹	62,4 \pm 4,5
1.2. z wysoką aktywnością kaspaz, KH+ :	29,4 \pm 8,5	26,2 \pm 9,8	25,1 \pm 6,3	30,1 \pm 5,3
wczesnoapoptyczne KH+/PI-	20,1 \pm 6,2	16,6 \pm 7,5	14,5\pm5,2 ²	13,2 \pm 4,6
późnoapoptyczne KH+/PI+	9,2 \pm 4,6	9,6 \pm 4,0	10,6 \pm 4,2	16,9\pm5,9 ³
1.3. w końcowej fazie apoptozy K-/PI+	0,7 \pm 0,8	1,7 \pm 2,4	2,2 \pm 2,3 ⁴	1,0 \pm 0,4
2. Eksternalizacja fosfatydyloseryny; komórki:				
2.1. wczesnoapoptyczne An+/PI-	9,5 \pm 5,2	10 \pm 5,6	9,3 \pm 3,1	9,5 \pm 2,5
2.2. późnoapoptyczne An+/PI+	19,3 \pm 7,3	21,8 \pm 8,1	23,6 \pm 7,9	32,5\pm7,7 ⁵
3. Hypodiploidalna zawartość DNA (komórki z obszaru subG0 m. in. ciała apoptyczne)	3,0 \pm 2,5	2,4 \pm 1,2	5,6 \pm 4,9	7,5 \pm 7,1

5.5. OCENA RÓŻNIC POMIĘDZY GRUPĄ OSÓB NIEPALĄCYCH I GRUPĄ O ŚREDNIEJ PACZKOLAT 5.6

5.5.1. Ocena aktywności kaspaz

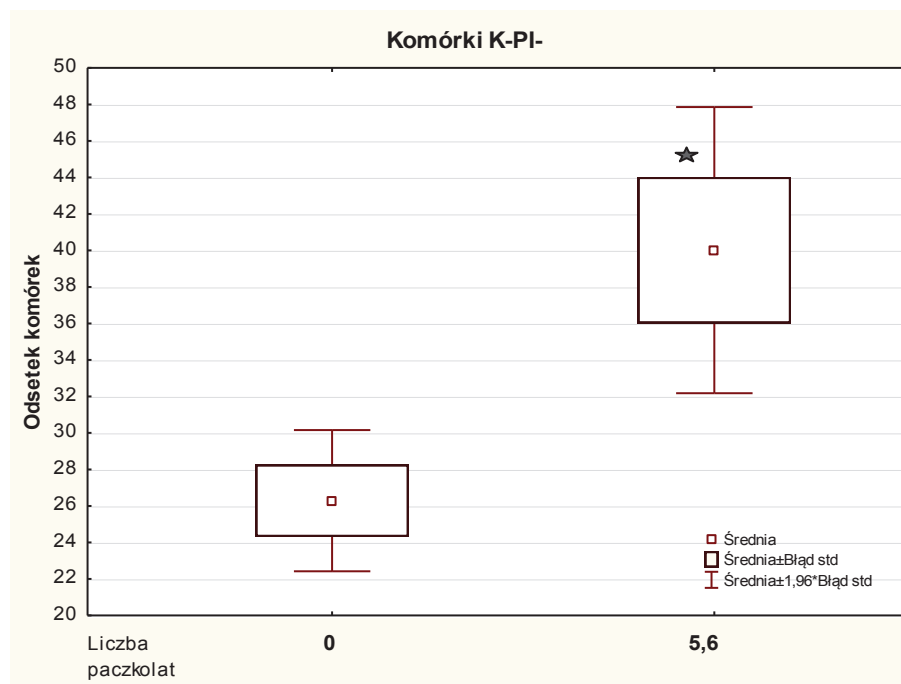
Wykonane badania wskazują na różnice pomiędzy obiema badanymi grupami w zawartości procentowej komórek wczesnoapoptycznych wykazujących aktywność kaspaz przy braku uszkodzeń błony komórkowej (KH+PI-) (Tab.7). Wśród osób niepalących stanowiły one 20,1%; natomiast u palaczy o średniej 5,6 paczkiolat 14,5% (różnica statystycznie istotna $p=0,02$).



Rycina 7. Znamienne obniżenie zawartości komórek wczesnoapoptycznych wykazujących obecność aktywnych kaspaz (KH+) bez uszkodzeń błony komórkowej (PI-) w grupie palących 5,6 paczkiolat w porównaniu z osobami niepalącymi. Test Dunn'a * $p<0,05$

Natomiast nie stwierdzono różnic dotyczących komórek późnoapoptycznych, których odsetki wyniosły w obu grupach około 10% (Tab.7).

Komórki nie wykazujące aktywności kaspaz zróżnicowano także pod względem obecności uszkodzeń w błonie komórkowej. Odsetek komórek bez aktywnych kaspaz z prawidłową błoną komórkową (K-/PI-) w grupie niepalących wyniósł 26,3%, wśród palących 5,6 paczkiolat 40,0% (Ryc.8, różnica statystycznie istotna $p=0,006$). Komórki bez aktywnych kaspaz, z uszkodzoną błoną komórkową (komórki nekrotyczne) wśród osób niepalących stanowiły ok. 1% wszystkich komórek, zaś wśród palących wartość ta wzrastała do ok. 2% (Tab.7, różnica statystycznie znamienne $p=0,007$).



Rycina 8. Porównanie zawartości komórek nie wykazujących obecności aktywnych kaspaz i uszkodzenia błony komórkowej w grupie niepalących i palących średnio 5,6 paczkołat. Test Dunn'a * $p < 0,01$

5.5.2. Ocena eksternalizacji fosfatydyloseryny

Zawartość komórek wiążących aneksynę oraz nie wykazujących uszkodzeń w strukturze błony komórkowej (An+PI-), w obu grupach wyniosła ok. 10%. Natomiast komórek późnoaptycznych z przemieszczoną fosfatydyloseryną oraz z uszkodzoną błoną komórkową (An+/PI+) u osób palących 5,6 paczkołat w porównaniu do komórek osób niepalących było o ok.4% więcej (Tab.7).

5.6. OCENA RÓŻNIC POMIĘDZY GRUPĄ OSÓB NIEPALĄCYCH I GRUPĄ O ŚREDNIEJ PACZKOŁAT 26,9 („KONTROLA POZYTYWNA”)

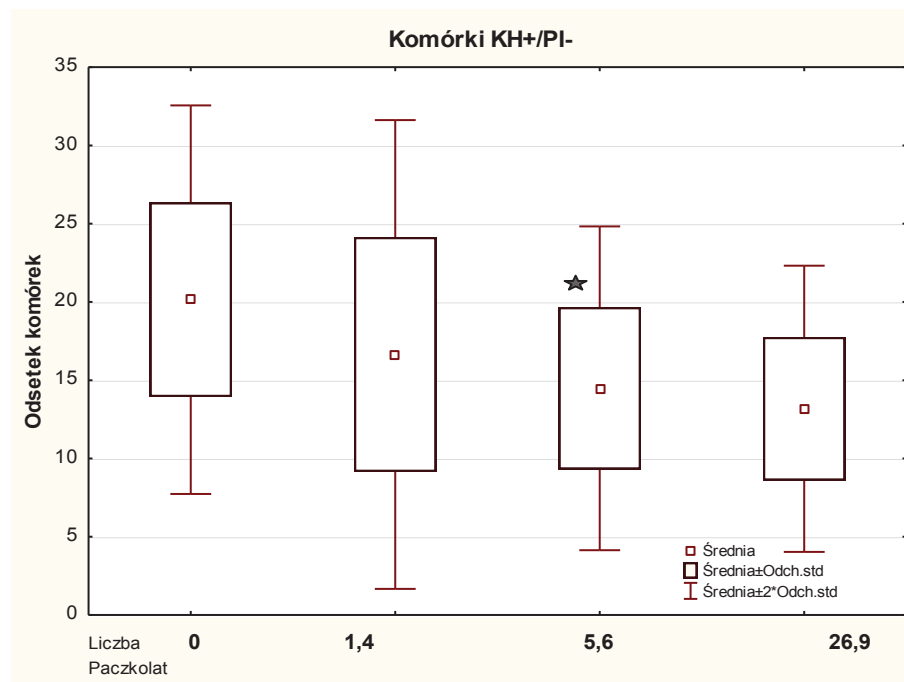
Uzyskany materiał umożliwił wyodrębnienie grupy osób o średniej paczkołat 26,9, co pozwoliło na dodatkowe potwierdzenie tendencji o zachodzących zmianach w zawartości komórek o cechach apoptycznych wraz ze wzrostem intensywności palenia (Tab.7; Ryc.9, 10, 11).

