

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Ewelina Golusińska-Kardach

**Ocena stanu jamy ustnej i wybranych parametrów
stresu oksydacyjnego w ślinie u osób palących tytoń**

Katedra i Klinika Chirurgii Stomatologicznej i Periodontologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor
prof. dr hab. n. med. Jerzy Sokalski

Poznań 2020

*Wielce Szanownemu Panu Profesorowi,
doktorowi habilitowanemu Jerzemu Sokalskiemu, mojemu Promotorowi
i Nauczycielowi, bardzo serdecznie dziękuję za okazaną pomoc, życzliwość,
ukierunkowanie mojej działalności naukowo-badawczej, jak i klinicznej
oraz cenne uwagi podczas realizacji rozprawy doktorskiej*

Składam serdeczne podziękowania:

Pani Prof. dr hab. n. farm. Ewie Florek
Kierownik Laboratorium Badań Środowiskowych
*za opiekę, pomoc oraz konsultacje merytoryczne
w celu realizacji niniejszego projektu badawczego*

Pani dr n. farm. Marcie Napierale,
za poświęcony czas oraz pomoc w wykonaniu oznaczeń

*Pracę dedykuję Rodzicom
oraz Mężowi Hubertowi*

Badania finansowane przez:

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z funduszy przeznaczonych w ramach programu „Młodzi Naukowcy”.

Projekt badawczy numer 502-14-02212331-41151.

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	12
1. Wstęp i przegląd piśmiennictwa	13
1.1. Jama ustna	13
1.1.1. Ogólna charakterystyka jamy ustnej	13
1.1.2. Wpływ biofilmu na zdrowie jamy ustnej	14
1.1.3. Metody oceny higieny jamy ustnej	17
1.2. Dym tytoniowy	18
1.2.1. Epidemiologia palenia tytoniu	18
1.2.2. Charakterystyka fizykochemiczna dymu tytoniowego	20
1.2.3. Farmakokinetyka dymu tytoniowego	23
1.2.3.1. Wchłanianie	23
1.2.3.2. Dystrybucja	23
1.2.3.3. Metabolizm	24
1.2.3.4. Wydalanie	26
1.2.4. Wpływ dymu tytoniowego na stan jamy ustnej	27
1.3. Stres oksydacyjny	32
1.3.1. Wolne rodniki tlenowe — ogólna charakterystyka	32
1.3.2. Właściwości reaktywnych form tlenu	34
1.3.3. Mechanizmy obronne przed reaktywnymi formami tlenu	36
1.3.4. Stres oksydacyjny i jego wpływ na organizm człowieka	39
1.4. Ślina jako materiał badawczy	41
1.4.1. Ogólna charakterystyka śliny	41
1.4.2. Wykorzystanie śliny w diagnostyce medycznej	44
2. Cel badań	48
3. Materiał i metody	49
3.1. Materiał	49

3.2. Metody	49
3.2.1. Badanie ankietowe	50
3.2.2. Badanie kliniczne	50
3.2.3. Pobranie materiału badawczego	52
3.2.4. Metody oznaczenia parametrów stresu oksydacyjnego	53
3.2.4.1. Wyznaczenie stężenia białka w ślinie	53
3.2.4.2. Wyznaczenie peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w ślinie	55
3.2.4.3. Wyznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekwiwalentów troloksu (TEAC) w ślinie	56
3.2.4.4. Wyznaczenie produktów utleniania białek w ślinie	57
3.2.5. Metoda wyznaczenia stężenia kotyniny metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową w ślinie.	59
3.2.5.1. Ekstrakcja kotyniny ze śliny do fazy stałej	59
3.2.5.2. Warunki analizy chromatograficznej	60
3.2.5.3. Identyfikacja kotyniny	60
3.2.5.4. Walidacja metody	60
3.2.6. Analiza statystyczna	63
4. Wyniki	64
4.1. Ogólna charakterystyka grupy badanej	64
4.1.1. Rozkład ilościowy oraz wiek pacjentów.	64
4.1.2. Status socjoekonomiczny pacjentów	66
4.2. Status palenia tytoniu — część analityczno-toksykologiczna	69
4.2.1. Intensywność palenia	69
4.2.2. Kotynina	69
4.2.3. Ocena błony śluzowej osób przewlekle palących tytoń	70
4.3. Higiena jamy ustnej — część kliniczna	71
4.3.1. Szczotkowanie zębów	71
4.3.2. Stosowanie nici dentystycznej.	72
4.3.3. Stosowanie szczoteczki międzyzębowej.	73
4.3.4. Stosowanie irygatora wodnego	74
4.3.5. Stosowanie płukanki stomatologicznej	75
4.3.6. Wskaźnik Plaque Index	76
4.3.7. Wskaźnik Aproximal Plaque Index	80

4.4. Parametry stresu oksydacyjnego — część analityczno-biochemiczna	84
4.4.1. Białko	84
4.4.2. Peroksydacja lipidów-TBARS	85
4.4.3. Zdolności antyoksydacyjna ekwiwalentów troloksu — TEAC	86
4.4.4. Produkty utleniania białek — AOPP	88
4.5. Parametry stresu oksydacyjnego a higiena jamy ustnej	89
4.5.1. Porównanie poszczególnych parametrów stresu oksydacyjnego w zależności od higieny jamy ustnej w grupach kontrolnych i badanych	89
4.5.1.1. W zależności od wskaźnika P1I.	89
4.5.1.2. W zależności od wskaźnika API	99
4.5.2. Porównanie poszczególnych parametrów stresu oksydacyjnego w zależności od higieny jamy ustnej pomiędzy grupami	109
4.5.2.1. Według wskaźnika P1I	109
4.5.2.2. W zależności od wskaźnika API	119
4.6. Korelacja pomiędzy kotyniną a parametrami stresu oksydacyjnego	126
5. Dyskusja.	129
6. Wnioski	135
7. Streszczenie	136
8. Summary	139
9. Piśmiennictwo	142
10. Spis tabel i rycin	152
10.1. Tabele	152
10.2. Ryciny	154
11. Aneks	160
11.1. Kwestionariusz badań ankietowych	160
11.2. Karta Badań Pacjentów	162

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

- AOPP . . . produkty utleniania białek — advanced oxidation protein products
- API . . . aproksymalny wskaźnik płytki nazębnej — Approximal Plaque Index
- ATP . . . adenzynotryfosforan — adenosine triphosphate
- CAT . . . katalaza — catalase
- CSA . . . całkowity stan antyutleniaczy
- DNA . . . kwas deoksyrybonukleinowy — deoxyribonucleic acid
- GPX . . . peroksydaza glutationowa — glutathione peroxidase
- GSSG . . . utleniona postać glutation — glutathione disulfide
- HPLC . . . wysokosprawna chromatografia cieczowa — high-performance liquid chromatography
- NK . . . niepalące kobiety
- NM . . . niepalący mężczyźni
- OHI . . . wskaźnik higieny jamy ustnej — oral hygiene index
- p poziom istotności — p-value, probability value
- PII . . . wskaźnik płytki bakteryjnej — plaque index
- pH . . . ujemny logarytm ze stężenia jonów wodorowych — negative logarithm of the activity of the hydrogen ion
- PK . . . palące kobiety
- PM . . . palący mężczyźni
- r współczynnik korelacji — correlation coefficient
- RFT . . . reaktywne formy tlenu — reactive oxygen species
- SD . . . odchylenie standardowe — standard deviation
- SF . . . ciągły przepływ śliny — salivary flow
- SOD . . . dysmutaza ponadtlenkowa — superoxide dismutase
- TAC . . . całkowita ilość antyoksydantów — total antioxidant capacity
- TBARS . . . peroksydacja lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym — thiobarbituric acid reactive substances
- TEAC . . . całkowita zdolność antyoksydacyjna ekwiwalentów troloksu — trolox Equivalent Antioxidant Capacity
- WHO . . . Światowa Organizacja Zdrowia — World Health Organization

1. Wstęp i przegląd piśmiennictwa

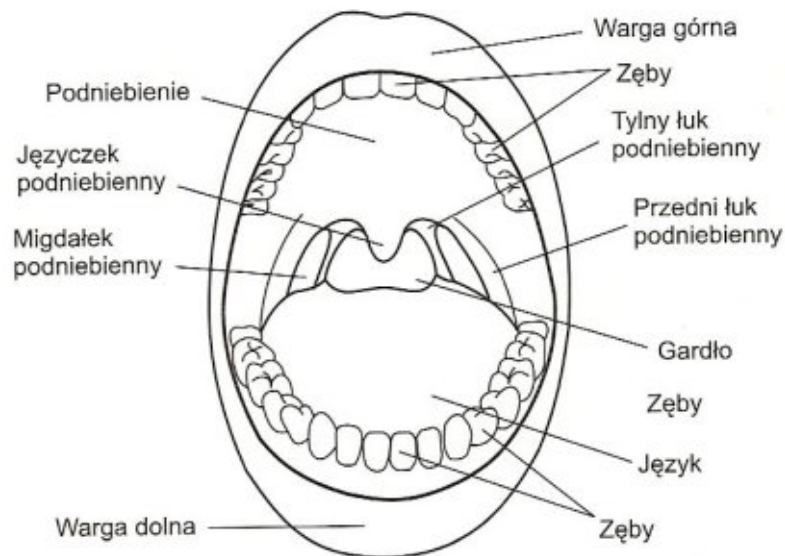
1.1. Jama ustna

1.1.1. Ogólna charakterystyka jamy ustnej

Jama ustna stanowi pierwszy odcinek górnego przewodu oddechowo- pokarmowego. Podstawową jej funkcją jest inicjowanie procesu trawienia poprzez ślinę i zawarte w niej enzymy trawienne, oraz formowanie i przygotowywanie kęsa pokarmowego, który kolejno trafia do dalszych odcinków przewodu pokarmowego [Probst et al., 2006; Van de Water et al., 2006]. Dodatkowo jama ustna wchodzi w skład drugiego ważnego dla całego organizmu układu, jakim jest układ oddechowy. Wraz z jamą nosową, częścią nosową gardła, gardłem środkowym oraz krtanią.

Jama ustna zaliczana jest również do organów chemosensorycznych. Dzięki ruchliwości warg oraz języka ma kluczowe znaczenie w modyfikacji dźwięków, dzięki czemu powstaje mowa, śpiew, gwizd, ale również odruchy obronne takie jak kaszel czy odkrztuszanie. Umożliwia prawidłową komunikację behawioralną człowieka poprzez uśmiechanie się, całowanie, dąsanie czy obrażanie. Nawet drobne zakłócenia w prawidłowym funkcjonowaniu jamy ustnej mogą poważnie zagrozić jakości życia człowieka [Van de Water et al., 2006]

Jama ustna ma kształt owalny i poprzez wyrostki zębodołowe szczęk i część zębodołową żuchwy podzielona jest na przedsionek jamy ustnej oraz jamę ustną właściwą [Snow et al., 2009]. Ku przodowi jama ustna otwiera się szparą ust, natomiast ku tyłowi kończy cieśnią gardzieli. W skład jamy ustnej wchodzi: wargi, zęby, dziąsła, trójkąt zatrzonowcowy, język, policzki, podniebienie twarde i miękkie, błona śluzowa wyściełająca całą jamę ustną oraz małe gruczoły ślinowe (rycina 1).



Rycina 1. Schematyczna budowa jamy ustnej. Źródło: <http://www.anatomy.cba.pl>

W ścisłym związku ze strukturami jamy ustnej znajdują się trzy pary głównych gruczołów ślinowych. Ich przewody wyprowadzające lokalizują się w przypadku ślinianek przyusznych w przedsionku jamy ustnej, natomiast ślinianek podżuchwowych i podjęzykowych w jamie ustnej właściwej.

1.1.2. Wpływ biofilmu na zdrowie jamy ustnej

W środowisku naturalnym bakterie mogą występować w postaci pojedynczej komórki, czyli w postaci planktonu lub jako zorganizowane kultury tworząc biofilm [Li et al., 2001]. Zdolność bakterii do bytowania w postaci błon biologicznych ma istotne znaczenie w patogenezie wielu chorób zakaźnych i wpływa na zjadliwość drobnoustrojów oraz podatność na leczenie farmakologiczne [Czaczyk et al., 2007; Wojowicz et al., 2007]. Większość gatunków występujących w biofilmie posiada zwiększoną wirulencję oraz zmniejszoną podatność na leczenie antybakteryjne [Roberts et al., 2010].

Jama ustna człowieka stanowi środowisko jałowe wyłącznie przez kilka minut po urodzeniu. Następnie zostaje skolonizowana przez drobnoustroje pochodzące głównie od matki drogą wertykalną [Berkowitz et al., 2006]. Jama ustna stanowi zróżnicowane środowisko bytowania drobnoustrojów. Na policzkach, wargach, podniebieniu, dziąsłach, języku, zębach, znajdują się charakterystyczne dla nich zbiorowiska bakterii [Szewczyk et al., 2007]. Zróżnicowanie to wynika z obecności dwóch podstawowych mikrośrodków występujących w jamie ustnej, to znaczy na powierzchniach twardych (zęby)

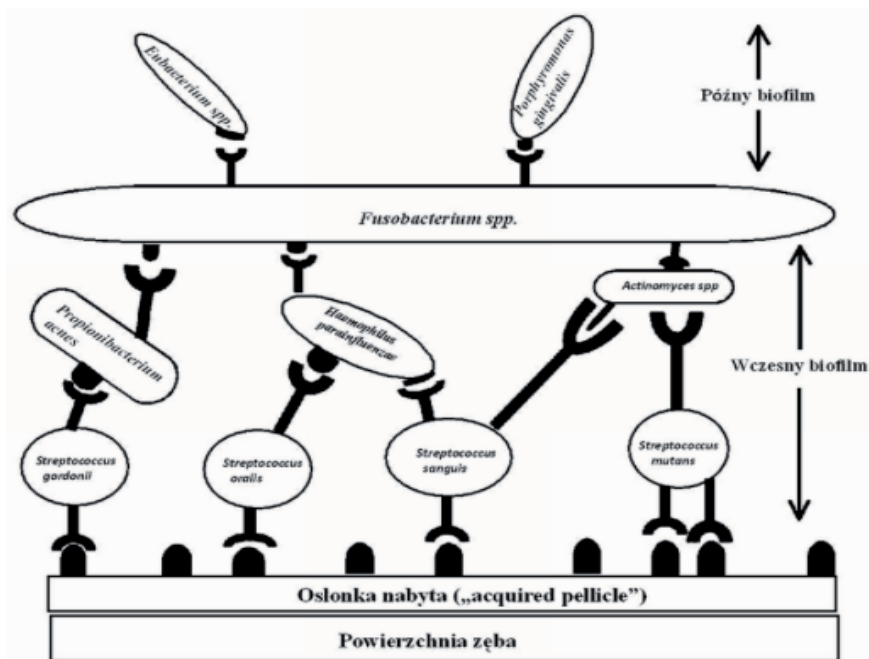
i miękkich. Dodatkowo w każdym mikrośrodku znajdują się podtypy powierzchni. W przypadku tkanek miękkich wyróżniamy powierzchnię gładką na przykład podniebienie czy policzki lub szorstką, brodawkowatą powierzchnię języka. Twarde tkanki zęba są również zróżnicowane pod kątem anatomicznym. Wyróżniamy powierzchnie gładkie wolne i styczne oraz bruzdy i zagłębienia czy odsłonięte części korzenia. Duże różnice w składzie biofilmu u tej samej osoby, występują nie tylko na poszczególnych powierzchniach zęba, ale nawet w obrębie sąsiadujących struktur o tej samej budowie [Smeets et al., 2014].

Jamę ustną kolonizuje około 700 gatunków bakterii, a zdecydowana większość z nich tworzy płytkę bakteryjną. Płytkę nazębna (dental plaque), to jeden z najlepiej poznanych biofilmów w organizmie człowieka [Marsh, 2006; Kolenbrander et al., 2002]. Płytkę stanowi złóg ściśle przylegający do twardej powierzchni zęba, a usunięcie jego możliwe jest tylko w przypadku stosowania metod mechanicznych.

W jamie ustnej wyróżnia się dwa typy biofilmu znajdującego się na zębach: nad- i poddziąsłowego. Różnią się one znacząco pod względem rodzaju występujących w nich mikroorganizmów. Naddziąsłowa płytka bakteryjna zdominowana jest przez Gram-dodatnie paciorkowce takie jak *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. Mottis*, *Lactobacillus*. Poddziąsłowa zaś to przede wszystkim Gram-ujemne beztlenowce takie jak *Actinobacillus*, *Camylobacter spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*.

Proces powstawania płytki nazębnej jest wieloetapowy. Zaobserwowano fazę odwracalnej i nieodwracalnej adhezji, dojrzewania oraz dyspersji.

Adhezja mikroorganizmów bytujących w jamie ustnej rozpoczyna się od zasiedlania glikoproteinowej osłonki, która pokrywa zęby. Powstaje ona z glikoprotein, fosfoprotein i lipidów zawartych w ślinie. W pierwszym odwracalnym etapie adhezji znaczenie mają siły van der Walsa oraz przyciąganie hydrofobowe. Kolejno bakterie poprzez wytworzenie zewnątrzkomórkowych polisacharydów, takich jak glukany i fruktany tworzą matrycę płytki nazębnej mocno wiążąc ją z podłożem. Wytworzenie warstwy matrix ułatwia absorpcję cząstek organicznych i powoduje adhezję nieodwracalną mikroorganizmów [He et al., 2009; Marsh, 2006]. Schemat przestrzenny tworzenia się płytki nazębnej przedstawia rycina 2. Z biegiem czasu dochodzi do różnicowania i dojrzewania płytki nazębnej. Dojrzała płytka nazębna jest strukturą trójwymiarową. W bruzdach i zagłębieniach zębów są to struktury przypominając palisady, natomiast na powierzchniach gładkich „kolby kukurydzy” [Ferejskov et al., 2006]. Starzenie się płytki bakteryjnej znacznie zmienia warunki panujące wewnątrz biofilmu. Obserwuje się zjawisko



Rycina 2. Model czasoprzestrzenny tworzenia się płytki nazębnej.
Źródło: Eick et al., 2012

sukcesji bakteryjnej w której stała flora bakteryjna zostaje zastąpiona inną, lepiej dopasowaną do nowych warunków.

Należy zwrócić szczególną uwagę, iż bakterie znajdujące się w biofilmie stanowią doskonale zorganizowaną społeczność. Bakterie współpracują ze sobą w celu pozyskania energii [Baranowska et al., 2008; Jaworski et al., 2005]. Biofilm zbudowany jest z mikrokoloni, które połączone są ze sobą przez liczne kanały wypełnione płynem. Płyn ten krążąc pomiędzy mikrokoloniami dostarcza składniki odżywcze, usuwa metabolity i ułatwia wymianę materiałem genetycznym [Roberts et al., 2010; Kołwzan, 2001].

Rola płytki bakteryjnej w etiologii chorób przyzębia i próchnicy jest poznana. Za choroby dziąseł i tkanek przyzębia odpowiedzialny jest głównie biofilm poddziąsłowy [Abuslume et al., 2013], natomiast za chorobę próchnicową biofilm naddziąsłowy [He et al., 2009].

Najczęściej w wyniku zaniedbań higienicznych, zaistnienia dodatkowych czynników ułatwiających akumulację płytki nazębnej (nawisające wypełnienia, uzupełnienia protetyczne itd.), częstym spożywaniem cukrów ulegających fermentacji, zmianom w wydzielaniu śliny gospodarza dochodzi do zaburzenia naturalnej równowagi pomiędzy stałą mikroflorą jamy ustnej, a podatnymi tkankami zęba czy tkanek przyzębia [Marsh, 1994]. Zjawisko to odpowiada za powstanie choroby próchnicowej, choroby przyzębia, ale także ma wpływ na skuteczność leczenia stomatologicznego.

Biofilm, czyli płytka nazębna, znajduje się również na materiałach stosowanych do odtworzenia twardych tkanek zęba, na stałych czy ruchomych uzupełnieniach protetycznych, aparatach ortodontycznych [Eick et al., 2004] oraz wokół wszczepów stomatologicznych (implantów zębowych) pograżonych w tkance kostnej [Smeets et al., 2014].

1.1.3. Metody oceny higieny jamy ustnej

Zwalczanie płytki bakteryjnej odgrywa największą rolę zarówno w zapobieganiu jak i w leczeniu chorób jamy ustnej. Eliminację nalotów nazębnych prowadzić można poprzez zapobieganie ich powstawaniu albo poprzez ich prawidłowe usuwanie. Nauczanie pacjenta właściwego oczyszczania zębów oraz całej jamy ustnej powinno składać się z trzech elementów: motywacji, instruktażu oraz kontroli. Po zmotywowaniu pacjenta oraz zwizualizowaniu czym skutkuje brak prawidłowej higieny, cały zespół stomatologiczny powinien wskazać odpowiednie przybory higieniczne i nauczyć pacjenta prawidłowego ich użytkowania. Rolą lekarza stomatologa jest dokładne monitorowanie wysiłku pacjenta i regularna ocena higieny jamy ustnej [Jańczuk, 2007].

Do oceny stanu higieny jamy ustnej służą: wskaźniki higieny jamy ustnej, preparaty pomocne w wybarwianiu płytki bakteryjnej oraz niektóre aparaty pomocnicze.

Do najczęściej wykorzystywanych przez lekarzy stomatologów wskaźników higieny należą:

- wskaźnik higieny jamy ustnej (OHI),
- wskaźnik płytki bakteryjnej (PII),
- aproksymalny wskaźnik płytki nazębnej (API).

Stan jamy ustnej każdego pacjenta odzwierciedla wartość wskaźników wyliczonych na początku leczenia stomatologicznego. Zaangażowanie pacjenta w proces leczenia stomatologicznego mierzalny jest wielkością wskaźników stomatologicznych oznaczanych podczas regularnych wizyt kontrolnych. Podczas każdej wizyty stomatologicznej pacjent powinien zostać poddany badaniu z użyciem wszystkich trzech wskaźników, ponieważ każdy z nich skupia się na innej powierzchni zęba i innej cesze. Wskaźnik API odpowiedzialny jest za ocenę obecności płytki w przestrzeniach międzyzębowych, a więc miejscem najtrafniejszym do monitorowania higieny jamy ustnej. Wskaźnik najmniej czasochłonny i najczęściej polecany do oceny higieny jamy ustnej. Kolejny wskaźnik płytki bakteryjnej (PII) służy do oceny grubości płytki bakteryjnej umiejscowionej w okolicy szyjki zęba, a wskaźnik OHI, ocenia zarówno obecność kamienia nazębnego jak i osadów [Jańczuk, 2004].

Dodatkowo do oceny higieny jamy ustnej służą preparaty wybarwiające płytkę bakteryjną. Preparaty te występują w formie tabletek lub płynów. Mogą być one stosowane w gabinecie i w warunkach domowych. Fuksyna wybarwia płytkę na kolor fioletowo-czerwony. W gabinecie stomatologicznym używa się fluoresceinę, która w wiązce światła nadfioletowego dokładnie ocenia płytkę bakteryjną. Użycie aparatu Parograph rejestruje i demonstruje pacjentowi na wyświetlaczu stan uzębienia poprzez ukazanie zębów z aktywną próchnicą, przyzębia, poprzez obliczenie wskaźnika krwawienia z kieszeni dziąsłowych oraz higieny jamy ustnej przez obliczenie API. Przedstawione metody pozwalają na dodatkową motywację w podniesieniu higieny jamy ustnej [Jańczuk, 2007].

1.2. Dym tytoniowy

1.2.1. Epidemiologia palenia tytoniu

Pomimo przeprowadzania wielu akcji uświadamiających społeczeństwo na temat szkodliwości dymu tytoniowego na stan zdrowia człowieka, palenie papierosów jest nadal najbardziej rozpowszechnionym nałogiem na świecie [Das, 2003]. Tytoń w formie palonej albo do żucia to jedyny legalny narkotyk, który stosowany zgodnie z zamierzeniami producenta stopniowo zabija swoich użytkowników. Według Światowej Organizacji Zdrowia w całej populacji ludzkiej pali około 1 miliarda mężczyzn i około 250 miliona kobiet [The European Tobacco Control Report, World Health Organisation, 2007]. WHO oszacowało, iż palenie bierne i czynne odpowiedzialne jest za śmierć około 6 mln ludzi rocznie. Pomimo, iż ilość wypalanych papierosów w przeciągu ostatnich 20 lat, w krajach wysoko rozwiniętych spadła o 20%, to w krajach rozwijających stale wzrasta o 3,5% rocznie [Townesend et al., 1994]. Obliczono, iż do 2025 roku na świecie nałogowo palić będzie około 1,6 miliarda ludzi [The European Tobacco Control Report, World Health Organisation, 2008; Peto et al., 1994; Seńczuk, 2005].

Integralnie ze stosowaniem tytoniu w formie palonej pojawia się zjawisko nazywane na świecie jako „second hand smoker”, a w Polsce biernym paleniem. Jest to trzecia, zaraz po picciu alkoholu i aktywnym paleniu, przyczyna zgonów związanych z uzależnieniem. Osoba niepaląca znajdująca się przez godzinę w zadymionym, niewielkim pomieszczeniu, przyswaja podobną ilość substancji toksycznych (np. nitrozamin) co człowiek aktywnie palący podczas zaciągania się jednym papierosem z filtrem. Niestety głównym miejscem narażenia na bierne palenie jest środowisko domowe, a problem ten dotyka

często małe dzieci i młodzież. Człowiek poddany zjawisku biernego palenia ma wyższe o 15% ryzyko zgonu, w porównaniu do osoby bez ekspozycji [Glantz et al., 1991].

Problem nałogowych palaczy, czyli osób wypalających powyżej 5 papierosów dziennie, niestety dotyczy w głównym stopniu osób młodych. Zaobserwowano, iż liczba palaczy w przedziale wiekowym 15–25 jest mocno zróżnicowana geograficznie. W krajach wysoko rozwiniętych, w tej grupie wiekowej, zdecydowana większość palaczy to kobiety. Odsetek kobiet palących codziennie wyniósł 36–37% w Austrii i Wielkiej Brytanii, 31% w Hiszpanii i we Włoszech, natomiast około 9% w Rumuni czy Estonii. Palący mężczyźni dominowali za to w krajach rozwijających się. Około 45% paliło na Łotwie i w Estonii, a 30% w Rumunii. Polska wpisuje się w wyżej przedstawione zróżnicowanie geograficzne, ponieważ odsetek młodych palących kobiet wynosi 15%, natomiast 30% wśród mężczyzn. Przeróżający jest fakt, iż co drugi palący nastolatek deklaruje chęć kontynuowania palenia tytoniu w wieku dojrzałym [The life of women and male in Europe, Eurostat, 2008].

W grupie wiekowej pomiędzy 25. a 64. rokiem życia nie zaobserwowano znacznego zróżnicowania palenia tytoniu związanego z płcią. Liczba palaczy kształtuje się za to w zależności od kraju. Palący mężczyźni dominują w Estonii i na Łotwie (ponad 56%), w Bułgarii i Grecji około 50%, natomiast na Słowacji wynosi 36%. Mniejszy odsetek palaczy występuje w Irlandii — 24% i w Szwecji — 19%. Różnica w poszczególnych krajach w tej grupie wiekowej wśród kobiet wahała się w mniejszym stopniu. Najwięcej kobiet palaczy odnotowano w Danii i Austrii około 35%, najmniejszy zaś w Portugalii, Słowacji i Cyprze — około 15%. W Polsce pali około 27% kobiet oraz około 38% mężczyzn [The life of women and male in Europe, Eurostat, 2008].

W najstarszej grupie wiekowej, to znaczy pomiędzy 65. a 74. rokiem życia, zdecydowanie dominują palacze mężczyźni przede wszystkim w Dani — 30%, Słowenii — 25% i na Litwie — 20%. Wśród kobiet, najwięcej palących w tej grupie wiekowej, mieszka w Dani — około 30% [The life of women and male in Europe, Eurostat, 2008].

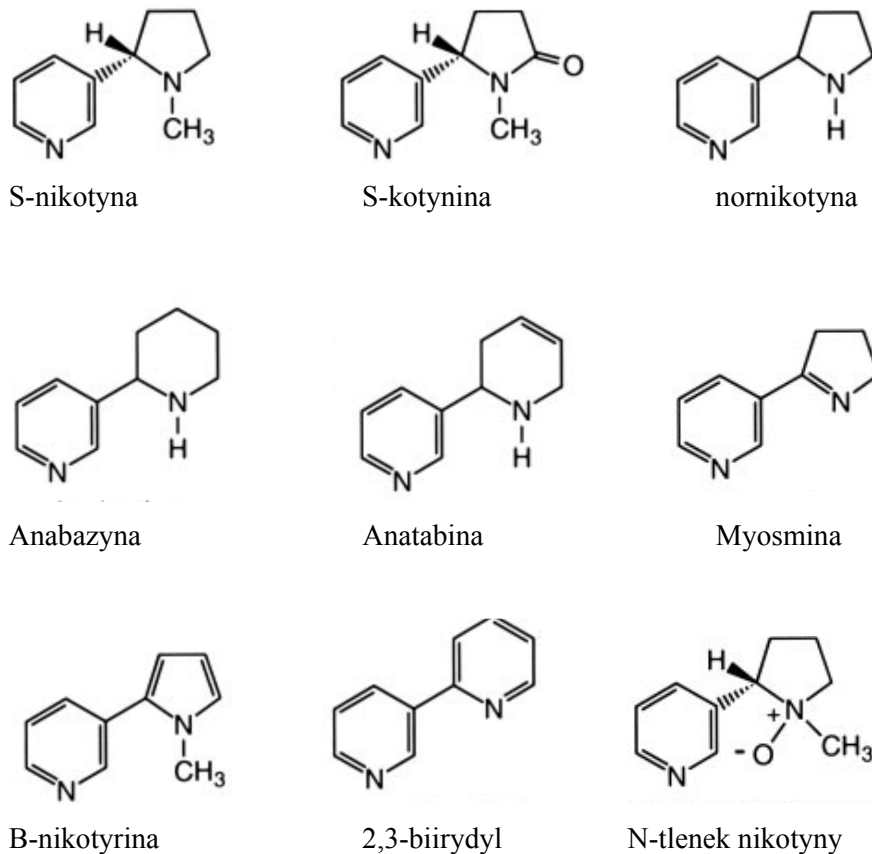
Szczególne uwagę należy zwrócić na strukturę populacji palącej pod kątem wykształcenia i statusu ekonomicznego. Z badań wynika, iż zarówno w krajach Europy, jak i w Polsce, ludzie niewykształceni i biedni wypalają zdecydowanie więcej papierosów, niż ludzie bogaci i światli. Nałóg palenia na całym świecie wymaga wysokich nakładów materialnych, statystycznie w grupie osób zamożnych znajdujemy dwa razy mniej palaczy, w stosunku do osób uzyskujących najniższe dochody. Uważa się, że zdrowotne, społeczne i ekonomiczne następstwa palenia w najbliższych 15 latach będą się jeszcze potęgowały [Zieliński et al., 2008].