5.6.1. Ocena aktywności kaspaz

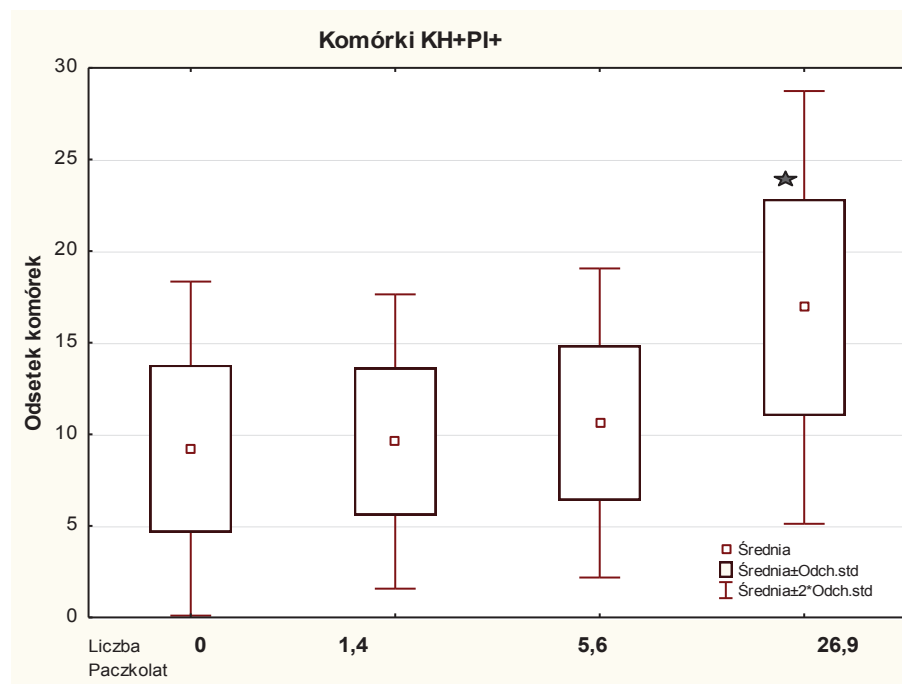
W trakcie oceny komórek z aktywnymi kaspazami, odnotowano dalsze, w stosunku do pozostałych grup palaczy, obniżanie liczby komórek wczesnoapoptotycznych (KH+PI-) o prawie 38% w stosunku do komórek osób niepalących (średnie dla obu porównywanych grup wyniosły odpowiednio: 13,1% dla grupy „kontroli pozytywnej” i 20,1% dla grupy niepalących) (Ryc.9).

Natomiast odsetek komórek późnoapoptotycznych (KH+PI+) w grupie palących 26,9 paczkołat był znamienne wyższy ($p < 0,05$) i wyniósł 16,9% w porównaniu z 9,2% u osób niepalących. Zaobserwowano wyraźną tendencję do zwiększania odsetka komórek późnoapoptotycznych wraz ze wzrostem liczby wypalanych papierosów (paczkołat), co ilustruje Ryc.10.

Wśród osób palących 26,9 paczkołat podobnie jak w grupie palących 5,6 paczkołat było więcej komórek bez aktywnych kaspaz i z ciągłą błoną komórkową (K-PI-) w porównaniu z niepalącymi osobami; wartości wyniosły odpowiednio $36,5 \pm 4,3\%$ i $26,3 \pm 12,5\%$.



Rycina 9. Malejąca zawartość komórek wczesnoapoptycznych z aktywnymi kaspazami (KH+) i nie uszkodzoną błoną komórkową (PI-) wraz ze wzrastającą liczbą paczkołat. Test Dunn'a * $p < 0.05$



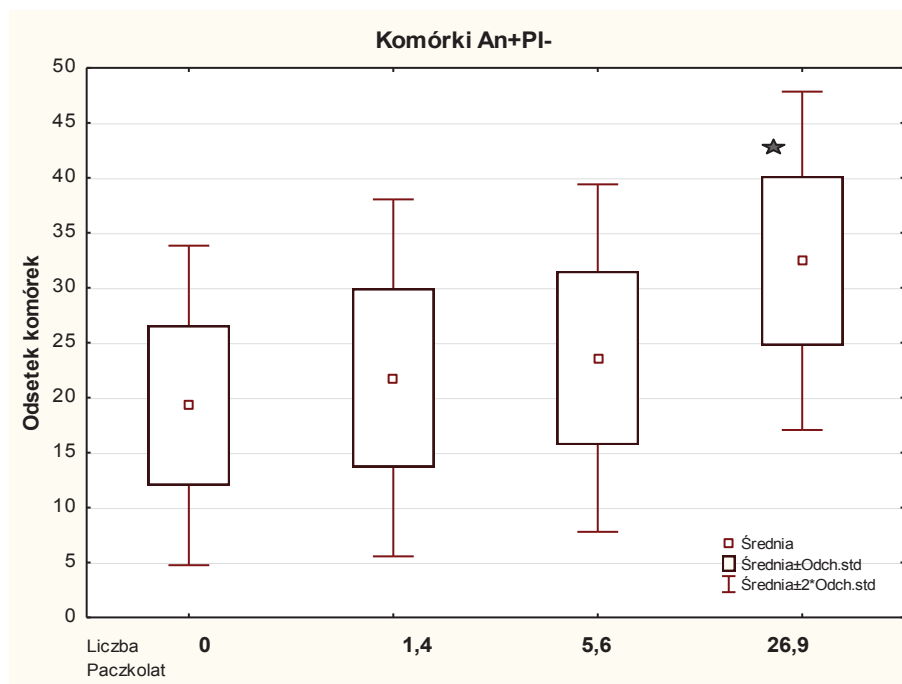
Rycina 10. Wzrastająca zawartość komórek późnoapoptycznych z aktywnymi kaspazami (KH+) i uszkodzoną błoną komórkową (PI+) wraz ze wzrastającą liczbą paczkołat. Test Dunn'a* $p < 0,05$

5.6.2. Ocena eksternalizacji fosfatydyloseryny

Zaobserwowana tendencja w komórkach „kontrolnej pozytywnej” do pogłębiania się różnic w stosunku do osób niepalących wraz ze wzrostem liczby wypalanych papierosów potwierdziła się również przy ocenie eksternalizacji fosfatydyloseryny (Tab.7). W grupie palących 26,9 paczkołat nastąpił znaczący o 40% wzrost liczby komórek wiążących aneksynę z jednocześnie uszkodzoną błoną komórkową (komórki późnoapoptyczne, An+PI+) w stosunku do osób niepalących (wartości wyniosły odpowiednio 32,5% i 19,3%; różnica znamionna statystycznie $p = 0,018$).

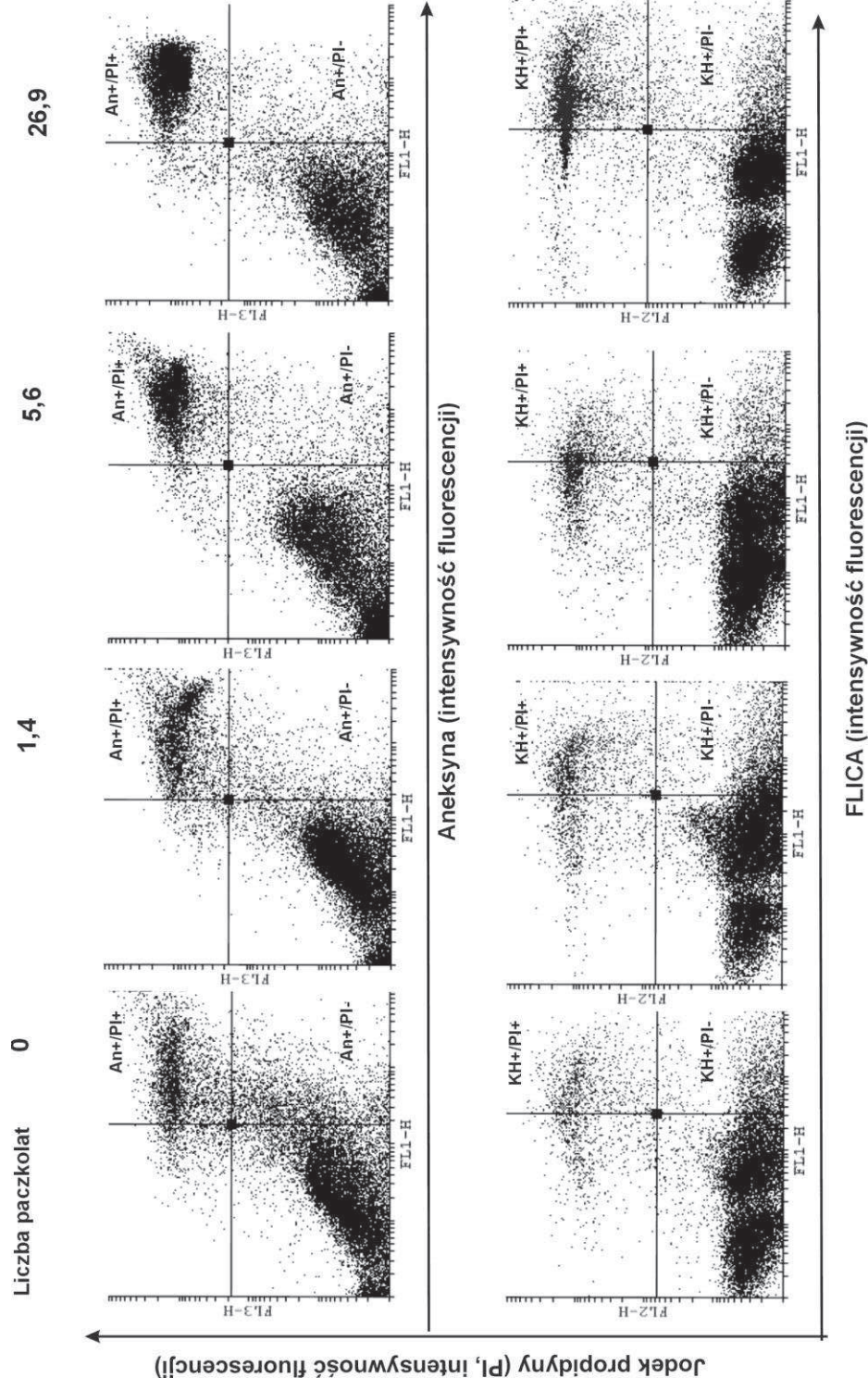
Zwiększający się odsetek komórek późnoapoptycznych wykazujących zmiany w strukturze błony komórkowej wraz ze wzrostem liczby wypalanych papierosów ilustruje Ryc.11.

Natomiast ocena komórek wiążących aneksynę i nie wykazujących uszkodzeń błony komórkowej (An+/PI-) w obu badanych grupach wynosiła około 9% (Tab.7).



Rycina 11. Wzrastająca zawartość komórek późnoaptycznych charakteryzujących się eksternalizacją fosfatydyloseryny (An+) i uszkodzoną błoną komórkową (PI+) wraz ze wzrastającą liczbą paczkołat. Test Dunn'a * $p < 0,05$

W podsumowaniu zaobserwowanych zmian stwierdzono, iż wraz ze wzrostem liczby paczkołat maleje liczba komórek wczesnoaptycznych (wysoka aktywność kaspaz, zachowana ciągłość błony komórkowej; KH+/PI-) a wzrasta liczba komórek o cechach późnej apoptozy/nekrozy (wysoka aktywność kaspaz, eksternalizacja fosfatydyloseryny, nieciągła błona komórkowa; KH+An+PI+), co ilustruje Ryc. 12.



Rycina 12. Przykładowa analiza zawartości komórek wczesnoapoptycznych (KH+/PI-, An+/PI-) oraz późnoapoptycznych/nekrotycznych (KH+/PI+, An+/PI+). Wraz ze wzrostem liczby paczkolet wzrasta zawartość komórek o cechach późnej apoptozy/nekrozy.

5.6.3. Ocena komórek o obniżonej zawartości DNA

W analizowanej grupie palaczy zaobserwowano wzrost komórek o obniżonej zawartości DNA (znajdujących się w tzw. subG0), wśród których znajdują się fragmenty komórek ginących np. ciała apoptotyczne. Odsetek tych komórek w grupie palących średnio 26,9 paczkolet wyniósł 7,5%, a wśród osób niepalących był dwukrotnie mniejszy i wynosił 3,0% (Tab.7).

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone doświadczenia wykazały różnice pomiędzy komórkami nabłonka jamy ustnej osób niepalących oraz palących tytoń. Stwierdzono także, że stopień nasilenia zmian wewnątrzkomórkowych związanych z fizjologiczną śmiercią komórek zależy od liczby wypalanych papierosów jak i okresu palenia.

Na początku omawiania wyników zaznaczyć należy, iż w dostępnym piśmiennictwie brak jest danych na temat podobnie przeprowadzonych badań, na tak licznej grupie pacjentów, uwzględniając technikę pobrania materiału, jego przygotowanie, ocenę, czy zestawienie wyników. W obecnej pracy oceniano komórki wszystkich warstw nabłonka jamy ustnej pod względem zmian indukowanych przewlekłą ekspozycją na dym tytoniowy z uwzględnieniem liczby paczkołat. Znacząca większość autorów ocenia wpływ dymu tytoniowego lub jego ekstraktów na komórki nabłonka jamy ustnej pozyskane drogą biopsji złuszczeniowej [45,108]. Metoda ta nie pozwala określić, z których warstw nabłonka pochodzą pobrane komórki.

Analiza cyklu komórkowego oceniająca odsetki komórek nabłonka jamy ustnej w poszczególnych fazach cyklu nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami pacjentów. Wśród osób niepalących stwierdzono około 82% komórek w fazie G0/G1 i 11% komórek w fazach S i G2/M.

Porównując otrzymane wyniki z tymi dostępnymi w publikacjach stwierdzić należy widoczne różnice pomiędzy komórkami hodowanymi oraz ocenianymi w obecnej pracy bezpośrednio po pobraniu i izolacji. Ohnukii i wsp. badając wpływ kwasu zoledronowego na keratynocyty nabłonka jamy ustnej, w grupie kontrolnej nie poddanej działaniu tej substancji wykazali, iż 53% komórek było w fazie G0/G1, 26% w G2/M oraz 21% w fazie S [90]. Podobnie, wysoką procentową zawartość w tych fazach cyklu dla keratynocytów linii komórkowej A549 nie poddanych działaniu CSE (ok.9% w fazie G2/M i ok.37% w fazie S) uzyskał Jian i wsp [60]. Schwartz i wsp. w swoich badaniach obejmujących grupę sześciu osób niepalących (biopsja złuszczeniowa błony śluzowej policzka), oprócz analizy odsetka komórek o hypodiploidalnej zawartości DNA, dokonał oceny odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Odsetek komórek w fazie G1 wyniósł 63,7%, w fazie G2 13,5%, natomiast w fazie S 22,8% [108].

W przytoczonych pracach uwagę zwraca znacznie wyższy odsetek komórek w fazach S i G2/M (ok. 47%, 46%, 36%) w porównaniu z badaną w obecnej pracy grupą osób niepalących (11%). W przytoczonych pracach wysoki odsetek komórek w fazach

S/G2/M wynika najprawdopodobniej z faktu, iż badania prowadzono na komórkach hodowanych *in vitro*, a nie pochodzących bezpośrednio od pacjenta.

Interesująca wydaje się być również ocena faz cyklu keratynocytów nabłonka jamy ustnej z keratynocytami naskórka przez Hwa-Jeong i wsp [54]. Grupa ta badając cykl komórkowy transfekowanych wirusem keratynocytów nabłonka jamy ustnej IHOK oraz linii komórkowej keratynocytów naskórka HaCaT stwierdziła zbliżone odsetki komórek w poszczególnych fazach cyklu, które wynosiły odpowiednio dla fazy G1 58,8%; G2/M 9,3%; S 16,2% [54]. Prawie 25% komórek nabłonka jamy ustnej znajdowało się w fazach bezpośrednio związanych z proliferacją, jednakże trzeba podkreślić, iż komórki te były transfekowane wirusem. Również Wan-Wen i wsp. wykazali podobne odsetki keratynocytów naskórka w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w porównaniu do komórek nabłonka jamy ustnej [130].

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych o ewentualnych zmianach zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu pod wpływem tytoniu (metoda cytometrii przepływowej), a wyniki omawianej rozprawy nie wykazały istotnych różnic w odsetkach komórek w poszczególnych fazach cyklu pomiędzy grupami osób niepalących oraz palących tytoń.

W kolejnym etapie zbadano, czy palenie tytoniu wpływa na wielkość (FSC) a także ziarnistość (SSC) komórek nabłonka jamy ustnej. Oceniono również, czy aktywność kaspaz zależy od stopnia zróżnicowania komórki (od ilości ziarnistości cytoplazmatycznych). Wyodrębniono 3 populacje komórek, różniące się między sobą wielkością oraz wewnętrznym zróżnicowaniem, co odzwierciedla morfologiczne zróżnicowanie komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego w ocenie z użyciem cytometrii przepływowej.

Porównując FSC oraz SSC komórek osób niepalących oraz palących tytoń, nie stwierdzono różnic pomiędzy komórkami badanych grup, co świadczy iż palenie tytoniu nie zmieniało w istotny sposób morfologii komórek nabłonka jamy ustnej. Należy tu podkreślić, iż badano pacjentów bez jakichkolwiek zmian makroskopowych w jamie ustnej. Wynik ten ze względu na brak podobnych publikacji nie może zostać porównany z badaniami innych autorów.

Jak już wcześniej wspomniano, w większości doświadczeń na keratynocytach jamy ustnej, jako metodę pozyskania materiału, wykorzystywano biopsję złuszczeniową, (umożliwia uzyskanie tylko komórek z powierzchniowych warstw nabłonka) [68]. Metoda ta nie daje możliwości oceny wielkości komórek wszystkich warstw nabłonka. W kolejnym etapie wykorzystując możliwości cytometrii przepływowej, przeanalizowano, czy wraz z różnicowaniem keratynocytów – wzrostem SSC, zmienia się aktywność kaspaz. W ten sposób wyodrębniono kolejne trzy

populacje komórek, różniące się zróżnicowaniem oraz aktywnością kaspaz (FLICA). Palenie tytoniu miało wpływ na wyodrębnione populacje a także na aktywność kaspaz. Wykazano, iż wraz ze wzrostem liczby paczkołat malał odsetek komórek o największej ziarnistości (SSC) i niewielkiej aktywności kaspaz, rósł natomiast odsetek komórek o średnim SSC i najwyższej aktywności kaspaz. Wykazano w ten sposób, iż aktywność kaspaz zmienia się w trakcie kornifikacji (jedna z fizjologicznych dróg śmierci komórki) keratynocytów nabłonka jamy ustnej oraz, że palenie tytoniu wpływa na ten proces, poprzez zwiększenie odsetka komórek o średniej ziarnistości oraz o dużej aktywności kaspaz. Opisane zmiany oraz obserwowany znaczący spadek średniej wartości fluorescencji FLICA, odzwierciedlającej obecność aktywnych kaspaz w komórkach, u palących 5,6 i powyżej paczkołat wskazują na jak dotąd nieznaną wpływ nikotyny na komórki nabłonka jamy ustnej. W publikacjach oceniających wpływ palenia tytoniu na nabłonek jamy ustnej brak jest podobnych informacji.