Analizując przedstawione statystyki dotyczące palenia w Europie, Polskę zakwalifikować można na pośrednim miejscu pomiędzy krajami rozwiniętymi, a rozwijającymi się. W Polsce największy problem dotyczy rozpowszechnienia nałogu wśród młodzieży oraz tak zwanych młodych dorosłych. Szacuje się, iż dziennie około 500 młodych ludzi sięga po papierosa i rozpoczyna palenie [Florek et al., 1999].

1.2.2. Charakterystyka fizykochemiczna dymu tytoniowego

Dym tytoniowy powstaje podczas niecałkowitego spalania nikotyny wchodzącej głównie w skład papierosów oraz innych wyrobów tytoniowych, takich jak fajka, cygara, cygaretki. Podczas procesu spalania nikotyny zachodzi wiele reakcji fizycznych, chemicznych i fizykochemicznych do których zaliczamy: sublimację, kondensację, pirolizę, utlenianie, redukcję, destylację, dehydratację, dekarboksylację [Florek, Piekoszewski, 2000; Violla et al., 1998].

Głównym surowcem pozyskiwania nikotyny są rośliny *Nicotiana L.*, pochodzące z rodziny *piankowatych*. Cała rodzina obejmuje około 100 gatunku roślin [Jussieu, 2001], natomiast w celu wykorzystywania roślin w przemyśle tytoniowym użytkuje się



Rycina 3. Alkaloidy zawarte w liściach nikotyny. Źródło: Benowitz et al., 2005

dwa gatunki: tytoń szlachetny *Nicotina Tabacum* oraz *Nicotina Rustika L* [Wójcińska et al., 2001]. Najważniejsze alkaloidy zawarte w liściach nikotyny przedstawia rycina 3.

Dym tytoniowy składa się z ponad 4000 poznanych związków chemicznych, natomiast ponad 40 z nich są to substancje rakotwórcze [Florek et al., 2008]. Analiza składu chemicznego dymu tytoniowego dodatkowo wykazała obecność kilkuset niezidentyfikowanych substancji. Różnorodność składu chemicznego zależy od wykorzystanego rodzaju tytoniu, temperatury żarzenia, wilgotności, substancji aromatyczno-zapachowych oraz zmniejszających działanie drażniące. Najczęściej skład ten różni się w zależności od producenta oraz zazwyczaj jest on przez niego ściśle zastrzeżony [Florek, Piekoszewski et al., 2000; Florek et al., 1996; Hoffman et al., 1994]. Substancje, które stanowią największe zagrożenie dla organizmu, zwyczajowo dzieli się na grupy według negatywnego wpływu na organizm żywy (tabela 1).

Tabela 1. Podział substancji toksycznych znajdujących się w dymie tytoniowym. Źródło: IARC Monographs vol. 83, 2004

Grupa substancji szkodliwych	Mechanizm działania	Przykłady substancji znajdujących się w dymie tytoniowym
Toksyczne	Wywołują zaburzenie funkcji lub śmierć komórek, narządów lub całego organizmu po dostaniu się w ich pobliże	Tlenek węgla, cyjanowodór, amoniak, tlenki azotu
Drażniące	Podczas krótkotrwałego, długotrwałego lub wielokrotnego kontaktu z błoną śluzową wywołują stany zapalne	Akroleina, tlenek siarki, amoniak, formaldehyd
Ciliotoksyczne	Hamowanie aktywności enzymów oddechowych oraz ruchu rzęsek wyścielające drogi oddechowe	Cyjanowodór, akroleina, aldehyd octowy, formaldehyd
Kokancerogeny	Samodzielnie nie wykazują działania rakotwórczego, aczkolwiek przy obecności małej ilości kancerogenów wzmacniają ten proces	Formaldehyd, piren, fluoranten, naftaleny, katechol
Karcynogeny	Przez mutację materiału genetycznego bezpośrednio wpływają na rozwój choroby nowotworowej	Benzen, dwumetylonitrozoamina, etylometylonitrozoamina, dwuetylonitrozoamina, nitrozopirolidyna, hydrazyna, chlorek winylu
Inicjatory kancerogenezy	Substancje, które przez inicjację rozpoczynają wieloetapowy proces kancerogenezy	Toluen, fenol, uretan

Pod względem fizycznym dym tytoniowy jest aerozolem, a składa się z trzech złożonych faz, takich jak: faza parowa, faza cząsteczkowa i faza gazowa [Florek, Piekoszewski, 2000]. Faza gazowa stanowi około 80–90% całej masy dymu. W fazie tej znajduje się około 400–500 substancji, a składa się głównie z azotu, tlenków azotów, dwutlenku i tlenu

węgla oraz tlenu, amoniaku, formaldehydu, cyjanowodoru, aldehydu octowego, pirydyny, nikotyny, kotyniny, ksylenu oraz wolnych rodników. W skład fazy parowej, która często mylona jest z fazą gazową, wchodzi toluen, benzen, hydrazyna, kwas mrówkowy, aceton, kwas octowy i tlenek azotu. Faza cząsteczkowa składa się z aerozolu z cząsteczkami o średnicy pomiędzy 0,1–0,8 μm , a zawiera w sobie około 3500 zidentyfikowanych substancji. Większość z nich stanowią alkaloidy pirydynowe, a w szczególności nikotyna oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), alkohole, fenole, pierwiastki promieniotwórcze, kwasy organiczne. [Florek, 1996 Hoffman, 1994; Sheridan, 1998].

Podczas palenia papierosa wyróżnia się dwa rodzaje strumienia dymu: główny (ang. mainstream smoke; MS) oraz poboczny (ang. sidestream smoke; SS). Strumień główny (MS) powstaje podczas procesu zaciągania przy temperaturze około 800–900°C i inhalowany jest przez palacza. Strumień poboczny generowany jest w przerwach pomiędzy zaciąganiem, podczas tlenienia się wyrobu tytoniowego [WHO, Air Quality Guidelines, 1998; Piekoszewski, Florek, 2001]. Temperatura osiągalna przy strumieniu bocznym wynosi około 600°C. Podczas przebywania w obecności palacza powstaje również trzeci rodzaj strumienia dymu, który stanowi zagrożenie dla osoby niepalącej [Viala, 1998; WHO, 1998; Piekoszewski i Florek 2006]. Jest to tak zwany environmental tobacco smoke (ETS), który stanowi połączenie bocznego strumienia dymu oraz dymu wydychanego przez palacza do otaczającego środowiska (tabela 2) [Brownson et al., 1997]

Tabela 2. Właściwości fizyko-chemiczne strumienia dymu głównego i bocznego dla papierosów bez filtra. Źródło: Florek i Piekoszewski 2006

Parametr	Strumień główny MS	Strumień boczny SS
Temp. stożka papierosa	860–900°C	500–650°C
Temp. wciągane dymu	20–50°C*	20–60°C**
pH	5,8–6,2***	6,8–7,5***
Ilość cząsteczek/cm ³	5x10 ⁹	10 ⁵ –10 ⁶
Średnica cząstek (μm)	0,2 (0,1–1,0)	0,5 (0,1–1,5)
Ilość polidispersyjnych cząstek stałych/cm ³	2–3x10 ¹⁰	n.o.
Masa całkowita (mg)	500	n.o.
Masa fazy cząsteczkowej dymu	20–30	25–40

* pierwsze zaciągnięcie 20°C, ostatnie zaciągnięcie 50°C

** 8 mm z wypalonego stożka

*** tytoń typu Virginia lub mieszanka tytoniu; tytoń papierosowy ciemny pH MS 6,6–7,1, pH SS 7,5–8,7

n.o. nie określono

1.2.3. Farmakokinetyka dymu tytoniowego

1.2.3.1. Wchłanianie

Średnia zawartość tytoniu w jednym papierosie wynosi 0,8–1,0 g, co stanowi około 9–17 mg nikotyny. W trakcie palenia produktu tytoniowego około 1–2 mg nikotyny zostaje wchłonięta do krwioobiegu, natomiast pozostałą część ulega spaleni [Samochowicz et al., 2001]. Wchłanianie nikotyny przez błony śluzowe organizmu zależy przede wszystkim od pH środowiska. Szybkość absorpcji wzrasta wraz ze wzrostem pH, ponieważ wzrasta ilość nienaładowanej nikotyny, która mając charakter lipidowy łatwo rozpuszcza się w błonach komórkowych i łatwo przez nie przenika [Yilidiz et al., 2004]. U osób nieprawidłowo zaciągających się papierosem dym tytoniowy utrzymuje się głównie w jamie ustnej. W tym przypadku nikotyna przede wszystkim absorbowana jest przez błonę śluzową policzków. Ze względu na utrzymujące się dość niskie pH w tej jamie ciała, nikotyna wchłania się z tej lokalizacji w niewielkim stopniu [Yilidiz et al., 2004]. Zdecydowanie inaczej wchłanianiałość nikotyny rozkłada się u osób prawidłowo zaciągających się. W takim przypadku głównym miejscem wchłaniania dymu stanowią pęcherzyki płucne. Z uwagi na dużą ich ilość oraz cienką barierę powietrze-krew absorpcja nikotyny z dymu zachodzi z dużą wydajnością [Benowitz et al., 1984; Gori et al., 1985]. Zazwyczaj tą drogą do krążenia dostaje się około 1 mg nikotyny. Biodostępność nikotyny zależy od wyrobu tytoniowego. Po zakończeniu wypalania papierosa ilość nikotyny we krwi gwałtownie obniża się.

Warto wspomnieć, iż wchłanianiałość nikotyny z powierzchni skóry jest doskonała, co może wywołać ryzyko zatrucia typu „green tobacco sickness” [McBride et al., 1998], natomiast z przewodu pokarmowego wchłanianiałość ta jest niska.

1.2.3.2. Dystrybucja

Po absorpcji nikotyny do krwi część dawki (69%) występuje w postaci zjonizowanej, natomiast 31% w niezjonizowanej. Wszystkie składniki dymu tytoniowego poprzez transport w krwioobiegu rozprowadzane są po całym organizmie. W zaledwie kilku minut nikotyna wykazuje duże stężenie w mózgu, krwi tętniczej, płucach, natomiast niskie w tkance tłuszczowej i mięśniach [Florek, Piekoszewski, 2006]. W zależności od pH środowiska zaobserwować można kumulowanie nikotyny w soku żołądkowym oraz w ślinie. Szczególną uwagę należy zwrócić na fakt, iż składniki dymu tytoniowego, a w tym kancerogenna nikotyna, swobodnie przenikają przez łożysko i nagromadzą się zarówno w krwi pępowinowej jak i płynie owodniowym [Luck et al., 1982].

Bezpośrednio po wypaleniu papierosa stężenie nikotyny w surowicy zwiększa się do 20–30 ng/ml, a po upływie około 10 minut spada o połowę ze względu na dystrybucję do tkanek i narządów. Przez kolejne 2 godziny poziom jej znacznie obniża się dzięki metabolizmowi w wątrobie [Jauniaux et al., 1999].

1.2.3.3. Metabolizm

Wątroba, a dokładnie hepatocyty, w 90% odpowiedzialne są za metabolizm nikotyny w organizmie człowieka [Hukkanen, et al. 2005]. Szlaki przemian metabolicznych wykazują bardzo duży stopień różnorodności w zależności od płci, wieku, uwarunkowań rasowych i etnicznych oraz chociażby od diety [Florek, Piekoszewski, 2006].

Nikotyna, pomimo dość prostej budowy chemicznej, po przedostaniu się do hepatocytu, ulega jak wszystkie ksenobiotyki, reakcjom prowadzącym do jej unieszkodliwiania, zwiększenia rozpuszczalności oraz wydalenia [Yilidz et al., 2004]

Biotransformacja nikotyny składa się z dwóch etapów. W pierwszej fazie następuje przekształcenie substancji pierwotnej w związki polarne na drodze utleniania, hydrolizy i redukcji. Kolejno, w drugim etapie, dochodzi do powstania nieaktywnych, przygotowanych do wydalenia związków.

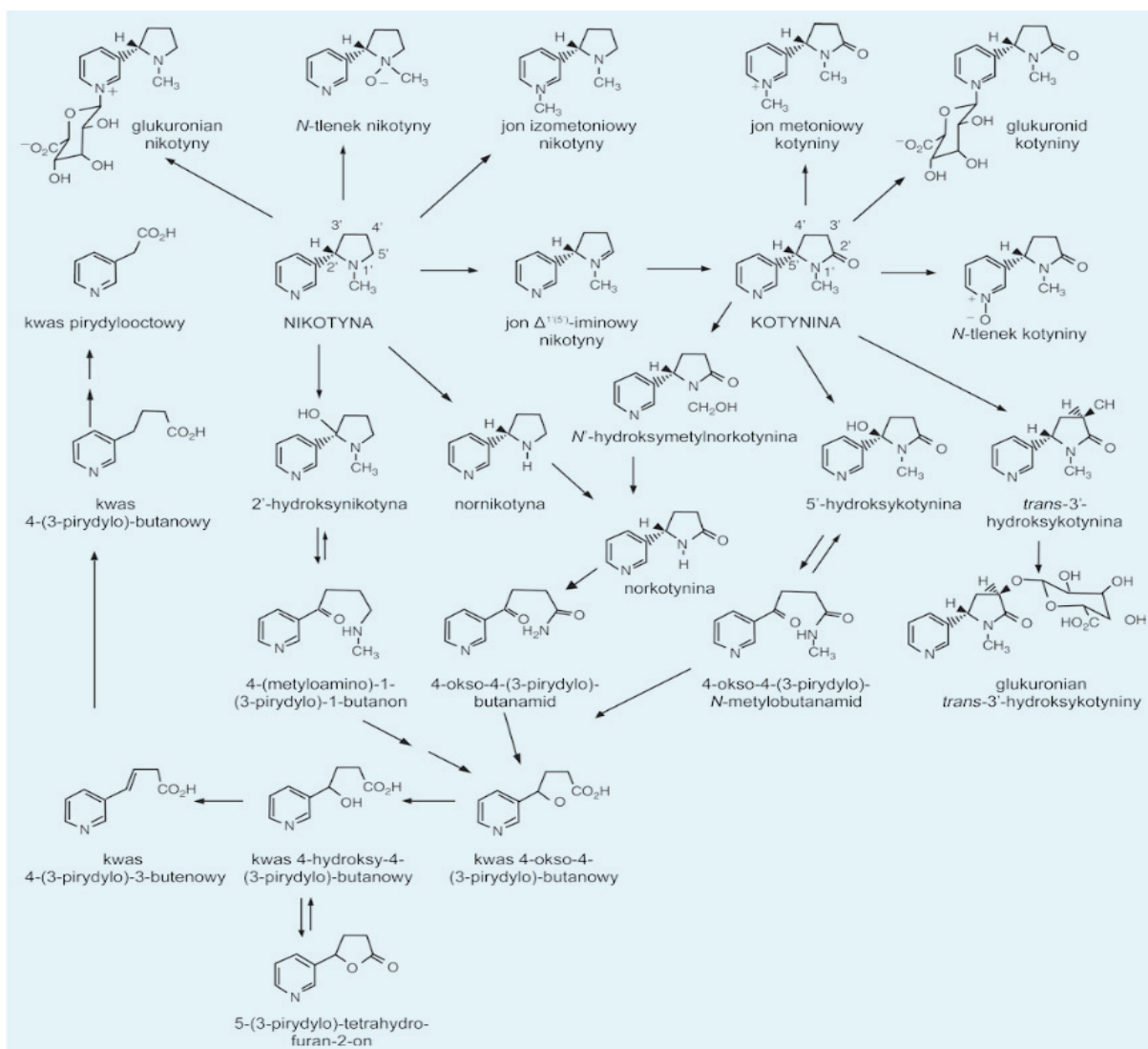
Najważniejszym metabolitem nikotyny, u większości gatunków ssaków, jest pochodna laktomowa kotynina. Mechanizm przekształcenia nikotyny w kotyninę polega na jej hydroksylacji, przez enzymy mikrosomalne hepatocytów, następnie konwersji do odpowiedniego aldehydu oraz produkcji kotyniny przez enzymy cytoplazmatyczne. Kluczową rolę w metabolizmie nikotyny odgrywa oksydaza cytochromu P450. Jej izoenzym CYP2A6 odpowiada za utlenianie kotyniny i nikotyny. Zaobserwowano, iż występuje korelacja pomiędzy szybkością utleniania, a poziomem CYP2A6. Stąd, im stężenie izoenzymu jest wyższe tym metabolizm nikotyny przebiega szybciej. Występują dwa znaczące inhibitory CYP2A6 do których zaliczamy kumarynę i metoksalen [von Weymarn et al., 2012].