Jedynie praca Janes i wsp. dotycząca obserwacji keratynocytów naskórka w hodowli wykazała zmieniającą się aktywność kaspaz w trakcie różnicowania tych komórek poprzez wyodrębnienie wyraźne 3. populacji różniących się wielkością komórek i aktywnością kaspaz [55]. Uzyskany w ten sposób obraz morfologicznego zróżnicowania hodowanych *in vitro* komórek naskórka jest zbliżony do zróżnicowania komórek nabłonka jamy ustnej obserwowanego w omawianej rozprawie. Zarówno naskórek jak i nabłonek jamy ustnej z obszaru trójkąta zatrzonowcowego to nabłonki wielowarstwowe płaskie rogowaciejące. Wykonane w obecnej pracy obserwacje, wykazały, iż przy pomocy cytometrii przepływowej można określić morfologiczne zróżnicowanie komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego i oceniać zmiany populacji komórek pod wpływem czynników, w tym wypadku palenia tytoniu.

Mechanizmy apoptozy wykorzystywane w kornifikacji są niezbędnymi elementami homeostazy nabłonka jamy ustnej. Z tego powodu określenie indukowanych paleniem tytoniu zmian w tym procesie może mieć istotne znaczenie dla zrozumienia patogenezy chorób jamy ustnej np. leukoplakii, raków.

Większość autorów w dostępnych publikacjach oceniając wpływ składników dymu tytoniowego na wewnątrzkomórkowe procesy keratynocytów nabłonka jamy ustnej, przedstawiając ocenę procesu apoptozy, nie rozgranicza komórek na wczesno- oraz późnoapoptyczne. Jednak dla pełnego zrozumienia zachodzących zmian w procesie apoptozy zastosowanie takiego kryterium umożliwia ocenę dynamiki tego procesu. W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, iż wzrastający odsetek komórek późnoapoptycznych (wykazujących obecność aktywnych kaspaz oraz uszkodzoną błonę komórkową), wśród palaczy, zależy od liczby paczkołat.

Odsetek komórek późnoapoptycznych w grupie niepalących wyniósł 9,2%, pośród palących 5,6 paczkołat odsetek wyniósł 10,5%, natomiast wśród grupy palących 26,9 paczkołat 19,4%. Odnotowano zatem wzrost o 52%. liczby komórek późnoapoptycznych pomiędzy niepalącymi oraz palącymi 26,9 paczkołat.

Drugą w obecnych badaniach wykorzystaną metodą oceny odsetka komórek późnoapoptycznych było określenie stopnia eksternalizacji fosfatydyloseryny. Zestawiając wyniki wszystkich badanych pacjentów zaobserwowano znaczący wzrost liczby komórek wiążących aneksynę z uszkodzoną błoną komórkową o 41,8% w grupie palaczy (26,9 paczkołat, $34,6 \pm 4,8\%$) w stosunku do niepalących ($19,29 \pm 7,2\%$). Uzyskane w obecnych badaniach wyniki dotyczące przemieszczania fosfatydyloseryny w komórkach nabłonka jamy ustnej mogą wskazywać, iż palenie tytoniu wpływa na zmiany w strukturze błony komórkowej charakteryzujące późną apoptozę. Jednak trudno je porównywać z wynikami innych autorów z powodu braku informacji na ten temat w dostępnym piśmiennictwie. Jednym z nielicznych doniesień różnicujących komórki nabłonka jamy ustnej na wczesno- oraz późnoapoptyczne na podstawie wiązania aneksyny V oraz 7- AAD (7-Aminoactinomycin-D), jest praca Gao i wsp. którzy w swoich badaniach porównywali wpływ składników dymu tytoniowego na komórki raka płaskonabłonkowego linii 101A oraz prawidłowe keratynocyty nabłonka jamy ustnej (HGEC – Human Gingival Epithelial Cells). Ocena stopnia eksternalizacji fosfatydyloseryny oraz wnikania 7-AAD przez błonę komórkową wykazała, podobnie jak w omawianej rozprawie, wzrost odsetka komórek późnoapoptycznych indukowany ekstraktami ze składników dymu tytoniowego (TPM smoke – Total Particulate Matter) w prawidłowych komórkach nabłonka jamy ustnej [38]. Podobnie przeprowadzone doświadczenie przez Jiao i wsp. określające wpływ CSE na komórki nabłonka jamy ustnej pochodzące z linii komórkowej A549 (Cell Bank of Chinese Academy of Sciences), wykazało znaczący wzrost odsetka komórek z przemieszczoną fosfatydyloseryną oraz uszkodzoną błoną komórkową (An+PI+) czyli późnoapoptycznych pod wpływem CSE, a nasilenie fluorescencji (określające ilość przemieszczonej fosfatydyloseryny oraz stopień uszkodzenia błony komórkowej) rosło wraz ze zwiększającym się stężeniem CSE [60]. Przytoczone prace wskazują, iż *in vitro* dym tytoniowy indukuje apoptyczną śmierć komórek nabłonka jamy ustnej. Te wyniki doświadczalne, odpowiadają obserwacji o wzroście odsetka komórek późnoapoptycznych An+PI+ w grupie palących 26,9 paczkołat.

Otrzymane w obecnych badaniach wyniki można również próbować porównywać w podobnie przeprowadzonych analizach, oceniających wpływ składników dymu tytoniowego na komórki nabłonka wyściełającego oskrzela. Jednakże tak jak przypadku komórek nabłonka jamy ustnej, nieliczne analizy wpływu składników dymu

tytoniowego na komórki nabłonka wyściełającego oskrzela przeprowadzane były na hodowlach komórkowych [75,140].

Zhang i wsp. oceniający wpływ CSE na komórki nabłonkowe oskrzeli linii komórkowej HBE1, stosując aneksynę V oraz jodek propidyny, stwierdzili wzrastający odsetek komórek późnoapoptycznych wraz ze wzrostem stężenia CSE [140], co odpowiada wynikom obecnej pracy wykazującym wzrost liczby komórek późnoapoptycznych w komórkach nabłonka jamy ustnej u osób palących 26,9 paczkołat.

Odsetek komórek o obniżonej zawartości DNA (subG0; zawiera fragmenty komórek, ciała apoptyczne) jest dodatkowym parametrem oceniającym komórki zniszczone. Opisywana w piśmiennictwie zawartość tych komórek wśród komórek nabłonka jamy ustnej osób niepalących wynosi od ok.6% do ok.14% [54,108], to więcej niż 3% w omawianym materiale doświadczalnym, który jednak pochodził z liczącej 40. osób grupy badanej. Odsetek ten zwiększał się w grupach palaczy wraz ze wzrostem liczby paczkołat, osiągając $7,5\pm 7\%$ w grupie palących 26,9 paczkołat. Wykazano tym samym ponad dwukrotny wzrost liczby komórek w końcowej fazie apoptozy lub/i nekrotycznych w grupie palących 26,9 paczkołat w stosunku do osób niepalących.

Szczegółowa analiza procesu apoptozy umożliwiła wyodrębnienie również komórek wczesnoapoptycznych. Odsetek tych komórek, wykazujących obecność zaktywowanych kaspaz, ale bez uszkodzeń błony komórkowej wyższy był o 37% w grupie niepalących w porównaniu do grupy palących 26,9 paczkołat, co sugeruje, iż palenie tytoniu powoduje wzrost liczby komórek tylko w końcowej fazie apoptozy.

Niezbędnymi elementami szlaków apoptozy są kaspazy. Wyniki obecnej pracy wskazujące na wzrastający odsetek komórek z aktywnymi kaspazami, wraz ze wzrostem wielkości i ziarnistości komórek, świadczą o udziale tych proteaz w procesie różnicowania keratynocytów nabłonka jamy ustnej.

Uzyskane wyniki potwierdzają nieliczne doniesienia z dostępnych publikacji o indukowanym nikotyną wzroście aktywności tych enzymów w komórkach nabłonka jamy ustnej [38,60]. Opisy doświadczeń przedstawiają indukowaną stężonymi ekstraktami dymu tytoniowego zwiększającą się aktywność kaspazy 3. Należy jednak podkreślić, że ocena aktywności kaspaz przez Gao i wsp. prowadzona była na hodowlach komórkowych przy podawaniu komórkom ekstraktów ze składników dymu tytoniowego, wśród których jest szereg substancji o cytotoksycznym działaniu [38]. Odsetek komórek wykazujących wzrastającą aktywność kaspazy 3 zaobserwowali także we wspomnianym już wcześniej doświadczeniu Jiao i wsp., wykazując wzrost zaktywowanej kaspazy 3 o prawie 90% wśród komórek poddanych działaniu CSE o

stężeniu 20% przez 24 godziny w porównaniu do komórek nie poddawanych działaniu CSE [60].

Wyniki dyskutowanej rozprawy nie wykazały tak dużego wzrostu aktywności kaspaz, maksymalna zawartość komórek późnoapoptycznych (wykazujących obecność zaktywowanych kaspaz oraz uszkodzenie błony komórkowej) wzrosła o ponad 50% u palących 26,9 paczkołat w porównaniu z osobami niepalącymi. Rozbieżność uzyskiwanych wyników w badaniach prowadzonych na hodowlach komórkowych, wskazuje iż uzasadniona wydaje się być ocena komórek bezpośrednio izolowanych od osób palących tytoń.

Niezwykle istotnym czynnikiem regulującym wpływ składników dymu tytoniowego na komórki jest czas, w którym miały one kontakt z substancjami zawartymi w dymie tytoniowym. Świadczyć o tym może analiza przeprowadzona przez Semlali i wsp. w której wykorzystano utworzony w warunkach *in vitro* model błony śluzowej składający się z podłoża utworzonego z fibroblastów oraz kolagenu zwierzęcego a także z pokrywającej blaszkę właściwą, warstwy komórek nabłonkowych [106, 110]. Taki model błony śluzowej poddawany był działaniu składników dymu tytoniowego w komorze dymnej, zwraca uwagę jednak krótki czas ekspozycji wynoszący 30 min. Następnie przeprowadzono ocenę aktywności kaspazy 3, nie stwierdzając wzrostu aktywności tej proteazy [110]. Dopiero wykorzystanie przez Semlali i wsp. aneksyny V wraz z PI umożliwiło szerszą ocenę procesu apoptozy. Stwierdzono znaczący wzrost odsetka komórek późnoapoptycznych wśród komórek poddanych działaniu składników dymu tytoniowego [110]. Wynik ten, choć jest zbieżny z obserwacjami omawianej pracy jest trudny do porównania, ze względu na zupełnie inne warunki doświadczenia.

Gualercii i wsp. w przeprowadzonym w podobny sposób doświadczeniu ocenił wpływ składników dymu tytoniowego na komórki nabłonka jamy ustnej pobrane w czasie zabiegów chirurgicznych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej od osób niepalących (n=5) [45]. Po izolacji, komórki poddane zostały krótkotrwałemu działaniu dymu tytoniowego (około 6 minut co miało odpowiadać jednemu wypalanemu papierosowi), a następnie ocenione metodą immunofluorescencji pod kątem zróżnicowania komórkowego (ocena zawartości cytokeratyn: CK10, CK14), adhezji (Dsg1, Dsg3, E-kadheryna) oraz zaprogramowanej śmierci poprzez ocenę m. in. aktywności kaspazy 3 oraz ekspresji białka p53. Jednak zmian w aktywności tej proteazy cysteinowej nie zaobserwowano [45].

Rozbieżne rezultaty doświadczeń i w tym przypadku najprawdopodobniej mogą wynikać z różnych warunków hodowlanych, różnego stężenia ekstraktów dymu tytoniowego, a także zróżnicowanego czasu ekspozycji komórek na ten czynnik.

Abhijit i wsp. w przeprowadzonej próbie oceny wpływu nikotyny na keratynocyty błony śluzowej jamy ustnej chomika, zauważyli, że ekstrakt z nikotyny podany komórkom w niskim stężeniu indukował apoptozę, natomiast wyższe stężenie nikotyny powodowało hamowanie tego procesu, co specyficznie sprzężone było z obniżeniem zawartości wewnątrzkomórkowego stężenia NO (tlenek azotu) [1].

Jak już wcześniej wspomniano, oprócz komórek nabłonka jamy ustnej, komórki wyściełające drogi oddechowe także podlegają szkodliwemu działaniu dymu tytoniowego. Większość prac oceniających ten wpływ koncentruje się na ocenie zmian w ekspresji genów [119,133]. W piśmiennictwie odnaleźć można jednak publikacje opisujące wpływ składników dymu tytoniowego na procesy wewnątrzkomórkowe. Świadczy o tym m.in. wynik badania przeprowadzonego przez Liu i wsp., w którym linia komórkowa BEAS-2B (komórki nabłonka oskrzeli) poddana została działaniu CSE. Analiza immunofluorescencyjna aktywności kaspazy 3 nie wykazała różnic pomiędzy komórkami poddanymi działaniu CSE a grupą kontrolną. Należy jednak dodać, że komórki były pasażowane i wykorzystywane do badań pomiędzy 3 a 10 pasażem [75]. Wynik ten sugerować może odmienną reakcję komórek nabłonkowych górnych dróg oddechowych na składniki dymu tytoniowego w porównaniu do komórek nabłonka jamy ustnej, jednak odszukać w dostępnym piśmiennictwie można również prace, które wskazują na aktywację kaspazy 3 pod wpływem składników dymu tytoniowego w komórkach nabłonka oskrzeli. Takim przykładem jest doświadczenie Zhang i wsp., w którym stopień immunofluorescencji określający aktywność kaspazy 3 wzrósł znacząco po ekspozycji komórek HBE1 (Human Bronchial Epithelial cell line) na stężony ekstrakt składników dymu tytoniowego CSE [140].

Wobec tak różnorodnych wyników badań, najtrafniejsza wydaje się być cena komórek bez prowadzenia hodowli. Tylko komórki bezpośrednio oceniane po pobraniu i izolacji odzwierciedlają rzeczywiste zmiany zachodzące w nabłonku jamy ustnej pod wpływem palenia tytoniu. Niezmiernie istotnym czynnikiem jest także ocena komórek, które przez wiele lat poddawane były działaniu dymu tytoniowego. Komórki takie mogą wykazywać zupełnie inne zmiany wewnątrzkomórkowe w porównaniu do komórek poddanych działaniu ekstraktów dymu tytoniowego w czasie prowadzonej hodowli.

Zatem wykonane porównawcze badania obejmujące grupę 40. osób niepalących i 33. osoby ze zróżnicowaną intensywnością palenia tytoniu mierzoną paczkolatami, w których badano komórki pobrane bezpośrednio od pacjentów uzupełniają fragmentaryczną wiedzę o wpływie tytoniu na nabłonek jamy ustnej. Chociaż nie wykazały one, iż palenie tytoniu zmienia znacząco morfologię komórek (FSC, SSC) czy procentową zawartość komórek w poszczególnych fazach cyklu, to wyraźnie wskazały, iż na palenia tytoniu reagują kaspazy, enzymy zaangażowane w proces fizjologicznej

śmierci keratynocytów będący drogą ich różnicowania. Obserwowane wraz ze wzrastającą liczbą wypalanych papierosów oraz liczbą lat trwania nałogu zmiany miały charakter zmian ilościowych i jakościowych, dotyczyły spadku średniej aktywności kaspaz, spadku procentowej zawartości komórek z aktywnymi kaspazami przy wzroście komórek późnoapoptycznych. Oczywiście dalszych badań wymaga odpowiedź na pytanie, które z kaspaz szczególnie podlegają wpływowi dymu tytoniowego.

7. WNIOSKI

1. Nie ulegająca zmianie zawartość komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego u osób palących jedną paczkę dziennie przez okres do 6. lat świadczy, iż palenie tytoniu nie zaburza w sposób istotny proliferacji komórek nabłonka jamy ustnej.
2. Wyróżnione populacje komórek różniące się wielkością (FSC) i zawartością struktur wewnętrznych (SSC) wyraźnie odzwierciedlają histologiczne zróżnicowanie komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego, a wzrastająca wraz z tymi parametrami aktywność kaspaz i eksternalizacja fosfatydyloseryny, potwierdzają udział mechanizmów apoptozy w procesie różnicowania komórek nabłonka jamy ustnej.
3. Wzrastający odsetek komórek późnoapoptycznych, obniżająca się aktywność kaspaz wraz ze wzrostem liczby paczkolet wskazuje na indukowane paleniem tytoniu zaburzenia w przebiegu fizjologicznej śmierci keratynocytów nabłonka jamy ustnej.
4. Wpływ składników dymu tytoniowego na biologię keratynocytów nabłonka jamy ustnej zależny jest od czasu trwania nałogu oraz liczby wypalanych papierosów i staje się już zauważalny przy ok. 6. paczkoletach.

8. STRESZCZENIE

Palenie tytoniu jest problemem o zasięgu światowym i wiązane jest z występowaniem licznych chorób ogólnoustrojowych a także nowotworowych. Najlepiej poznanym tytoniozależnym nowotworem jest rak płuca, nie należy jednak zapominać o innych nowotworach, których etiologia również wiązana jest z paleniem tytoniu. Spośród nowotworów obszaru głowy i szyi, oprócz raka krtani, nosowej części gardła, nowotworem o częstym występowaniu jest płaskonabłonkowy błony śluzowej rak jamy ustnej (OSCC).

Dym tytoniowy składa się z dużej liczby związków, z których około 60 ma udowodnione działanie kancerogenne.

Spośród wszystkich przestrzeni anatomicznych, które ulegają ekspozycji na szkodliwe składniki dymu tytoniowego podczas palenia tytoniu, jama ustna stanowi obszar najmniej zbadany. Jak do tej pory nie uchwycono momentu, w którym przy braku manifestacji klinicznej dochodzi już do zmian w biologii keratynocytów nabłonka jamy ustnej. Znacznie lepiej poznany i udokumentowany jest wpływ palenia tytoniu na komórki oskrzeli oraz pęcherzyków płucnych.

Większość opisywanych w publikacjach doświadczeń oceniających biologię keratynocytów nabłonka jamy ustnej, jako materiał wykorzystuje hodowane komórki poddawane *in vitro* wpływowi dymu tytoniowego. Wobec braku systematycznych badań nad wpływem palenia tytoniu na komórki nabłonka jamy ustnej na materiale bezpośrednio pochodzącym od osób palących tytoń w niniejszej pracy przebadano grupę 77. pacjentów, obejmując doświadczeniem osoby, które nigdy nie paliły tytoniu oraz palaczy, z uwzględnieniem okresu oraz intensywności palenia tytoniu (paczkołata). Wykorzystując rutynowo usuwanie podczas zabiegów chirurgicznych dławienia dolnych zębów trzecich trzonowych fragmenty błony śluzowej jamy ustnej, przeprowadzono bezpośrednio po izolacji i barwieniu keratynocytów ocenę ich zdolności do proliferacji i śmierci (apoptoza, kornifikacja), a także zróżnicowanie morfologiczne.