Analizując etapy metabolizmu nikotyny jako pierwszą obserwuje się reakcję przemiany nikotyny do jonu iminowego, a następnie przekształcenie go na drodze C-oksydacji do kotyniny. Początkowo pierścień pirolidinowy ulega hydroksylacji i oksydacji, a kolejno ulega stopniowej degradacji do kasu 3-pirydynylooctowego. Tylko 15% kotyniny wydalana jest bezpośrednio z moczem palacza, pozostała część ulega dalszym przemianom szczególnie do 3-hydroksykotyniny [Yilidz et al., 2004; Hukkanen, et al. 2005].

Norkotynina jest metabolitem powstający zarówno z nikotyny jak i kotyniny, U człowieka enzym CYP2A6 katalizuje powstanie norkotyniny i 5'hydroksykotyniny z koty-

niny, natomiast z nikotyny przebiega to na drodze N- demetylizacji przy udziale cytochromu P450 [Hukkanen, et al. 2005]. Norkotynina występuje również bezpośrednio w liściach tytoniu, ponieważ obserwuje się ją u aktywnie palących jak i u osób stosujących nikotynę przezskórnie [Benowitz et al., 1994].

Nikotyna w 4–7% przypadków jest metabolizowana na drodze N-oksydacji pierścienia pirolidynowego ulegając przemianie do N-tlenku nikotyny [Benowitz et al., 1994]. Proces ten przebiega przy udziale wątrobowych monoooksygenaz flawinowych (FMO3) [Cashman et al., 2002]. Co ciekawe N-tlenek nikotyny nie jest dalej metabolizowany, aczkolwiek ulega ponownej przemianie do nikotyny [Yilidiz et al., 2004; Hukkanen, et al. 2005]. W jelicie grubym ilość N-tlenku nikotyny zredukowana jest przez bakterie tam bytujące. Hipotezę tą potwierdziły badania, które wykazały, iż podanie doodbytniczo nikotyny skutkuje pojawieniem się kotyniny w moczu, natomiast po podaniu doustnym



Rycina 4. Szlak metaboliczny nikotyny. Źródło: Hukkanen et al. 2005

wykazano obecność w moczu zarówno kotyniny i nikotyny [Hukkanen, et al. 2005]. N-tlenek nikotyny wydalany jest z moczem w ilości 2–3%.

Nikotyina metabolizowana jest również na drodze metylacji azotu pierścienia pirymidynowego. Źródło grupy metylowej podczas tej reakcji stanowi S-adenozyl-L-metionina. Katalizatorem tej reakcji jest amino-N-metylotransferaza wątrobowa, w wyniku czego powstaje jon izometnioninowy [Hukkanen, et al. 2005].

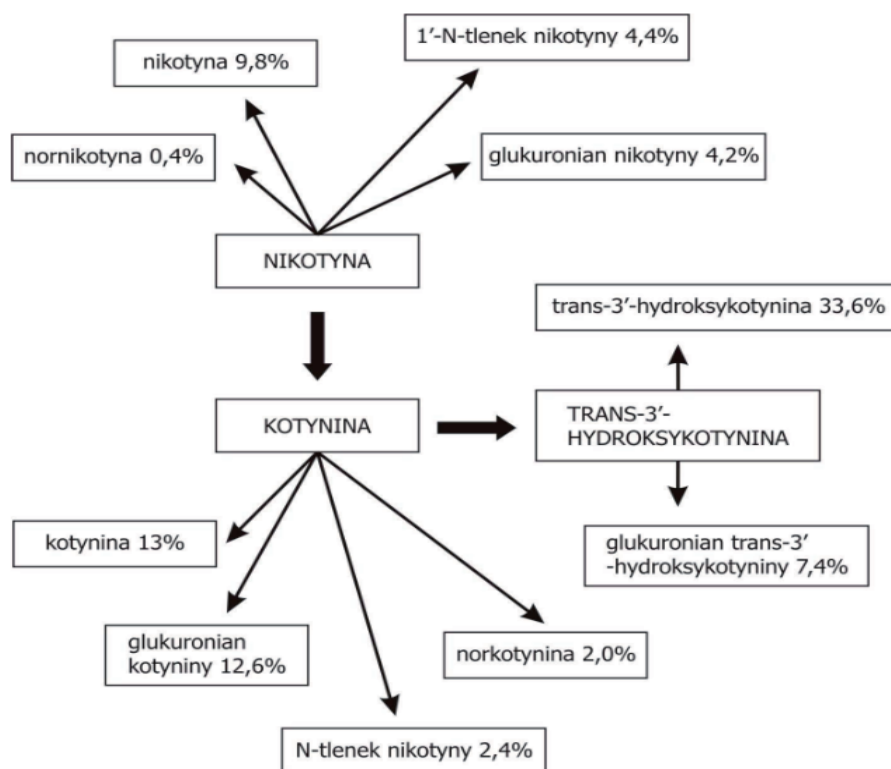
Kolejną drogą metabolizmu nikotyny jest glukuronidacja. Reakcja ta przebiega w wątrobie przy udziale katalizatora jakim jest difosfoglukuronozylotransferazę prowadząc do powstania N-β-glukuronidu nikotyny [Seaton et al., 1993] (rycina 4).

1.2.3.4. Wydalanie

Eliminacja nikotyny zawartej w dymie tytoniowym następuje przede wszystkim poprzez wydychane powietrze, mocz, ślinę, kał, mleko, w przypadku matek karmiących, a co dość istotne kumuluje się we włosach [Al-Delaimy et al., 2002; Kintz et al., 1992].

Nikotyina z organizmu wydalana jest w postaci:

- 70–80% kotynina,
- 4–7% N-tlenek nikotyny,



Rycina 5. Procentowy udział eliminacji metabolitów nikotyny w wydalaniu przyjętej dawki. Źródło: Florek et al 2008

- 3–5% glukuronid.

Kotynina z organizmu wydalana jest w postaci:

- 10–15% przenika w niezmienionej formie do moczu,
- 33–40% trans-3'-hydroksykotyniny,
- 12–17% glukuronianu,
- 7–9% glukuronianu trans'-3-hydroksykotyniny.

Graficzne przedstawienie eliminacji nikotyny i kotyniny przedstawia rycina 5.

Farmakokinetyczne parametry nikotyny przedstawiono w tabeli 3. Klirens całkowity dla nikotyny wynosi 1300 ml/min, natomiast dla jej metabolitu, czyli kotyniny, jest zdecydowanie mniejsza około 45 ml/min [Dempsey et al., 2003; Benowitz, 2003].

Tabela 3. Farmakokinetyczne parametry nikotyny.
Źródło: Benowitz and Jacob, 1982; Benowitz, 1983

Czas biologicznego półtrwania (T _{0,5})	2 godziny
Objętość dystrybucji	180 L
Klirens całkowity	1300 ml/min
Klirens nerkowy	200 ml/min
Klirens pozanerkowy	1,1 ml/min

1.2.4. Wpływ dymu tytoniowego na stan jamy ustnej

Nikotyna, zawarta w dymie tytoniowym, odpowiedzialna jest za wiele jednostek chorobowych. Papierosy odpowiedzialne są za co najmniej jeden na dziesięć zgonów wśród osób dorosłych. Prognozy epidemiologiczne, zakładają, iż w roku 2030 proporcja ta znacznie się pogorszy i dym tytoniowy odpowiedzialny będzie za jeden na sześć zgonów. Wynika z tego, iż palenie papierosów uśmierci około 10 milionów ludzi rocznie [Marszałek, 2007].

Poza niepodważalnym wpływem palenia na cały układ oddechowy oraz krążenia, aktywne oraz bierne palenie, powoduje szereg innych jednostek chorobowych [Kelly, 2002]. Pacjenci często nie wiążą swoich problemów zdrowotnych z innymi układów z nalogiem. Dym tytoniowy powoduje uszkodzenie nerek, kataraktę, osteoporozę, chorobę Leśniowskiego-Crohna, raka trzustki, żołądka, przełyku. U kobiet dochodzi do zaburzeń płodności, cyklu miesięczkowego oraz przyspieszenia menopauzy [Florek, Marszałek, 1999]. Palenie tytoniu w czasie ciąży stanowi ogromne zagrożenie zarówno dla matki, jak i dla dziecka. Noworodki matek palaczek często charakteryzują się niską masą

urodzeniową, opóźnieniem rozwojowym oraz posiadają takie wady rozwojowe jak rozszczep wargi czy podniebienia. Dodatkowo udowodniono, iż w przypadku kobiet palących wzrasta ryzyko umieralności okołoporodowej zarówno dla matki jak i dla dziecka [Ramsay et., 1996; Florek et al., 2003].

Nie tylko aktywne palenie tytoniu, ale również bierne wywołuje patologiczne zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej. Do najczęstszych zmian zalicza się melanozę, leukoedemę, podniebienie palacza, zmiany liszajowate, kserostomię, język włochaty, halitosis, leukoplakię, stomatitis nicotinicą [Michalak et al., 2016].

Dym tytoniowy bezpośrednio wpływa na powierzchniowy nabłonek wielowarstwowy płaski błony śluzowej jamy ustnej. Procesy patologiczne rozpoczynają się na poziomie molekularnym. Obserwuje się zaburzenia wzrostu i uwarstwienia nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Dochodzi do zaburzenia architektoniki wielowarstwowości nabłonka. Jest to obraz histologiczny, który wiązany jest ze stanem zapalnym. Kolejne zmiany dotyczą budowy pojedynczej komórki nabłonka, polegających na zaburzonym stosunku jądro-cytoplazmatycznym, kształtu jądra komórkowego, jego wielkości, a następnie atypii. Klinicznie obraz ten odpowiada stanom przedrakowym leukoplakii i erytroleukoplakii [Fontes et al., 2008].

Według Chandra i Govindraju zmianą występującą najczęściej w jamie ustnej u palaczy, czyli prawie w 60% jest leukoedema [Chanda et al., 2012; Gupta, 1990]. Jest to charakterystyczne przebarwienie niebieskie, szare lub białe, które w badaniu klinicznym, podczas rozciągania zajętych zmianą tkanek, zmniejsza intensywność koloru. Najczęstszą lokalizacją występowania leukoedemy jest błona śluzowa policzków. Kolejną zmianą z rodzaju przebarwień jest przebarwienie melaninowe. Dym tytoniowy poprzez zwiększenie temperatury w jamie ustnej, w wyniku reakcji obronnej, stymuluje melanocyty do wzmożonej produkcji melaniny, która posiada silne właściwości antyoksydacyjne [Rudziński et al., 2008]. Hiperpigmentacja występuje u około 44% palaczy, jest zmianą odwracalną i ustępuje po zaprzestaniu palenia tytoniu [Bharath et al., 2015]. Stwierdza się, iż na podłożu melanozy najczęściej rozwijają się leukoplakie oraz raki płaskonabłonkowe [Behura et al., 2016]

U osób nałogowo palących tytoń często występuje zmniejszenie wydzielania śliny, czyli kserostomia. W przebiegu drażnienia termicznego i chemicznego nikotyną dochodzi do powierzchniowego zapalenia błony śluzowej języka. Pacjent podaje pieczenie, bolesność, zaczerwienienie oraz obrzęk języka. W badaniu klinicznym obserwuje się zanik lub nadmierne rogowacenie brodawek nitkowatych. W przypadku zaniedbań higienicz-

nych, dodatkowo może wystąpić infekcja grzybicza języka wywołana najczęściej *Candida albicans*. Przebarwienie i przerost brodawek nitkowatych wywołany drażnieniem przez dym oraz drożdżaki prowadzi do powstania jednostki chorobowej nazywanej włochatym czarnym językiem [Maciąg et al., 2006]. Zdecydowanie częściej występuje u mężczyzn niż u kobiet palaczy [Gurvits et al., 2014].

Stomatitis nicotinic to kolejny rodzaj uogólnionego zapalenia jamy ustnej u palaczy. Występuje u ponad połowy osób nałogowo palących tytoń [Gupta, 1990]. Zmiany lokalizują się na błonie śluzowej całej jamy ustnej, aczkolwiek miejscem predysponowanym jest podniebienie. *Stomatitis nicotinic* to szarawo-białe zabarwienie z wycelowanymi małymi gruczołami ślinowymi w stanie zapalnym. W zależności od zaawansowania procesu zmiany przybierają różne formy od delikatnych białych plam poprzez skupione lub rozlane grudki i tarczki o czerwonych brzegach [Alvarez et al., 2008]. W przypadku występowania zmian egzofitycznych lub wrzodziejących należy przeprowadzić diagnostykę w kierunku zmian nowotworowych, ponieważ charakteryzują się częstym zezłśliwieniem. Osoby, które palą tytoń w sposób odwrócony, to znaczy wkładają do ust palącą się końcówkę papierosa, wykazują dwa razy większą śmiertelność z powodu raka podniebienia niż osoby niepalące [Warnakulasuriya et al., 2005].

Wiele badań naukowych dokumentuje wpływ palenia tytoniu na powstanie chorób przyzębia. Dym tytoniowy bezpośrednio wpływa na przyzębie [Edman et al., 2015]. Miejscowo drażnieni termicznie składowe przyzębia oraz przez metabolity nikotyny zakłóca procesy obronno-naprawcze [Heikkinen et al. 2015]. Przyczynia się to do bardzo intensywnego i agresywnego przebiegu choroby przyzębia oraz słabszej odpowiedzi organizmu na zabiegi terapeutyczne [Dannewitz et al., 2016]. Nikotyna zmienia przepływ krwi w tkankach, przyczyniając się do powstania mikrozakrzepów i zamykania naczyń włosowatych. Na skutek wzrostu lepkości płytek krwi i obniżenia stężenia prostacykliny PGI₂ odpowiedzialnej za rozszerzenie naczyń dochodzi do wzmożonego krwawieniem z dziąseł podczas szczotkowania czy podczas żucia pokarmów lub mówienia [Kaczmarek et al., 1995; Ah et al., 1994].

Leukoplakia jest najczęstszą zmianą przednowotworową występującą u osób palących. Zmiana ma charakter białych plam lub smug powstających w wyniku nadmiernego rogowacenia nabłonka [Lima et al., 2012]. Lokalizacja leukoplakii u palacza to dno jamy ustnej, trójkąt zatrzonowcowy, boczna powierzchnia języka. Usytuowanie wynika z akumulacji toksyn pochodzących z dymu w ślinie i jamie ustnej [Banoczy et al. 2001]. Klinicznie pacjenci z leukoplakią skarżą się na suchość lub nadmierne wydzielanie śliny,

pieczenie podczas spożywania pokarmów ostrych i kwaśnych oraz świąd. Efekty terapeutyczne nie przynoszą efektów leczniczych, jeśli pacjent nie zaprzestanie palenia papierosów [Freitas et al., 2006]. Kolejną zmianą przednowotworową jest erytroleukoplakia, która występuje zdecydowanie rzadziej, aczkolwiek transformacja jej w zmianę o charakterze złośliwym występuje w 25–50% przypadków. Wykwitem podstawowym jest czerwona plama o gładkiej, błyszczącej powierzchni z białą podstawą [Malara et al., 2005].