Ocena odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, pozwoliła na porównanie proliferacji keratynocytów osób niepalących oraz palących tytoń.

Do oceny drogi fizjologicznej śmierci komórek w procesie kornifikacji wykorzystano parametry procesu apoptozy takie jak aktywność kaspaz i przemieszczenie fosfatydyloseryny w dwuwarstwie fosfolipidowej.

Określenie odsetka komórek z aktywnymi kaspazami (metodą FLICA), z przemieszczoną do warstwy zewnętrznej fosfolipidów fosfatydyloseryną w błonie

komórkowej (test z Aneksyną V) oraz przerwana błona komórkowej (pozwala na wnikanie do komórki jodku propidyny, PI), pozwoliło na ocenę procesu apoptozy keratynocytów nabłonka jamy ustnej osób niepalących oraz palących tytoń, z podziałem komórek na wczesno- oraz późnoapoptyczne.

Proces keratynizacji stanowi drogę fizjologicznej śmierci keratynocytów i przebiega w wykorzystaniem mechanizmów apoptozy. Wykorzystując ten fakt przeprowadzono analizę zróżnicowania komórek pod względem wielkości (FSC) oraz ziarnistości (SSC) komórek w połączeniu z oceną aktywności kaspaz i eksternalizacją fosfatydyloseryny. Wyróżnione trzy populacje komórek różniące się wielkością i zawartością struktur wewnętrznych (ziarnistością) wyraźnie odzwierciedlają histologiczne zróżnicowanie komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego. Wraz ze wzrostem wielkości i ziarnistości komórek wrastała aktywność kaspaz i eksternalizacja fosfatydyloseryny komórek nabłonka jamy ustnej, co jednoznacznie potwierdza zaangażowanie mechanizmów apoptozy w proces dojrzewania komórek nabłonka jamy ustnej.

Ocena morfologiczna komórek nie wykazała istotnych różnic w wielkości komórek nabłonka osób niepalących oraz palących tytoń. Natomiast wyraźne różnice dotyczyły aktywności kaspaz i tak zaobserwowano wśród osób palących tendencję zmian zawartości poszczególnych populacji różniących się aktywnością kaspaz oraz obniżanie aktywności tych proteaz wraz ze wzrostem liczby paczkołat.

Doświadczalnie nie wykazano istotnego wpływu palenia tytoniu na proces proliferacji komórek nabłonka jamy ustnej. Odsetki komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego we wszystkich badanych grupach były zbliżone.

Ocena markerów procesu apoptozy wykazała, iż palenie tytoniu zaburza przebieg tego procesu, zwiększając odsetek komórek późnoapoptycznych.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają na stwierdzenie, iż palenie tytoniu zaburza proces fizjologicznej śmierci tych komórek będący podstawą procesu keratynizacji. Należy szczególnie podkreślić, iż u badanych osób palących tytoń nie były obecne w jamie ustnej żadne makroskopowe zmiany błony śluzowej, to były zdrowe osoby. Palenie tytoniu u tych osób jednak zaburzyło już homeostazę nabłonka, co w perspektywie czasowej może prowadzić do rozwoju różnych chorób jamy ustnej, w tym procesu nowotworzenia.

9. PIŚMIENICTWO

1. Abhijit G., Banerjee C., Velliyur K. Inhibition of nitric oxide-induced apoptosis by nicotine in oral epithelial cells. *Mol Cell Biochem*, 2007, 305:113–121.
2. Agudo A., Bonet C., Travier N., González C., Vineis P., Bueno-de-Mesquita H., Trichopoulos D., Boffetta P., Clavel-Chapelon F., Boutron-Ruault M., Kaaks R., Lukanova A., Schütze M., Boeing H., Tjønneland A., Halkjaer J., Overvad K., Dahm C., Quirós J., Sánchez M., Larrañaga N., Navarro C., Ardanaz E., Khaw K., Wareham N., Key T., Allen N., Trichopoulou A., Lagiou P., Palli D., Sieri S., Tumino R., Panico S., Boshuizen H., Büchner F., Peeters P., Borgquist S., Almquist M., Hallmans G., Johansson I., Gram I., Lund E., Weiderpass E., Romieu I., Riboli E. Impact of cigarette smoking on cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *J Clin Oncol*, 2012, 20, 30(36):4550-7.
3. Ahmad, M., Srinivasula S., Hegde R., Mukattash T., et al. Identification and characterization of murine caspase-14, a new member of the caspase family. *Cancer Res*, 1998, 58: 5201 – 5205.
4. Allombert – Blaise S., Tamiji S., Mortier L., Fauvel H., Tual M., Delaporte E., Piette F., Martin DeLassale E., Formstecher P., Marchetti P., Polakowska R. Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway. *Cell Death Differ*, 2003, 10: 850 – 2.
5. Arredondo J., Chernyavsky A., Jolkovsky D., Pinkerton K., Grando S. Receptor-mediated tobacco toxicity: Alterations of the NF-KB expression and activity downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes. *Life Sciences*, 2007, 80: 2191-2194.
6. Arredondo J., Chernyavsky A., Jolkovsky D., Pinkerton K., Grando S. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1 and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J*, 2006, 20: 2093-101.
7. Arredondo J., Chernyavsky A., Jolkovsky D., Pinkerton K., Grando S. Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of $\alpha 5$ and $\alpha 7$ nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. *FASEB J*, 2008, 22:1356-68.

8. Assis G., Ceolin D., Marques M., Salvadori D., Ribeiro D. Cigarette smoke affects apoptosis in rat tongue mucosa: role of Bcl-2 gene family. *J Mol Hist*, 2005, 36: 483-489.
9. Balasubramanian K., Schroit A. Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death, *Annu Rev Physiol*, 2003, 65: 701-734.
10. Barrett A., Cruchley A., Williams D. Oral mucosal Langerhans cells. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1996, 7: 36-58.
11. Barrett A., Scully C. Human oral mucosal melanocytes: a review. *J Oral Pathol Med*, 1994, 23: 97-103.
12. Bennett M., Gibson D., Schwartz S., Tait J. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res*, 1995, 77: 1136-1142.
13. Berkovitz B., Barrett A. Cytokeratin intermediate filaments in oral and odontogenic epithelia. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*, 1998, 40(1): 4-23.
14. Bhutani M., Pathak A., Fan Y., Liu D., Lee J., Tang H., et al. Oral epithelium as a surrogate tissue for assessing smoking-induced molecular alteration in the lungs. *Cancer Prev Res(Phila)*, 2008, 1: 39-44.
15. Bonassi S., Coskun E., Ceppi M., Lando C., Bolognesi C., Burgaz B., Holland N., Kirsh-Volders M., Knasmueller S., Zeiger E., Carnesoltas D., Cavallo D., da Silva J., de Andrade V., Cakmak Demircigil C., Anibal Domínguez Odiom, Hamiyet Donmez-Altuntas, Gattas G, Giri A, Giri A, Go´mez-Meda B, Go´mez-Arroyo S, Hadjidekova V, Haveric A, Kamboj M, Kurteshi K, Grazia Martino-Roth M, Montero Montoya R, Nersesyan A, Pastor-Benito S, Maria Favero Salvadori D, Shaposhnikova A, Stopper H, Thomas P, Torres-Bugarín O, Singh Yadav A, Zu´niga Gonza´lez G, Fenech M, The HUman MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 2011, 728: 88–97.
16. Borst P., Elferink R. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 537-592.
17. Bouchier-Hayes L., Martin S., CARD games In apoptosis and immunity. *EMBO Rep*, 2002, 3(7): 616-21.
18. Boyle J., Gümüř Z., Kacker A., Choksi V., Bocker J., Zhou X., Yantiss R., Hughes D., Du, B., Judson B., Subbaramaiah K., Dannenberg A. Effects of cigarette smoke on the human oral mucosal transcriptome. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(3): 266-78.

19. Bragulla H., Homberger D. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, 2009, 214: 516–559.
20. Candi E., Schmidt R., The Cornified envelope: A model of cell Health In the skin. *Moll Cell Biol*, 2005, 328-240.
21. Cardinale A., Nastrucci C., Cesario A., Russo P. Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. *Critical Rev in Tox*, 2012, 42(1): 68–89.
22. Carmeliet P., Jain R. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407, (6801):249-57.
23. Chin Y., Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal*, 2009, 21: 470–476.
24. Chu M., Guo J. Long-term Exposure to Nicotine, via Ras Pathway, Induces Cyclin D1 to Stimulate G1 Cell Cycle Transition. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 6369–6379.
25. Dale B., Nirunsukii W., Rehemtulla A., Lewis S., Presland R. Profilaggrin is proteolytically cleaved by furin during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol*, 1997, 108: 554.
26. Denecker G., Ovaere P., Vandenabeele P., Declercq W. Caspase – 14 reveals its secrets. *JCB*, 2008, 180(3): 451 – 458.
27. Didkowska J., Manczuk M., McNeill A., et al. Lung cancer mortality at ages 35-54 in the European Union: ecological study of evolving tobacco epidemics. *BMJ*, 2005, 331: 189-191.
28. Dimri G. What has senescence got to do with cancer?. *Cancer Cell*, 2005, 7: 505–512.
29. Donetti E., Gualerzi A., Bedoni M., Volpari T., Sciarabba M., Tartaglia G., Sforza Ch. Desmolgein 3 and keratin 10 expressions are reduced by chronic exposure to cigarette smoke in human keratinized oral mucosa explants. *Arch Biol, Arch Oral Biol*, 2010, 10: 815-823.
30. Donnan G., McNeil J., Adena M., Doyle A., O'Malley H., Neill G. Smoking as a risk factor for cerebral ischaemia. *Lancet*, 1989, 16(2):643-7.
31. Drukała J., Zarzecka J., Gojniczek K., Waligórska A., Zapała J., Korohoda W. Comparison of proliferation and motile activity between human keratinocytes isolated from skin and oral mucosa. *Folia Biol*, 2005, 53, 21.
32. Dziedek M., Thomas T. Genes coding for basal lamina glycoproteins laminie, nidogen, and collage IV are differentially Expressesem In the nervous system and by epithelial, endothelial and mesenchymal cells of the Mouse embryo. *Exp Cell Res*, 1993, 208: 54-67.