Palenie jest najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworów w jamie ustnej. Nowotwory tytoniozależne znajdują się na 11 miejscu pod względem częstości występowania na świecie. Głowa i szyja są bardzo różnorodne pod względem anatomicznym, morfologicznym natomiast histologicznie są dość jednorodne. Ponad 90% błony śluzowej górnego odcinka drogi oddechowo-pokarmowej pokrywa nabłonek wielowarstwowy płaski [Malara et al., 2004]. Najczęściej spotykanym nowotworem jamy ustnej jest rak płaskonabłonkowy, stanowiący około 90% wszystkich guzów. Bogate unaczynienie tego obszaru anatomicznego sprzyja powstawaniu przerzutów [Zatoński, 1995]. Mechanizm wywołania zmiany nowotworowej zależy od ilości i składu kancerogenów obecnych w dymie tytoniowym [Homman et al., 2000] (tabela 4). Według literatury ogromne znaczenie w powstawaniu zmian nowotworowych u palaczy, ma najważniejszy enzym układu antyoksydacyjnego śliny, peroksydaza ślinowa. Po wypaleniu papierosa poziom tego enzymu gwałtownie spada, a do stanu wyjściowego wraca dopiero po 30 minutach. U palaczy błona śluzowa przez większą część doby nie jest chroniona przed atakiem tiocyjanków i rodników hydroksylovych powstających z nadmiaru wodoru [Balharry et al., 2008; Reichart et al., 2001]. Udowodniono, iż palenie tytoniu indukuje mutacje w genie p53 odpowiedzialnym za supresję złośliwej transformacji. W przypadku nowotworów jamy ustnej tytoniozależnych wiadomo iż S-transferazy glutationowe są bardzo ważnymi enzymami w metabolizmie karcynogenów środowiskowych [Malara et al., 2005].

Konsekwencje palenia tytoniu są również związane z obniżeniem jakości życia palącego. Efekt nieprzyjemnego zapachu z ust spowodowany jest lotnymi związkami siarki, które wchodzi w skład dymu tytoniowego [Agnihotri et al., 2014]. Halitozie towarzyszą zaburzenia odczuwania smaku oraz węchu. Stopień tych zaburzeń związany jest z nasileniem palenia tytoniu [Rad et al., 2010]. Palacze w celu maskowania nieprzyjemnego zapachu z ust sięgają po smakowe, zapachowe gumy do żucia czy cukierki. Efekt jest krótkotrwały, a w ich skład najczęściej wchodzi cukry i kwas cytrynowy co znacząco wpływa na wzrost intensywności choroby próchnicowej [Reibel et al., 2005].

Tabela 4. Kancerogeny znajdujące się w dymie tytoniowym. Źródło: Florek i Piekoszewski 2007

Kancerogen	Stężenie/papieros	Właściwości kancerogenne
		Grupa
Benzo(a)antracen	20–70 ng	2A
Benzo(a)piren	20–40 ng	2A
Indeni(1,2,3-cd) piren	4–20 ng	2B
Dibenzo(a,j)akrydyna	3–10 ng	2B
Furan	18–37 ng	2B
N-Nitrozodimetyloamina	2–180 ng	2A
N-Nitrozodietyleoamina	ND-2,8 ng	2A
N-Nitrozopirolidyna	3–110 ng	2B
4-(Metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanol	80–770 ng	2B
2-Naftyloamina	1–334 ng	1
4-Aminobifenyl	2–5,6 ng	1
2-amino-9H-pirydo(2,3-b) indol	25–260 ng	2B
2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo(4,5-b) pirydyna	11–23 ng	2A
Aldehyd mrówkowy	70–100 µg	2A
Aldehyd octowy	500–1400 µg	2B
1,3-Butadien	20–75 µg	2B
Benzen	20–70 µg	1
Akrylonitryl	3–15 µg	2A
Chlorek winylu	11–15 ng	1
DDT	800–1200 µg	2B
DDE	200–370 µg	2B
Katechol	100–360 µg	2B
Tlenek etylenu	7 µg	1
Tlenek propylenu	12–100 µg	2B
Hydrazyna	24–43 ng	2B
Arsen	40–120 µg	1
Nikiel	ND-600 ng	1
Chrom (6+)	4–70 ng	1
Kadm	7–350 ng	1
Kobalt	0,13–0,2 ng	2B
Ołów	34–85 ng	2B
Polon-210	0,03–1,0 pCi	1

1 — kancerogen u ludzi; 2A — prawdopodobny kancerogen u ludzi; 2B — możliwy kancerogen u ludzi

1.3. Stres oksydacyjny

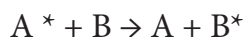
1.3.1. Wolne rodniki tlenowe — ogólna charakterystyka

Wolne rodniki definiuje się jako cząsteczki, lub ich fragmenty, zdolne do samodzielnego istnienia, zawierające jeden lub dwa niesparowane elektrony. Wokół atomów elektrony zajmują przestrzeń nazywaną orbitalami. Liczba orbitali może być różna, ale maksymalnie na jednym z nich mogą znajdować się dwa elektrony. Istotne jest to, iż pojedynczy elektron, sam decyduje o kierunku spinu.

Istnieje wiele możliwości jak wolne rodniki mogą reagować z innymi molekułami. Mogą połączyć niesparowane elektrony wiązaniem kowalencyjnym. Dzieje się tak, jeśli dojdzie do kontaktu dwóch wolnych rodników. Schemat powstania wiązania przedstawia wzór poniżej, gdzie wolny elektron oznaczony jest jako „*”.



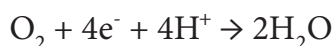
Wolny rodnik może również oddać swój niesparowany elektron innej cząsteczce lub też może dojść do sparowania poprzez zabranie elektronu owej cząsteczce. W każdym przypadku rodnik powoduje, iż molekula sama staje się cząsteczką reaktywną.



Zatem wolne rodniki biorą udział w reakcjach, które nazywane w literaturze są jako „reakcje łańcuchowe”: jeden rodnik produkuje następny, i następny, i tak dalej [Halliwell et al., 1989].

Tlen to pierwiastek, który jest niezbędny do życia wielu organizmom, w tym człowiekowi. Przede wszystkim wykorzystywany jest on do procesu oddychania. Nawet krótkotrwały brak dostępu do tego pierwiastka może spowodować uszkodzenie komórki i narządów lub nawet wywołać ich śmierć. Zawartość tlenu w powietrzu atmosferycznym wynosi 21%, nawet niewielkie wahania tej wartości wywołują negatywne skutki. Dlatego postawiono tezę, iż tlen może być również dla człowieka szkodliwy. Ekspozycja na podwyższoną zawartość tlenu prowadzi do uszkodzenia dróg oddechowych, ich obrzęku, martwicy nabłonka i zwłóknienia tkanki płucnej. Natomiast w przypadku przedłużającej się obecności przy stężeniu tlenu niższym niż w atmosferze występuje uczucie duszności, dyskomfort i wzmożona wentylacja płucna.

Powodem dużej toksyczności tlenu jest zdolność do tworzenia reaktywnych jego form. Tlen cząsteczkowy pełni rolę utleniacza i podczas badań udowodniono, iż może ulec on pełnej redukcji do cząsteczki wody, co jest katalizowane przez oksydazę cytochromową w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów. Reakcja ta jest podstawą mechanizmu oddychania.



Aczkolwiek wykazano również obecność stopniowej redukcji jedno-, dwu- lub trój-elektronowych, które prowadzą do powstania reaktywnych form tlenu.

Do reaktywnych form tlenu zalicza się między innymi: tlen singletowy, nadtlenek wodoru, rodnik wodoronadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy, ozon, tlenek azotu, ditlenek azotu, kwas nadtlenoazotawy, kwas podchlorawy, kwas podtiocyjanawy, rodnik nadtlenkowy, rodnik alkoksyłowy, podchloryn, nadtlenek [Bartosz, 2003]. Zdecydowaną większość reaktywnych form tlenu stanowią wolne rodniki. Wyróżnia się trzy typy reakcji wolnorodnikowych:

1. reakcje inicjacji — reakcje w wyniku których z cząsteczek obojętnych powstają dwa lub więcej wolnych rodników, inicjacja może nastąpić w wyniku: działania czynników zewnętrznych (promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe, ultradźwięki) lub jednoelektronowych reakcji redoks oraz hemolizy,
2. reakcje propagacji — polegają na zmianie nosicieli niesparowanych elektronów, ale stała pozostaje sumaryczna ilość wolnych rodników, wyróżnia się 5 podstawowych typów reakcji propagacji:
 - › przeniesienie atomu lub grupy atomów,
 - › addycja,
 - › β -eliminacja,
 - › jednoelektronowe reakcje redoks,
 - › przegrupowania;
3. reakcję terminacji — jest zakończeniem łańcucha prolongacji, polega na łączeniu się dwóch cząsteczek reaktywnych form tlenu w wyniku czego powstaje obojętna cząsteczka [Bartosz, 2003].

Poza metabolizmem organizmu ludzkiego, RFT generowane są również przez czynniki egzogenne. Ich źródłem są zanieczyszczenia powietrza, dym tytoniowy, metale ciężkie, nadużywanie alkoholu i szeroko pojęty niezdrowy styl życia, promieniowanie nadfioletowe, podczerwone, jonizujące oraz leki o właściwościach oksydoredukcyjnych [Fenrych, 1994].

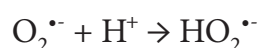
Wolne rodniki powodują oksydacyjne szkody wielu cząsteczek w komórkach, wliczając błony lipidowe, proteiny i kwasy nukleinowe [Husain et al., 2001], ale należy wspomnieć, iż w kontrolowanych niskich stężeniach są one wykorzystywane przez organizm ludzki. Biorą udział w wielu ważnych procesach biologicznych, takich jak: inaktywacja patogenów, regulowanie wzrostu komórki, aktywacja genów i cytochromu P-450, stanowią rodzaj sygnalizacji pomiędzy komórkami i wiele innych [Cross et al., 1987; Lewiński et al., 2000].

1.3.2. Właściwości reaktywnych form tlenu

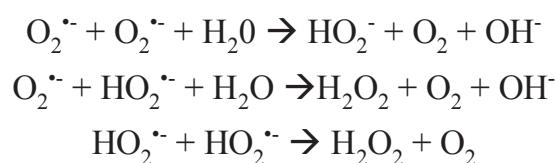
Podstawowym źródłem wolnych rodników dla ludzkiego organizmu są reakcje zachodzące w mitochondriach. Podczas procesu oddychania prawie 90% cząsteczek tlenu ulega redukcji do wody, aczkolwiek niejednokrotnie redukcja ta zachodzi do aminorodnika ponadtlenkowego. Ten kolejno ulega samoistnie procesowi dysmutacji stanowiąc źródło dla nadtlenku wodoru. Reakcje nadtlenku wodoru prowadzą natomiast do powstania wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego [Venditti et al., 2013].

Do najważniejszych i najczęściej występujących RFT zaliczamy anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy, tlen singletowy i ozon.

Anionorodnik ponadtlenkowy jest produktem redukcji jednoelektronowej tlenu, a najczęściej występuje w roztworach wodnych, w równowadze ze swoją formą uprotowaną czyli rodnikiem wodoronadtlenkowym.



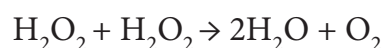
Anionorodnik ponadtlenkowy reaguje z większą ilością substancji i na ogół zdecydowanie szybciej niż tlen. Co istotne może też wchodzić w reakcje sam ze sobą w wyniku czego jedna cząsteczka zostaje utleniona, a druga zredukowana. Reakcje takie nazywane są procesami dysmutacji. Dysmutacja może przebiegać na trzy sposoby:



Szybkość dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego w roztworach wodnych zależy więc od pH, najszybciej zachodzi przy pH = 4,8.

Dzięki reakcjom spontanicznej dysmutacji anionorodnik ponadtlenkowy charakteryzuje się dwoma właściwościami. Do pierwszej z nich zalicza fakt, iż posiada on zdolność redukcji jak i utleniania innych cząsteczek w organizmie ludzkim. Gdy napotka obojętną cząsteczką może ją utlenić tworząc wolny rodnik oraz nadtlenek wodoru, natomiast podczas redukcji, sam utlenia się do tlenu cząsteczkowego. Drugą istotną cechą jest fakt, iż wszędzie tam, gdzie pojawia się anionorodnik ponadtlenkowy, występuje także nadtlenek wodoru, który wykorzystywany jest w diagnostyce celem oceny narażenia na reaktywne formy tlenu [Bartosz, 2003].

Nadtlenek wodoru, który w stanie czystym jest niebieskawym lepkim płynem, wrzącym w temperaturze 150°C, w organizmie ludzkim jest najczęściej produktem dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego.



Nadtlenek wodoru w porównaniu do innych RFT charakteryzuje się dużo mniejszą reaktywnością. Jest on zdecydowanie lepszym utleniaczem natomiast gorszym reduktorem. Przy pH zbliżonym do obojętnego, istotne są przede wszystkim dwa rodzaje reakcji nadtlenu wodoru do których zaliczamy utlenianie grup tiolowych oraz utlenianie jonów metali przejściowych.

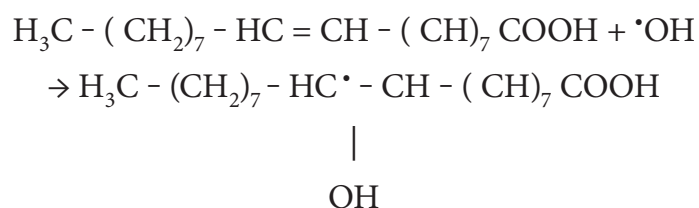


Nadtlenek wodoru jako związek o mało reaktywny oraz obojętny elektrycznie bardzo łatwo przenika przez błony komórkowe, co stanowi istotny czynnik rozprzestrzeniania się reaktywnych form tlenu.

Rodnik hydroksylowy jest jednym z najbardziej reaktywnych utleniaczy i jednym z najniebezpieczniejszych form reaktywnych tlenu. Posiada on bardzo wysoki potencjał redoks co wskazuje bardzo silne właściwości utleniające, ale również umożliwia zajście reakcji ze wszystkimi napotkanymi cząsteczkami czy substancjami w organizmie ludzkim. Jego głównymi reakcjami są reakcje oderwania atomu wodoru od alkanów i ich pochodnych:



oraz reakcje addycji do wiązań podwójnych, np. addycja rodnika do podwójnego wiązania kwasu oleinowego [Bartosz, 2003]:



Tlen singletowy, jako reaktywna forma tlenu, z innymi cząsteczkami oddziałuje na dwa sposoby. Może przekazać im energię wzbudzenia tworząc tlen trypletowy albo wchodzi z nimi w reakcję chemiczną.

Do najczęstszych reakcji tlenu singletowego zaliczamy:

- utlenianie fenoli,
- 1,2-addycja do wiązań podwójnych o dużej gęstości elektronów w alkenach i ich pochodnych,
- utlenianie sulfidów do sulfotlenków,
- utlenianie alkenów i ich pochodnych zawierających dwie lub więcej grup alkilowych do alkilonadtlenków. Następuje zmiana położenia wiązania podwójnego,
- reakcje addycji do alkenów i ich pochodnych oraz związków heterocyklicznych [Bartosz, 2003].

Ozon występuje głównie w górnych warstwach atmosfery, czyli w stratosferze. Tworząc warstwę, tak zwaną ozonową, umożliwia absorpcję promieniowania o długości fal 2200–3000 Å, 5700 Å oraz w podczerwieni. Ozon obecny jest również w troposferze, jego wysoka zawartość w tej części atmosfery jest jednak zjawiskiem negatywnym. Zalicza się go do wtórnych zanieczyszczeń powietrza, wchodzi on również w skład smogu. Ozon jak reaktywna forma tlenu reaguje z wieloma cząsteczkami. Przede wszystkim z grupami tiolowymi oraz z alkenami i nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. W wyniku tych reakcji powstaje szereg rodników, do najważniejszych należy rodnik hydroksylowy.