33. Eckhart L., Declercq W., Ban J., Rendl M., Lengauer B., Mayer C., Lippens S., Vandenaabeele P., Tschachler E. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase – 14 activation. *J Invest Dermatol*, 2000, 115: 1148–1151.
34. Fabisiak J., Tyurin V., Tyurina Y., Sedlov A., Lazo J., Kagan V. Nitric oxide dissociates lipid oxidation from apoptosis and phosphatidylserine externalization during oxidative stress. *Biochemistry*, 2000, 39: 127-128.
35. Ferrano-Peyret C., Que,emeur L., Flacher M., Revillaerd JP., Genestier L., Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol*, 2002, 169: 4805-4810.
36. Fischer U., Janicke R., Schulye-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase. *Cell Death Differ*, 2003, 10(1): 76-100.
37. Galimanis A., Mono M., Arnold M., Nedeltchev K., Mattle H. Lifestyle and stroke risk: a review, *Curr Opin Neurol*, 2009, 22(1): 60-8.
38. Gao H., Prasad G., Zacharias W. Differential cell-specific cytotoxic responses of oral cavity cells to Tobacco preparations. *Tox In Vitro*, 2012, 27: 282-291.
39. Gemenetzidis E., Bose A., Riaz A., Chaplin T. FOXM1 upregulation is an early event in human squamous cell carcinoma and it is enhanced by nicotine during malignant transformation. *PLoS One*, 2009, 4(3):4849.
40. Gibbs S., Ponec M. Intrinsic regulation of differentiation markers in human epidermis, hard palate and buccal mucosa. *Oral Biol*, 2000, 45: 149-158.
41. Ginzkey Ch., Stueber T., Friehs G., Koehler Ch., Hackenberg S., et. al. Analysis of nicotine-induced DNA damage in cells of the human respiratory tract. *Tox Letters*, 2012, 208: 23–29.
42. Giroit M. Smoking and stroke. *Presse Med*, 2009, 38(7-8):1120-5.
43. Grądzka I. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochem*, 2000, 46: 2–16.
44. Grando S., Horton R., Mauro T., et al. Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol*, 1996, 107(3): 412-8.
45. Gualerci A., Sciarabba A., Tartaglia G. et al. Acute effects of cigarette smoke on three-dimensional cultures of normal human oral mucosa, In. *Toxicology*, 2012, 24(5-8): 382-389.
46. Gultekin S., Senguven B., Karaduman B. The effect of smoking on epithelial proliferation in healthy and periodontally diseased marginal gingival epithelium. *J Periodontol* 2008, 79: 1444-50.

47. Hadnadjev M., Ilic M. Smoking and asthma in children. *Med Glas Ljek komore Zenicko-doboj kantona*, 2011, 8(2): 266-72.
48. Hankey G. Smoking and risk of stroke. *J Cardiovasc Risk*, 1999, 6(4):207-11.
49. Hecht S. Tobacco carcinogens, their biomarkers, and tobacco- induced cancer. *Nature Rev Cancer*, 2003, 3: 733–744.
50. Heijink I., Brandenburg S., Postma D., van Oosterhout A. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur Respir J*, 2012, 39(2):419-28.
51. Hilmann R., Kissin B. Oral cytologic patterns in relation to smoking habits: Some epithelial, microfloral, and leukocytic characteristic. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1976, 42: 366-374.
52. Ho P., Hawkins C. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J*, 2005, 272: 5436-5453.
53. Huxley R., Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Lancet*, 2011, 378(9799):1297-305.
54. Hwa-Jeong L., Han-Young G., Sun-Kyung L. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med*, 2005, 34: 436–43.
55. Janes S., Ofstad T. Campbell D., Eddaoudi A. Warnes G., Davies D., Watt F. PI3-kinase-dependent activation of apoptotic machinery occurs on commitment of epidermal keratinocytes to terminal differentiation. *Cell Res*, 2009, 19: 328-339.
56. Janjigian Y., Kris M., Shen R., Sima C., Bach P., Rizvi N., Riely G. Pack Years of Cigarette Smoking as a Prognostic Factor in Patients with Stage IIIB/IV Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer*, 2010, 1, 116(3): 670–675.
57. Jansen B., van Ruissen F., Cerneus S., et al. Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand triggers apoptosis in dividing but not in differentiating human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2003, 121: 1433–9.
58. Jassem E., Szymanowska A., Siemińska A., Jassem J. Palenie tytoniu a rak płuca. *Pneumomol Alergol Pol*, 2009, 77: 469-473.
59. Jemal A., Siegel R., Ward E., et al. Cancer statistics 2007. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57: 43-66.
60. Jiao Z., Ao Q., Xiong M. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis. *Acta Physiologica Sinica*, 2006, 25, 58(3): 244-254.

61. Kagan V., Tyurina V., Jiang J., Tyurina Y., Ritov V., et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol*, 2005, 1: 223-232.
62. Karachunski E., Horton R., Navaneetham M., et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 1998, 54: 779-788.
63. Kepp O., Tesniere A., Schlemmer F., Michaud M., Senovilla L., Zitvogel L., Kroemer G. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* 2009, 14: 364 – 75.
64. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304: 433–435.
65. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 2009, 16: 3–11.
66. Krześlak A. Akt kinase: a key regulator of metabolism and progression of tumors. *Post Hig Med Dosw*, 2010, 19(64): 490-503.
67. Kuechle M., Thulin C., Presland R., Dale B. Profilaggrin requires both linker and filaggrin peptide sequences to form granules: implications for profilaggrin processing *in vivo*. *J Invest Dermatol*, 1999, 112: 843:852.
68. Kujan O., Desai M., Sargent A., Bailey A., Turner A., Sloan P. Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: Results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncology*, 2006, 42: 810– 818.
69. Lamkanfi M., Festjens N., Declercq W., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*, 2007, 14: 44 – 55.
70. Lavrik I., Golks A., Krammer P. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, 2005, 10: 2665-72.
71. Lehrer M., Sun T., Lavker R. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci*, 1998, 111: 2867-2875.
72. Leone A. Cigarette smoking and health of the heart. *JR Soc Health*, 1995, 115: 354-55.
73. Lippens S., Denecker G., Ovaere P., et al. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1497–508.
74. Lisiewicz J., Michalczak W. Pharmacology and toxicology of tobacco smoke. *Wiad Lek*, 1983, 36: 1339-1344.

75. Liu X., Conner H., Kobayashi T. Cigarette Smoke Extract Induces DNA Damage but Not Apoptosis in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33: 121–129.
76. Llinares K., Escande F., Aubert S., Buisine M., de Bolos C., Barta S., Gosselin B., Aubert J., Porchet N., Copin M. Diagnostic value of MUC4 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 2004, 17: 150-157.
77. Lorand L., Graham R. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 140–156.
78. Loro L., Vintermyr O., Johannessen A. Apoptosis in normal and diseased oral tissues. *Oral Diseases*, 2005, 11: 274-87.
79. Maouche K., Polette M., Jolly T., Medjber K. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. *Am J Pathol*, 2009, 175: 1868-1882.
80. Marczak A., Józwiak Z. Zaburzenia asymetrycznego rozmieszczenia fosfatydyloseryny w błonie komórkowej najnowsze teorie. *Post Biol Kom*, 2007, 2: 231-240.
81. Marsden V., O'Connor L., O'Reilly L. Apoptosis initiated by Bcl-2 regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*, 2002, 419: 634-637.
82. Michalak S., Kazmierski R., Hellmann A., Kozubski W. The effect of cigarette smoking on serum concentration of conjugated dienes in stroke patients. *Przegl Lek*, 2009, 66(10): 612-6.
83. Munteanu I., Didilescu C. Chemistry and toxicology of cigarette smoke in the lungs. *Pneumologia*, 2007, 56(1): 41,43-6.
84. Muzio M., Salvesen G., Dixit V. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem*, 1997, 272: 2952-2956.
85. Nersesyan A., Kundi M., Atefie K., Schulte-Hermann R., Knasmüller S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(10): 1835-40.
86. Nersesyan 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.
87. Nguyen V., Hall L., Gallacher G., Ndoeye A., Jolkovsky D., Webber R., Buchli R., Grando S. Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic

- acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res*, 2000, 79(4): 939-949.
88. Nhan T., Liles W., Schwartz S. Physiological functions of caspases beyond cell death. *Am J Pathol*, 2006, 169(3): 729–37.
89. Ockner R. Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16: 248–260.
90. Ohnuki H., Izumi K., Terada M., Saito T., Kato H., Suzuki A., Kawano Y., Nozawa-Inoue K., Takagi R., Maeda T. Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(7): 906-17.
91. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett*, 2004, 49(1-3): 19-23.
92. Orywal K., Jelski W., Szmitkowski M. Dehydrogenaza alkoholowa i aldehydowa w chorobach nowotworowych – część I. *Pol Merk Lek*, 2008, XXIV, 144, 565.
93. Pappas R. Toxic elements in tobacco and in cigarette smoke: inflammation and sensitization. *Metallomics*, 2011, 3(11): 1181-98.
94. Pechacek T., Asma S., Blair N., Eriksen M. Tobacco: global and community solutions. In: Yusuf S., Cairns J., Camm A., Fallen E., Gersh B. Editors. *Evidence-based cardiology (2nd edn.)*, BMJ Books, London, 2003, 103-13.
95. Pickett G., Seagrave J., Boggs S., Polzin G., Richter P., Tesfaigzi Y. Effects of 10 Cigarette Smoke Condensates on Primary Human Airway Epithelial Cells by Comparative Gene and Cytokine Expression Studies. *Toxicol Sci*, 2010, 114(1): 79–89.
96. Piкуła M., Trzonkowski P. Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie. *Post Hig Med Dosw*, 2009, 63: 449-456.
97. Polosa R., Russo C., Caponnetto P., Bertino G., Sarvà M., Antic T., Mancuso S., Al-Delaimy W., et al. Greater severity of new onset asthma in allergic subjects who smoke: a 10-year longitudinal study. *Respir Res*, 2011, 24, 12: 16.
98. Presland R., Dale B. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: Function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000, 11(4): 383-408.
99. Presland R., Jurevic R., Making Sense of the Epithelial Barrier: What Molecular Biology and Genetics Tell Us About Functions of Oral Mucosal and Epidermal Tissues. *J Dental Education*, 2002, 66(4): 564-74.
100. Rahman M., Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol*, 2007, 5(4): 276-92.

101. Rendl M., Ban J., Mrass P., Mayer C., Lengauer B., Eckhart L., Declercq W., Tschachler E. Caspase-14 expression by epidermal keratinocytes is regulated by retinoids in a differentiation-associated manner. *J Invest Dermatol*, 2002, 119: 1150–1155.
102. Reno F., Rocchetti V., Migliario M. Chronic exposure to cigarette smoke increases matrix metalloproteinases and Filaggrin mRNA expression in oral keratinocytes: Role of nicotine stimulation. *Oral Oncol*, 2011, 47: 827–830.
103. Reno F., Rocchetti V., Migliario M., Cannas M. Nicotine modulates gelatinase B (MMP-9) and epilysin (MMP-28) expression in reconstituted human oral Epithelium. *J Oral Pathol Med*, 2011, 40: 33–36.
104. Rodger U., Kevorkian L., Surridge A., et al. Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28. *Matrix Biol*, 2009, 28: 263–72.
105. Rosenthal D., Simbulan – Rosenthal C., Iyer S., Spoonde A., Smith W., Ray R., Smulson M. Sulfur mustard induces markers of terminal differentiation and apoptosis in keratinocytes via Ca²⁺ - calmodulin and caspase –dependent pathway. *J Invest Dermatol*, 1998, 111: 64 – 71.
106. Rouabhia M., Deslauriers N. Production and characterization of an *in vitro* engineered human oral mucosa. *Biochem Cell Biol*, 2002, 80: 189-195.
107. Sawicki W. *Histologia*, PZWL, Warszawa, 1997.
108. Schwartz J., Muscat J., Baker V., Larios E., Stephenson G., Guo W., Xie T., Gu X., Chung F. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. *Oral Oncol*, 2003, 39(8): 842-54.
109. Seghel P. Epigenetyczna regulacja aktywności czynnika transkrypcyjnego STAT-3 w komórkach nowotworowych. *Współ Onkol*, 2006, 10(8): 373-377.
110. Semlali A., Chakir J., Goulet J., Chmielewski W., Rouabhia M. Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *J Periodontal Res*, 2011, 46(5): 533-41.
111. Shah R., Cole J. Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8(7): 917–932. doi:10.1586/erc.10.56.
112. Shaykhiev R., Otaki F., Bonsu P., Dang D., Teater M., Strulovici-Barel Y., Salit B., Harvey B., Crystal R. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium *in vivo*. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 877–892.
113. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 1999, 399: 483–487.

114. Smith J., Waelde C., Horwitz A., Zheng P. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem*, 2002, 277:17797-17803.
115. Smolewski P. Rola kaspaz w procesie apoptozy. *Post Hig Med Dosw*, 2003, 57, 335-354.
116. Soriano J., Rodríguez - Roisin R. Chronic obstructive pulmonary disease overview: epidemiology, risk factors, and clinical presentation. *Proc Am Thorac Soc*, 2011, 8(4): 363-7.
117. Squier C., Hill M. *Oral histology: Development, structure and function*. St. Louis, 1989, 341-81.
118. Squier C., Kremer M. *Biology of Oral Mucosa and esophagus*. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2001, 29: 7-15.
119. Sridhar S., Schembril F., Zeskind J., Shah V., Gustafson A., Steiling K., Liu G. Dumas Y., Zhang X., Brody J., Lennburg M., Spira A. Smoking-induced gene expression changes in the bronchial airway are reflected in nasal and buccal epithelium. *BMC Genomics*, 2008, 30, 9: 259.
120. Stapleton M., Howard-Thompson A., George C., Hoover R., Self T. Smoking and Asthma. *J Am Board Fam Med*, 2011, 24(3): 313-22.
121. Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.; Rodzaje śmierci komórki; *Post Hig Med Dosw*, 2007, 61: 420-428.
122. Talukder M., Johnson W., Varadharaj S., Lian J., Kearns P., El-Mahdy M., Liu X., Zweier J. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(1):H388-96. doi: 10.1152/ajpheart.00868.2010. Epub 2010 Nov 5.
123. Tarkji B., Kujan O., Nassani M. An immunohistochemical study of the distribution of p16 protein in oral mucosa in smokers, non-smokers and in frictional keratosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2010, 15: 681-684.
124. Taylor B., Oudit G., Kalman P., Liu P. Clinical and pathophysiological effects of active and passive smoking on the cardiovascular system. *Can J Cardiol*, 1998, 14(9):1129-39.
125. Teo K., Ounpuu S., Hawken S., Pandey M., Valentin V., Hunt D., Diaz R., Rashed W., Freeman R. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet*, 2006, 368: 647-58.

126. Thun M., da Costa e Silva V. Introduction and overview of global tobacco surveillance, Tobacco control country profiles (2nd edition.), World Health Organization, Geneva, 2003, 41.
127. Urbaniak A., Kwiatkowska S. Lung cancer from diagnosis to treatment. *Pediatrica i Medycyna Rodzinna*, 2007, 3: 7-13.
128. van Raam B., Salvesen G. Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8. Hetero or homo: The caspase-8 dimer controls cell fate. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1824(1): 113-22.
129. Villar C., de Lima A. Smoking influence on the thickness of marginal gingival epithelium. *Pesqui Odontol Bras*, 2003, 17: 41-45.
130. Wan-Wen L., Yu-Ping H., Jing-Gung Ch. Synergistic phototoxic effects of glycolic acid in a human keratinocyte cell line (HaCaT), *J Dermatol Sci*, 2011, 64: 191–198.
131. Weil M., Raff M., Braga V. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol*, 1999, 9: 361-364.
132. Wen J., Fu J., Zhang W., Guo M. Lung carcinoma signaling pathways activated by smoking. *Chin J Cancer*, 2011, 30(8): 551-8.
133. West K., Brognadr J., et al. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest*, 2003, 111: 80-91.
134. West R., Zatoński W., Przewoźniak K., Jarvis M. Can we trust national smoking prevalence figures? Discrepancies between biochemically assessed and self-reported smoking rates in three countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16: 820-822.
135. Wetscher G., Bagchi D., Perdakis G., Bagchi M., Redmond E., Hinder P., Glaser K., Hinder R. *In vitro* free radical production in rat esophageal mucosa induced by nicotine. *Dig Dis Sci*, 1995, 40: 853–858.
136. Wogan G., Hecht S., Felton J., et al. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14: 473-486.
137. Wojtczak A., Skrętkowicz J. Kliniczne znaczenie polimorfizmu wybranych genów cytochromu P-450 podrodzin CYP2D, CYP2E, i CYP3A – część II. *Pol Merk Lek*, 2009, XXVII, 158, 166.
138. Wu N., Lee T., Tsai T., Lin W. TRAIL-induced keratinocyte differentiation requires caspase activation and p63 expression. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(4): 874-83.
139. Zeidler R., Albermann K., Lang S. Nicotine and apoptosis. *Apoptosis*, 2007, 12: 1927–1943.

140. Zhang H., Shih A., Rinna A., Forman H. Exacerbation of tobacco smoke mediated apoptosis by resveratrol: An unexpected consequence of its antioxidant action. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43: 1059-1064.
141. Zheng Y., Ritzenthaler J., Roman J., Han S. Nicotine stimulates human lung cancer cell growth by inducing fibronectin expression, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(6):681-90. Epub 2007 Jun 28.
142. Zhivotovsky B. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem*, 2003, 39: 25-40.
143. Zhou Y., Cheng Y., Feng D., Ling B., Liu P. Induction the cornification of squamous cancerous cells to eliminate tumor cells by promotion cell differentiation and stratum. *Med Hypotheses*, 2011, 77(5): 763–764.