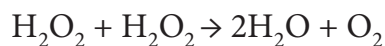
1.3.3. Mechanizmy obronne przed reaktywnymi formami tlenu

Zagrożenie jakie niosą dla organizmu reaktywne formy tlenu zmusiło organizm ludzki do wypracowania mechanizmów obronnych. W toku ewolucji wykształciły się dwa układy odpowiedzialne za utrzymanie równowagi tlenowej w komórkach: układ enzymatyczny i układ nieenzymatyczny.

Do najważniejszych enzymów odpowiedzialny za obronę przed RTF zalicza się dysmutazę ponadtlenkową, reduktazę glutationową, katalazę i peroksydazę glutationową.

Katalaza (CAT) jest enzymem, którego centrum aktywne stanowi żelazo. W organizmie ludzkim występuje w peroksysomach, a odpowiedzialna jest przede wszystkim za detoksykację nadtlenu wodoru i innego rodzaju cząsteczek [Wu et al., 2003; Radwańska-Wala et al., 2008]. Charakterystyczną właściwością katalazy jest bifunkcjonalność. W zależności od stężeń nadtlenu wodoru może pełnić funkcje katalazy lub peroksydazy. Podczas gdy stężenie nadtlenu jest duże dominuje aktywność katalazowa, która polega na katalizowaniu reakcji dysmutacji nadtlenu wodoru do tlenu cząsteczkowego i wody:

CAT



W środowisku o niskim stężeniu nadtlenu wodoru przeważa aktywność peroksydazowa [Radwańska-Wala, 2008]:

CAT



Największa aktywność katalazy występuje w nerkach i wątrobie, natomiast najniższa w tkance łącznej [Vuillaume, 1987].

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) jest jednym z najwcześniej odkrytym enzymem odpowiedzialnym za utrzymanie równowagi tlenowej w komórce. Zaliczana jest do enzymów z grupy oksydoreduktaz, a odpowiedzialna jest za reakcję przekształcania anionorodnika ponadtlenkowego w nadtlenek wodoru:

SOD

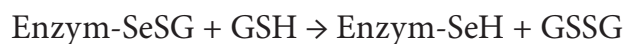
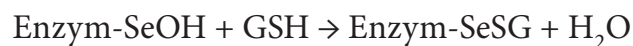
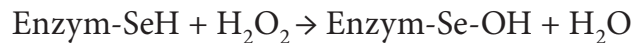


W organizmie ludzkim występuje w trzech izoenzymach:

- SOD1 (CuZn — SOD) — enzym cytozolowy, obecny w dużej ilości w wątrobie, jądrach i erytrocytach, odporny na działanie enzymów proteolitycznych,
- SOD2 (Mn — SOD) — enzym mitochondrialny, jego niedobór skutkuje zaburzeniami funkcjonowania mitochondriów,

- SOD3 (EC — SOD) — enzym zewnątrzkomórkowy, występuje w tkankach, płynach zewnątrzkomórkowych i osoczu krwi, bierze udział w unieczynnianiu O_2^{\bullet} oraz wykazuje aktywność peroksydazową [Radwańska-Wala et al., 2008].

Peroksydaza glutationowa (GPX) to kolejna grupa enzymów z układu obronnego. W skład centrum aktywnego enzymu wchodzi selenocysteina, która umożliwia utlenienie glutationu dwuelektronowe. Reakcja ta przebiega trój etapowo:



U człowieka wyróżnia się cztery rodzaje peroksydazy glutationowej:

- GPx1 (klasyczna) — wewnątrzkomórkowa hemoproteina, katalizuje reakcje między nadtlenkiem wodoru oraz wodoronadtlenkami a glutationem,
- GPx2 (żołądkowo-jelitowa) — pełni rolę ochronną przed ksenobiotykami i nadtlenkami,
- GPx3 (osoczowa) — ochrania przestrzeń pozakomórkową,
- GPx4 (fosfolipidowa hydroperoksydaza) — chroni błony biologiczne przed peroksydacją fosfolipidów [Fang et al., 2002; Bartosz, 2003].

Największa aktywność enzymów występuje w ślinie ludzkiej, rdzeniu nadnerczym, wątrobie, nerkach i leukocytach [Bartosz, 2003; Vuillaume, 1987; Radwańska-Wala et al., 2008].

Dodatkowo do enzymów obronnych zalicza się również: peroksydaza cytochromu c, reduktaza wodoronadtlenków alkilowych, reduktaza dehydroaskorbinianowa, białka enzymatyczne: np. ceruloplazmina, a także hydrolazy epoksydów [Bartosz, 2003]

Ważną rolę w utrzymywaniu równowagi tlenowej pełni również układ nieenzymatyczny. Główne utleniacze z tej grupy stanowią witamina E (α - tokoferol) i witamina C (askorbinian). Witamina E jest antyoksydantem rozpuszczalnym w tłuszczach i występuje w czterech formach tokoferolowych i czterech formach tokotrienolowych. Jest niskocząsteczkowym związkiem hydrofobowym, łatwo przenika przez błony komórkowe. Jej rola polega na „zmiataniu” wtórnych wolnych rodników organicznych i terminacji reakcji peroksydacji lipidów. Witamina C, w przeciwieństwie do witamin A i E, posiada charakter hydrofilowy. Jest silnym antyoksydantem ale w zależności od stężenia może pełnić rolę zarówno reduktora jak i utleniacza, co sprawia, że jest substancją skutecznie

wykorzystywaną w utrzymywaniu przez komórkę równowagi tlenowej [Gałęcka et al., 2008]. Karotenoidy (prowitaminy A), na przykład β -karoten, zdolny jest do reagowania z rodnikiem nadtlenkowym, hydroksylovym oraz z anionorodnikiem ponadtlenkowym oraz skutecznie wygasza tlen singletowy tym samym wykazuje charakter antyoksydacyjny.

Szczególną rolę w utrzymywaniu równowagi tlenowej w komórkach biorą udziały jony metali z grup przejściowych. Cynk, miedź, selen, żelazo w sposób bezpośredni lub pośredni — jako centra aktywne enzymów — służą do zwalczania stresu oksydacyjnego. Cynk jest istotny dla ludzkiego organizmu, ponieważ posiada silne właściwości protekcyjne, które chronią białka przed utlenianiem [Gałęcka et al., 2008].

1.3.4. Stres oksydacyjny i jego wpływ na organizm człowieka

Każda komórka organizmu, w zależności od indywidualnego zapotrzebowania na tlen, dąży do utrzymania prawidłowej równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej. W przypadku wystąpienia zaburzeń pomiędzy stężeniami utleniaczy, a antyoksydantów, wynikających chociażby z nadmiernego dostępu do oksydantów lub z powodu niedostatecznej ilości przeciwutleniaczy, dochodzi do zjawiska nazywanego stresem oksydacyjnym [Gandhi, Abramov, 2012].

W zależności od nasilenia stresu oksydacyjnego występuje różny stopień uszkodzenia komórki. Podczas stresu tlenowego zaobserwować można, iż w komórce dochodzi do licznych procesów patologicznych, od mało znaczących, aż po śmierć lub apoptozę. Konsekwencjami związanymi z dużą ilością wolnych rodników jest: obniżenie poziomu ATP, uszkodzenie DNA, uszkodzenia cytoszkieletu i zmiany morfologiczne powierzchni komórek, wzrost przepuszczalności błony komórkowej i jej depolaryzacja, zwiększenie stężenia wapnia w cytoplazmie, peroksydacja lipidów, zmniejszenie stosunku stężeń GSH/GSSG oraz całkowitego stężenia glutationu w komórkach [Murray et al., 1995]. Wszystkie wymienione powyżej procesy powodują, iż komórki szybciej się starzeją oraz mogą być przyczyną wielu chorób ogólnoustrojowych [Pérez et al., 2009]. Jak dotychczas literatura podaje, iż stres oksydacyjny jest istotnym czynnikiem etiologicznym prawie ponad stu chorób. Gutterbridge jako pierwszy postarał się usystematyzować wpływ wolnych rodników na choroby ogólne i dokonał ich podziału na 8 grup, do których zaliczamy między innymi zwiększoną produkcję wolnych rodników wywołaną przez komórki fagocytarne, leki i toksyny, promieniowanie jonizujące, czy reakcje wolno rodnikowe w chorobach genetycznych [Gutterbridge, 1993]. Zaburzenia w równowadze tlenowej mogą prowadzić

lub intensyfikować schorzenia układu sercowo-naczyniowego, miażdżycę, szereg chorób nowotworowych, choroby neurodegeneracyjne — choroba Parkinsona i Alzheimera, cukrzycę i zaburzenia gospodarki metabolicznej organizmu [Nowak, 2007].

Do najczęstszych chorób występujących w jamie ustnej zalicza się choroby twardych tkanek zęba — próchnicę oraz choroby tkanek okalających ząb — choroby przyzębia.

Próchnica zębów jest najbardziej rozpowszechnioną chorobą jamy ustnej na świecie. Dotyka zarówno dzieci jak i dorosłych, często prowadząc do bólu i utraty uzębienia. Etiologia powstawania choroby próchnicowej jest ogólnie poznana. Jest to wieloczynnikowa choroba infekcyjna, transmisyjna, gdzie główną rolę odgrywają: płytka nazębna, węglowodany, podatność oraz czas. Aczkolwiek kierunek współczesnych badań zwraca szczególną uwagę na RFT w etiopatogenezie próchnicy. Jak dotychczas z przeprowadzonych badań wynika, iż pacjenci z zaawansowaną chorobą próchnicową, bez względu na wiek i płeć charakteryzują się podwyższoną ilością całkowitą antyoksydantów w ślinie (TAC) niż w grupie kontrolnej. Przyczyna wyższego poziomu antyoksydantów w przeprowadzonych badaniach pozostaje jeszcze niejasna. Prawdopodobny mechanizm może obejmować odpowiedź gospodarza na infekcję, stan zapalny wywołany chorobą próchnicową [Tulunoglu et al., 2006; Preethi i wsp., 2010; Dodwad i wsp., 2011; Mahjoub i wsp., 2014].

W przypadku chorób przyzębia wpływ RFT na etiopatogenezę został bardziej poznany i zbadany. Wytwarzanie enzymów proteolitycznych i wybuchy oddechowe neutrofilii, w których pośredniczą enzymy, takie jak: oksydaza NADPH i mieloperoksydaza, prowadzą do wytwarzania wolnych rodników i indukowania stresu oksydacyjnego [Nizam et al., 2014, Syndergaard et al., 2014]. Mechanizmy te odgrywają kluczową rolę w patogenezie zapalenia przyzębia, jak podsumowali Chapple i Matthews w swoim kompleksowym przeglądzie [Chapple, Matthews, 2007]. Dodatkowo stwierdzono, iż mieloperoksydaza ślinianek jest większa u pacjentów z paradontozą [Meschiari et al., 2013]. Najczęstszymi parametrami uszkodzeń oksydacyjnych związanych z chorobami przyzębia są markery peroksydacji lipidów, utleniania oraz stężenia białek. W badaniach klinicznych zaobserwowano również znaczący spadek stężeń parametrów stresu oksydacyjnego w przypadku wdrożenia terapii leczniczej.

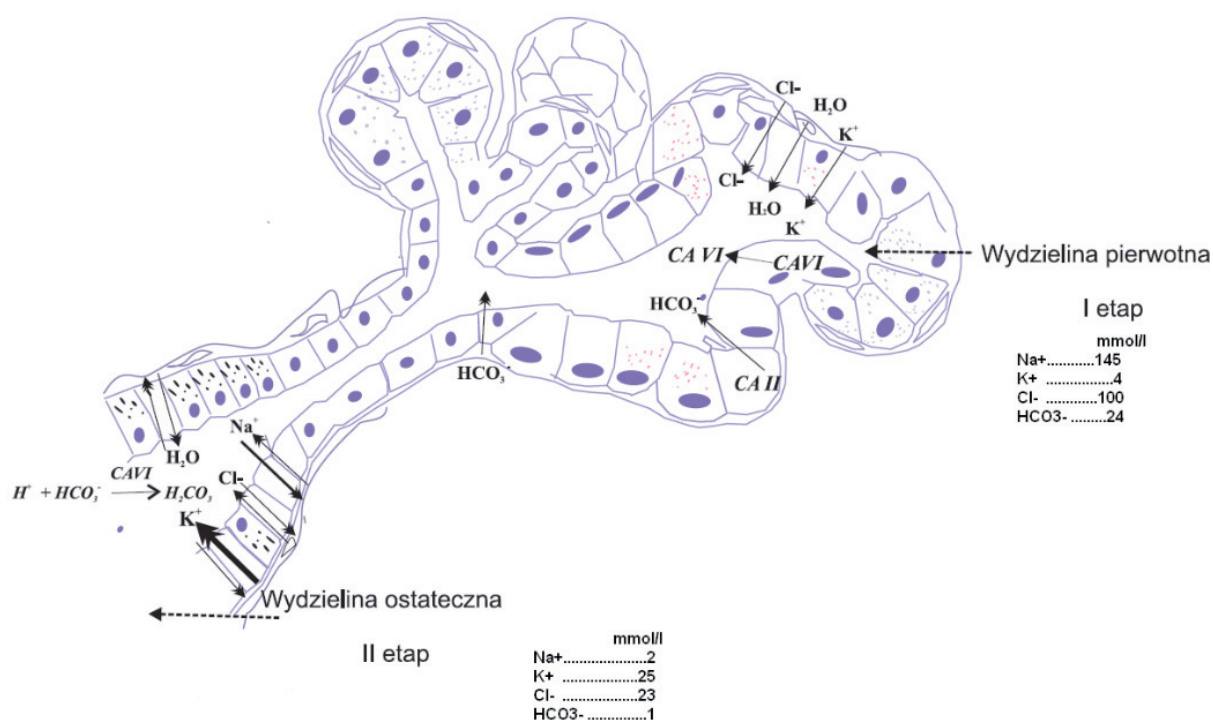
Niewątpliwie autorzy publikacji podkreślają podwyższenie wykładników stresu oksydacyjnego zarówno u pacjentów objętych chorobą próchniczą jak i przyzębia w przypadku dodatkowego narażenia na dym tytoniowy.

1.4. Ślina jako materiał badawczy

1.4.1. Ogólna charakterystyka śliny

Ślina ludzka jest trawinną, heterogenną wydzieliną produkowaną w 90% przez duże i 10% przez małe gruczoły ślinowe. Duże stanowią parzyste gruczoły ślinowe: przyuszne, podżuchwowe oraz podjęzykowe, natomiast małe gruczoły ślinowe rozsiane są po całej jamie ustnej za wyjątkiem przedniej części podniebienia twardego oraz dziąseł [Nieuw Amerongen et al., 2008]. Gruczoły ślinowe przede wszystkim zbudowane są z pęcherzyków gruczołowych połączonych ze sobą rozgałęzionym układem cewek tworzące drogi wyprowadzające do jamy ustnej. Jednostkę czynnościową w gruczołach ślinowych składającą się z wyżej wymienionych elementów nazywamy saliwonem (rycina 6). W skład saliwonu wchodzi odcinek wydzielniczy, wstawka i przewód prążkowany [Cypriś et al., 2001].

Całkowita ślina mieszana to złożone połączenie płynu dziąsłowego pochodzącego ze szczelin dziąsłowych, jak również przesięku surowicy z błony śluzowej jamy ustnej, jamy nosowej oraz gardła [Humphery et al., 2001]. Ponadto w ślinie obecne są bakterie wraz z ich metabolitami, złuszczone komórki nabłonka i ich fragmenty, leukocyty, resztki pokarmowe, a także ślady leków i produktów chemicznych [de Almeida Pdel et al., 2008].



Rycina 6. Schemat saliwonu, który wytwarza wydzielinę pierwotną, skład której zmienia się podczas przepływu przez układ cewek. W cewkach tworzy się ślina ostateczna, wydalana do jamy ustnej. Źródło: Cypriś et al., 2001

Wyróżniamy dwa rodzaje śliny, tak zwaną ślinę stymulowaną i niestymulowaną. W spoczynku, bez żadnej stymulacji egzogennej czy farmakologicznej, występuje ciągły przepływ śliny (ang. salivary flow; SF), obecny w postaci filmu, który obmywa, nawilża i pokrywa powierzchnie zębów, błonę śluzową policzków, dziąseł oraz języka. Ślinę taką nazywamy niestymulowaną lub spoczynkową. W 60% jest ona produkowana przez gruczoły surowicze znajdujące się w śliniankach przyusznych i podjęzykowych stąd konsystencja jej jest płynna, przejrzysta, lekka i wodnista. Ślina stymulowana, produkowana jest najczęściej pod wpływem działania bodźca mechanicznego, zapachowego, smakowego bądź farmakologicznego. Jest ona zdecydowanie bardziej lepka i gęsta. Wydzielana jest ona głównie przez małe gruczoły znajdujące się na podniebieniu miękkim i na nasadzie języka. Do łączenia i mieszania się śliny produkowanej przez wszystkie gruczoły ślinowe w jamie ustnej dochodzi podczas ruchów mięśni języka, dna jamy ustnej, policzka oraz warg [Jańczuk, 2007].

U zdrowego, dorosłego człowieka dzienna produkcja śliny wynosi pomiędzy 1,0–1,5 litra [Edgar, 1992]. Specyficzną właściwością wydzielania śliny jest stosunkowo bardzo duża ilość jej produkcji do masy tkanki gruczołowej ślinianek. Chociaż szybkość wydzielania śliny podlega zmianom dobowym i wykazuje zróżnicowanie międzypersoniczne, uśredniono, iż produkcja śliny zmieszanej spoczynkowej w ciągu dnia wynosi 0,25–0,35 ml/min, w ciągu nocy 0,05 ml/min, natomiast zmieszanej stymulowanej około 1,0–3,0 ml/min. Indeks przepływu (SF) zarówno śliny stymulowanej, bądź spoczynkowej jest parametrem umożliwiającym zakwalifikowanie pacjenta do grupy prawidłowego, niskiego albo bardzo niskiego wydzielania śliny [Jańczuk, 2007]. Należy zwrócić uwagę, iż istnieje wiele przyczyn ogólnoustrojowych i miejscowych powodujących spadek produkcji śliny. Zalicza się do nich chociażby choroby autoimmunologiczne, cukrzycę, anoreksję, kamicę ślinianek, popromienne uszkodzenie gruczołów ślinowych i wiele innych [Guzik et al., 2009].

W zależności od intensywności wydzielania, skład śliny zmienia się. Zmieniają się także jej parametry. Podczas wzmożonej produkcji, ślina jest izotoniczna, zaś podczas zmniejszonej — hipotoniczna. Zmianie ulega również pH. Dla śliny zmieszanej stymulowanej pH wynosi około 7,0–7,5 dla spoczynkowej 6,5–6,9 [Klimek et al., 2001].

Skład, objętość i szybkość przepływu śliny koreluje z miejscem produkcji i występowania w jamie ustnej. Powierzchnie gładkie umożliwiają spływanie śliny i usuwanie zanieczyszczeń natomiast w bruzdach i rowkach występujących na powierzchniach zębów jest to niemożliwe. Nierównomierny przepływ śliny powoduje, iż niektóre po-

wierzchnie zębów są bardziej narażone na powstanie płytki nazębnej, a dodatkowo przy nieprawidłowej higienie jamy ustnej na rozwój choroby próchnicowej. Przepływ śliny i jej kompozycja powiązana jest ze stanem nawodnienia organizmu, odżywieniem, płcią, stanem emocjonalnym, wiekiem, stosowanymi lekami oraz chorobami ogólnoustrojowymi [Nauntofte, et al., 2006].

Ślina całkowita składa się w 99% z wody, pozostały procent stanowią jony, drobnozastępczkowe związki organiczne, mocznik, kwas moczowy, glukoza, aminokwasy i białka [Neyraud et al., 2012].

Ślina jest jednym z ważniejszych płynów ustrojowych, ponieważ spełnia w organizmie szereg ważnych funkcji [Paul-Stalmaszczyk, 2002] (tabela 5). Przede wszystkim ciągle nawilża błonę śluzową poprzez obmywanie policzków, dziąseł, języka oraz zębów. Aby ślina prawidłowo usuwała płytkę nazębną, resztki pokarmowe oraz niektóre drobnoustroje z jamy ustnej musi być lepka. Odpowiedzialne za ten parametr są mucyny produkowane przez nabłonek [Pol et al., 2007]. Ślina tworząc w jamie ustnej środowisko wilgotne o charakterze buforu wraz z występującymi w niej jonami (między innymi wapniowymi i fluorkowymi) umożliwia proces remineralizacji [Kochańska et al., 1996]. Dodatkowo w skład śliny wchodzi substancje, które ułatwiają formowanie kęsa pokarmowego, przeprowadzają wstępne trawienie oraz wzmagają odczucia smakowe. Ślina trawi przede wszystkim cukry, dzięki zawartości amylazy i maltazy ślinowej, aczkolwiek w jej skład wchodzi również inne enzymy trawienne takie jak: lipaza, rybonukleaza, proteaza [Nauntofte, et al., 2006]. Jama ustna stanowi wrota penetracji dla wszelkich mikroorganizmów. Dzięki ślinie i zawartej w niej molekułach układu obronnego swoistego

Tabela 5. Funkcje niektórych składników śliny. Źródło: Dowd, 1999; Jańczuk, 2007]

Funkcja	Składniki śliny
Lubrykacyjna	Mucyny, bogate w prolinę glikoproteiny, woda
Antybakteryjna	Lizozym, laktoferyna, system ślinowej peroksydazy, mucyny, cystatyny, wydzielnicza IgA, białka bogate w prolinę
Integralność błony śluzowej	Mucyny, elektrolity, woda
Nawilżanie	Woda
Rozcieńczanie	Woda
Buforowanie	Jony dwuwęglanowe i fosforanowe
Remineralizacji	Wapń, fosforany, stateryny, białka anionowe bogate w prolinę
Przygotowywanie kęsa pokarmowego	Woda, mucyny
Trawienie	Amylaza, lipaza, rybonukleaza, proteaza, woda, mucyny
Odczucia smakowe	Woda
Związane z mową	Woda, mucyna

i nieswoistego dochodzi do wyeliminowania patogenu. Są to przede wszystkim immunoglobuliny, głównie IgA i IgM (w śladowych ilościach IgM) lizozym, interferon, aniony rodankowe i enzymy antyoksydacyjne [Odell et al., 1996; Nauntofte, et al., 2006].

Bardzo istotnym składnikiem śliny są przeciwutleniacze. W jamie ustnej dochodzi do wielu procesów, podczas których generowane są reaktywne formy tlenu. Należą do nich przede wszystkim choroby zębów i związane z tym procesy lecznicze, choroby przyzębia, oddychanie przez usta, zaleganie resztek pokarmowych i związane z tym procesy fermentacji oraz ekspozycja na dym tytoniowy czy wysokoprocentowy alkohol. Enzymy antyoksydacyjne występujące w ślinie to peroksydaza glutationowa, katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa oraz inne związki organiczne, takie jak witamina E i kwas moczowy. Poziom przeciwutleniaczy w ślinie jest zmienny i zależy od ilości reaktywnych form tlenu w jamie ustnej. Zaobserwowano również wzrost stężenia antyoksydantów w przypadku występowania niektórych chorób ogólnoustrojowych [Ahmadi-Motamayel et al., 2013].

1.4.2. Wykorzystanie śliny w diagnostyce medycznej

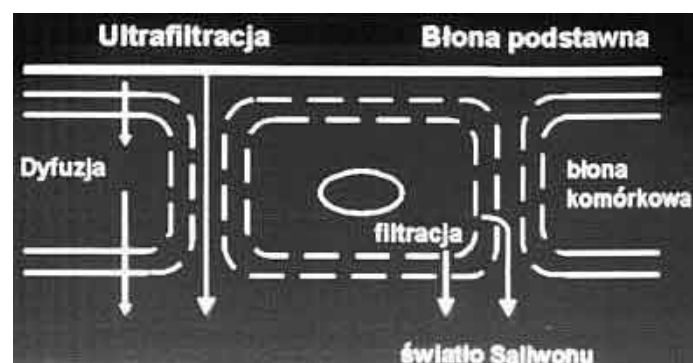
Materiał badawczy, jaki stanowi ślina, w diagnostyce cieszy się coraz większą popularnością. Największą zaletą śliny jest prosta i bezbolesna metoda jej pobierania. Uzyskać można ją od każdego Pacjenta bez względu na wiek. Zaledwie w przeciągu kilku minut pobieramy znaczącą ilość materiału diagnostycznego nie powodując uczucia dyskomfortu dla dawcy materiału. Dodatkowo pobieranie śliny wiąże się z niskim nakładem finansowym, a pobieranie jej może odbyć się zarówno w warunkach szpitalnych jak i domowych, ponieważ nie wymaga zaangażowania personelu medycznego [Kaufman et al., 2002]. Transport śliny nie wymaga specjalnej procedury, a większość związków oznaczanych w ślinie charakteryzuje się dużą trwałością. Dodatkowo możliwość jej mrożenia sprawia, iż materiał może być katalogowany i długo przechowywany [Veerman et al., 2008]. Uzyskany materiał przed wykonaniem oznaczeń nie wymaga wirowania, homogenizacji oraz innych wstępnych przygotowań [Greabu et al., 2009]. Kolejną istotną zaletą śliny używanej jako materiału badawczego jest przeprowadzenie badań na dużych populacjach oraz na szerokim polu geograficznym.

Jama ustna jest jamą ciała, która narażona jest na wiele czynników, takich jak powietrze, resztki pokarmowe, bakterie, wirusy, grzyby oraz produkty ich metabolizmu. Dodatkowo stanowi przedni odcinek zarówno drogi pokarmowej jak i oddechowej organizmu, co odzwierciedla się w zróżnicowanych substancjach znajdujących w jamie ustnej: wydzielina nosowa, wydzielina gardłowa, przesącz osocza, elementy krwi, komórki na-

błonka. Dzięki temu analiza śliny, jako wydzieliny znajdującej się w jamie ustnej, rozwija zakres dostępnych badań [Greabu et al., 2009].

Związki mieszczące się w ślinie może podzielić na dwie grupy. Głównym kryterium podziału jest miejsce wytwarzania związku. Do pierwszej grupy zaliczamy związki syntetyzowane wewnątrz gruczołu ślinowego, aczkolwiek stanowią one drugorzędowe znaczenie podczas stosowania śliny jako materiału diagnostycznego. Wyjątek stanowi immunoglobulina A (IgA). Obronna funkcja IgA polega na opłaszczaniu i aglutynacji przez nią mikroorganizmów, zapobieganiu adhezji bakterii do powierzchni gładkich zębów oraz błony śluzowej policzków czy neutralizacji toksyn bakteryjnych. Stąd podwyższony poziom przeciwciał IgA w ślinie świadczyć może o zaawansowanym procesie próchnicowym w jamie ustnej, a co z tym koreluje dużą ilością bakterii. Do drugiej grupy zaliczamy związki zewnątrzgruczołowe, które syntetyzowane są poza gruczołem ślinowym, a transportowane są z osocza do śliny. W zależności od mechanizmu przechodzenia pomiędzy tymi dwoma przedziałami, dzielimy je na zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe (rycina 7) [Mandel, 1990; Mandel, 1993; Mandel, 1995; Sreebny, 1989]. Do transportu wewnątrzkomórkowego zaliczamy transport bierny, czyli dyfuzję lub filtrację oraz transport swoisty, który wymaga nośnika energii, czyli pinocytozę czy dyfuzję ułatwioną. Zewnątrzkomórkowo do śliny przedostają się związki głównie dzięki ultrafiltracji lub przez pęknięcia naturalnych błon. Związki, które w ślinie mogą być oznaczone w celach diagnostycznych przenikają głównie na zasadzie dyfuzji. Proces ten zależy od trzech głównych czynników [Baum et al. 1993; Bienenstock et al., 1980; Castle, 1993]:

- ciężaru cząsteczkowego,
- rozpuszczalności w wodzie i tłuszczach,
- stopnia jonizacji związków.



Rycina 7. Zewnątrz- i wewnątrzkomórkowa droga transferu składników osocza do przedziałów wydzielniczych np. śliny. Źródło: Cyprysiak et al., 2001

Niewątpliwie najważniejsze wykorzystanie śliny w diagnostyce laboratoryjnej stanowi oznaczenie w niej środków chemicznych, takich jak leki i narkotyki. Badanie przede wszystkim pozwala na wykrycie tych związków i określenie ilości w organizmie. Umożliwia kontrolę terapii farmakologicznej. Zwłaszcza aktywnie transportowane do śliny są leki takie jak: cisplatyna, diazepam, chinina, fenytoina, metotreksat, penicylina, metopropol, pirmentol, lit, salicylany [Tadeusiak et al., 1992]. Dodatkowo analiza biochemiczna śliny umożliwia przeprowadzenie badań kryminalistycznych [Heltsley et al., 2011]. Analizując skład śliny, ustalić można, czy doszło do spożycia alkoholu, amfetaminy, barbituranów, kokainy, marihuany czy tytoniu [Cone et al., 2007].

Kolejno ślina wykorzystywana jest celem określenia narażenia na zakażenia z bardzo obszernej grupy chorób zakaźnych. Są to jednostki chorobowe wywołane zarówno przez bakterie, wirusy, grzyby [Kistula et al., 1996]. Analizując ślinę możemy zdiagnozować zakażenia wirusami:

- HIV wywołującym chorobę AIDS [Martinez et al., 1999; Scully et al., 1997],
- HSV-1 wywołującym opryszczkę [Friedman et al., 1982],
- CMV wywołującym cytomegalię [Segal, et al., 2008],
- EBV wywołującym mononukleozę [Kistula et al., 1996],
- HAV wywołujący wirusowe zapalenie wątroby typu A [Ochnio et al., 1997],
- HBV wywołujący wirusowe zapalenie wątroby typu B [El-Medany et al., 1992],
- HCV wywołującym wirusowe zapalenie wątroby typu C [Thieme et al., 1992].

Dodatkowo analiza śliny pozwala na wykrycie bakterii związanych z występowaniem w jamie ustnej jednostek chorobowych, takich jak zapalenia przyzębia czy choroba próchnicowa [Caferio et al., 2013]. Związku z faktem, iż jama ustna stanowi również początek drogi pokarmowej, możliwe jest oznaczenie bakterii związanej z chorobą wrzodową żołądka *Helicobacter Pylorii* [Loeb et al., 1997; Greabu et al., 2009].

Ślina umożliwia diagnozowanie wiele schorzeń. Do głównych z nich należą choroby nowotworowe oraz choroby autoimmunologiczne czy endokrynologiczne [Bigda et al., 2003; Adami, et al., 2012].

Analizując ślinę pacjentów dotkniętych chorobą nowotworową jamy ustnej zaobserwowano występowanie typowych dla niej biomarkerów, takich jak inhibitory apoptozy, przeciwciała, enzymy trawiące kwasy nukleinowe, białka modulujące cykl życia komórki, metylowane DNA [Nagler, 2009]. Ponadto choroba nowotworowa powoduje podniesienie poziomu reaktywnych form tlenu w ślinie, co powoduje wystąpienie stresu oksydacyjnego. Jak podaje literatura analiza składu śliny może stać się dodatkowym na-

rzędziem profilaktycznym jak i diagnostycznym w chorobach onkologicznych [Nagler, 2009; Shpitzer et al., 2009].

Parametry stresu oksydacyjnego oznaczane do badań powinny być stabilne, nagromadzone w wykrywalnych stężeniach oraz odzwierciedlać specyficzne szlaki utleniania oraz korelować z nasileniem czynnika wywołującego [Dalle-Donne et al., 2006]. Biorąc pod uwagę, iż reaktywne formy tlenu są cząsteczkami wysoce reaktywnymi i mają krótki okres półtrwania, produkty powstałe w wyniku reakcji redoks z makrocząsteczkami komórkowymi stosowane są wyjątkowo jako wykładniki uszkodzeń oksydacyjnych [Palmieri, et al., 2007]. Produkty peroksydacji lipidów, stężenia i utleniania białek stanowią parametry stabilne i wiarygodnie odzwierciedlające ocenę poziomu stresu oksydacyjnego. Dodatkowo, celem analizy równowagi pomiędzy ilością reaktywnych cząsteczek, a przeciwutleniaczy stosuje się parametr całkowitego stanu antyutleniaczy (CSA). Zaobserwowano, iż zdecydowanie lepsze wyniki informacyjne uzyskuje się stosując cały panel biomarkerów chemicznych dla parametrów stresu. Zmniejsza to nieprawidłową interpretację wyników oraz umożliwia lepsze zrozumienie leżących u podstaw patomechanizmów odpowiedzialnych za dany stan [Barnes et al., 2014].

Przedstawione powyżej doniesienia naukowe świadczą, iż wykorzystywanie śliny jako materiału diagnostycznego znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny, a korzyści jakie płyną z użycia tej wydzieliny do badań są niepodważalne.

2. Cel badań

Palenie tytoniu jest nałogiem sprzyjającym powstawaniu szeregu chorób jamy ustnej i dróg oddechowych. Dodatkowo odgrywać może znaczącą rolę w utrzymaniu właściwej higieny jamy ustnej.

Celem pracy, jest ocena stanu zdrowia i higieny jamy ustnej oraz wpływu palenia tytoniu na zmiany stężeń wybranych parametrów stresu oksydacyjnego.

Cele szczegółowe:

1. Ocena higieny jamy ustnej i stanu błony śluzowej osób badanych.
2. Analiza analityczno-biochemiczna parametrów stresu oksydacyjnego w ślinie mieszanej spoczynkowej u osób palących i niepalących.
3. Wpływ higieny jamy ustnej na stężenie parametrów stresu oksydacyjnego.
4. Korelacja stężenia kotyniny w ślinie mieszanej spoczynkowej osób palących, a parametry stresu oksydacyjnego.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

Materiał do badań zgromadzono w latach 2013–2016 w Klinice Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Łączna liczebność grupy badanej wyniosła 200 osób. Kryterium doboru materiału był wiek pacjentów w granicach 35–45 lat oraz brak występowania chorób ogólnoustrojowych mogących wpływać na uzyskane wyniki. Badani biorący udział w projekcie nie stosowali żadnych leków.

Pacjenci zostali podzieleni na cztery grupy: dwie badawcze: palące kobiety (50 prób), palący mężczyźni (50 prób) oraz dwie kontrolne — niepalące kobiety (50 prób) i niepalący mężczyźni (50 prób).

Udział w projekcie badawczym był dobrowolny, a pacjenci przed badaniem zostali poinformowani o jego istocie oraz celowości. Każdy z badanych podpisał świadomą zgodę pacjenta udziału w projekcie.

Uzyskany materiał badawczy jednego pacjenta obejmował: dokumentację medyczną: standardowy wywiad medyczny i stomatologiczny, dane ankietowe dotyczące nawyków higienicznych oraz nałogów, dokumentację z przeprowadzenia badania dotyczącego higieny jamy ustnej według indywidualnej karty badań oceniającą stan jamy ustnej, a także pobraną niestymulowaną, ślinę mieszaną.

Protokół badań został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 335/16).

3.2. Metody

Po zakwalifikowaniu pacjenta do projektu, po wcześniejszej konsultacji stomatologicznej, badanie przebiegło kilkuetapowo. Pierwszym etapem było wypełnienie autorskiego

kwestionariusza ankiety, przeprowadzono badanie stomatologiczne ze szczególną oceną higieny jamy ustnej oraz stanu błony śluzowej badanego, a następnie pobrano materiał badawczy — ślinę.

3.2.1. Badanie ankietowe

Podczas wizyty w Klinice Chirurgii Stomatologicznej pacjenci wypełnili opracowaną autorską ankietę osobową. Pytania w kwestionariuszu dotyczyły warunków socjoekonomicznych, takich jak płeć, wiek, wykształcenie, miejsce zamieszkania. Kolejna część ankiety zawierała pytania dotyczące utrzymania odpowiedniego poziomu higieny jamy ustnej. Badany deklarował, ile razy dziennie szczotkuje zęby, jakiej pasty do zębów używa oraz czy stosuje dodatkowe przybory higieniczne takie jak: nitka dentystyczna, płukanka jamy ustnej, irygacje wodne. Ostatnia część kwestionariusza dotyczyła stylu życia. Badany odpowiadał na pytania dotyczące używek, a zwłaszcza palenia tytoniu. Dane uzyskane w badaniu ankietowym umożliwiły kwalifikowanie badanych do określonej grupy.

3.2.2. Badanie kliniczne

Indywidualna karta badania pacjenta, w aspekcie higieny jamy ustnej, została opracowana specjalnie w celu realizacji niniejszego projektu badawczego. Wzór formularza został przedstawiony w osobnym rozdziale. Oprócz danych identyfikujących Pacjenta, karta zawierała tabele, w których umieszczano wartości wskaźników umożliwiających ocenę higieny jamy ustnej oraz stan błony śluzowej.

Badanie stomatologiczne wewnątrzustne przeprowadzono przy pomocy lusterka diagnostycznego oraz zgłębnika stomatologicznego w sztucznym oświetleniu w warunkach gabinetu zabiegowego.

Do oceny higieny jamy ustnej wykorzystano dwa wskaźniki:

- wskaźnik API (Approximal Plaque Index) według Lange,
- wskaźnik Pl.I (Plaque Index) według Silness i Loe.

Wskaźnik API rejestruje płytkę nazębną w przestrzeniach międzyzębowych [Lange et al., 1977]. Wartość wskaźnika oceniana jest w systemie zerojedynekowym, natomiast wynik określany jest w procentach. Podczas badań stosowano zmodyfikowany wskaźnik API, czyli w celu wykrycia płytki nazębnej wprowadzono zgłębnik stomatologiczny w przestrzenie międzyzębowe, a nie używano preparatów do jej wybarwienia. Przestrzenie międzyzębowe badano w uzębieniu stałym w następujących miejscach:

- powierzchnia podniebienna zębów w kwadrancie górnym prawym,

- powierzchnia wargowej i policzkowa w kwadrancie górnym lewym,
- powierzchnia językowa zębów w kwadrancie dolnym lewym,
- powierzchnia wargowa i policzkowa w kwadrancie dolnym prawym.

Wskaźnik API obliczano na podstawie wzoru:

$$\text{API} = \frac{\text{liczba przestrzeni międzyzębowych z płytka nazębną}}{\text{liczba badanych przestrzeni międzyzębowych}} \times 100$$

Na podstawie wyliczonych wartości wskaźnika API badanych zakwalifikowano do jednej z trzech grup, określających stan higieny jamy ustnej:

1. API < 35% — dobra higiena jamy,
2. API = 35–74% — umiarkowana (średnia) higiena jamy ustnej,
3. API = 75–100% — niedostateczna (zła) higiena jamy ustnej.

Wskaźnik PII ocenia grubość płytki nazębnej znajdującej się wokół szyjki zęba [Silness et al., 1964]. Pomiaru dokonuje się na czterech powierzchniach: mezjalnej, dystalnej, policzkowej/wargowej, podniebiennej/językowej, których suma podzielona przez cztery stanowi wielkość wskaźnika dla danego zęba. Wskaźnik obliczano przy zębach 16, 11, 24, 36, 31, 44, w przypadku braku danego zęba badano ząb sąsiedni z tej samej grupy zębowej. Grubość płytki nazębnej określano w czterostopniowej skali:

- 0 — brak płytki stwierdzony w wyniku oglądania i zgłębnikowania,
- 1 — cienka warstewka płytki bakteryjnej, niewidoczna gołym okiem, jednakże wykrywana przy przesuwaniu sondą wzdłuż powierzchni zębowej,
- 2 — miękki złóg nazębny widoczny w kieszonce dziąsłowej w postaci ciągłej linii, płytka nie wypełnia przestrzeni międzyzębowej,
- 3 — gruba warstwa płytki wypełniająca przestrzeń międzyzębową.

W celu otrzymania wskaźnika P.I dla całej jamy ustnej należy zsumować wartości wcześniej otrzymane dla poszczególnych zębów i podzielić przez liczbę wszystkich badanych zębów.

Na podstawie wyliczonych wartości wskaźnika PII pacjentów zakwalifikowano do 3 grup, analogicznie do wskaźnika API:

- 0 — 0,9 — dobra higiena jamy,
- 1 — 1,0–1,9 — umiarkowana (średnia) higiena jamy ustnej,
- 2 — 2,0–3,0 — niedostateczna (zła) higiena jamy ustnej.

Podczas badania stomatologicznego szczególną uwagę zwrócono na stan błony śluzowej jamy ustnej badanego. Odnotowywano wszelkie zmiany dotyczące przebarwień, zwłaszcza o charakterze białym, czerwonym czy brązowym, zmiany przerostowo-rozrostowe, obecność nadżerek i owrzodzeń. Ze względu na inny kierunek przeprowadzanych badań nie badano oraz oceniano stanu uzębienia pod kątem ubytków próchnicowych oraz jakości obecnych w jamie ustnej wypełnień stomatologicznych oraz użytkowanych przez pacjentów uzupełnień protetycznych.

3.2.3. Pobranie materiału badawczego

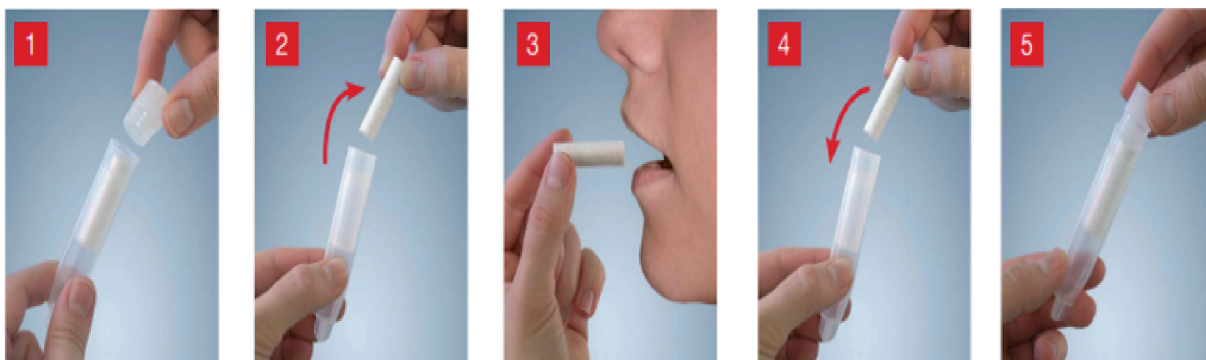
Materiał badawczy, który w projekcie stanowiła niestymulowana ślina mieszana, pobierano przy pomocy metody z użyciem próbek Sarstedt Salivette (rycina 8).



Rycina 8. Probówka do pobierania śliny typu Sarstedt Salivette. Źródło: https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/Englisch/156_Salivette_GB_0813.pdf

W skład zestawu Sarsted Salivette wchodzi probówka zewnętrzna, probówka wewnętrzna, bawełniany wacik oraz korek zamykający.

Podczas pobierania materiału, bawełniany wacik, będący częścią zestawu umieszczano w jamie ustnej, aż do pełnego nasiąknięcia śliną — około 4–5 min. Kolejno wacik umieszczony został w wewnętrznej probówce i szczelnie zamknięty (rycina 9).



Rycina 9. Schemat pobierania materiału badawczego przy użyciu probówek typu Sarstedt Salivette. Źródło: https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/Englisch/156_Salivette_GB_0813.pdf

Tak zabezpieczony materiał, zaraz po pobraniu, zostawał umieszczony w lodówce, a następnie jak najszybciej, tego samego dnia, transportowany do Laboratorium Badań Środowiskowych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. W następnej kolejności probówki umieszczano w wirówce i odsączano ślinę w wyniku wirowania. Dzięki tej metodzie uzyskiwano około 2 ml materiału badawczego. Uzyskaną ślinę umieszczano w probówkach Eppendorf i przechowywano bez dostępu światła w temperaturze -80°C , aż do uzyskania odpowiedniej ilości prób do wykonania oznaczeń biochemicznych.

3.2.4. Metody oznaczenia parametrów stresu oksydacyjnego

3.2.4.1. Wyznaczenie stężenia białka w ślinie

Oznaczenie stężenia białka w ślinie uzyskuje się dzięki reakcji pomiędzy aminokwasami aromatycznymi i wiązaniami peptydowymi, a odczynnikiem Folina Ciocalteu. Reakcja ta przebiega w dwuetapowo. Pierwszy etap polega na addycji jonów Cu^{2+} do wiązań peptydowych, natomiast w drugim etapie dochodzi do redukcji kwasu fosfomolibdenowego i kwasu fosforowolframowego do odpowiednich tlenków [Lowry et al., 1951] (tabela 6).

Przed wykonaniem oznaczenia zmieszano odczynnik miedziowy A z odczynnikiem miedziowym B w stosunku 50:1.

Aby prawidłowo oznaczyć stężenie białka w ślinie początkowo należało uzyskać próbę wzorcową oraz ślepa.

Tabela 6. Narzędzia badawcze potrzebne do oznaczenia stężenia białek w ślinie

Aparatura i sprzęt	Odczynniki i roztwory
<ul style="list-style-type: none">- Spektrofotometr UV- 160 A: Schimadzu- Wirówka Multi-spin MSC- 6000: Biosan	<ul style="list-style-type: none">- Wzorcowy roztwór albuminy (0,1mg/mL): Sigma-Aldrich- Odczynnik Folina-Ciocalteu: Sigma-Aldrich- Odczynnik miedziowy A: 2,0 g bezwodnego węglańku sodu: Sigma-Aldrich w 100 mL 0,1 M wodorotlenku sodu: Sigma-Aldrich- Odczynnik miedziowy B 0,5 g siarczanu miedzi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): Sigma-Aldrich w 100 mL 1% roztworu cytrynianu sodowego (Polskie Odczynniki Chemiczne)

W celu otrzymania próbki wzorcowej, domierzono 200 μL wzorcowego roztworu albuminy kolejno dodano 1 mL mieszaniny odczynników miedziowych A i B (w stosunku 50:1) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po tym czasie do próbek dodano 100 μL odczynnika Folina-Ciocalteu i inkubowano przez kolejne 60 min.

W celu otrzymania próbki ślepej, odmierzono 200 μL wody redestylowanej, kolejno dodano 1 mL mieszaniny odczynników miedziowych A i B i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min. Po tym czasie do próbek dodano 100 μL odczynnika Folina-Ciocalteu i inkubowano przez kolejne 60 min.

W celu otrzymania próbki badanej, odmierzono 190 μL wody redestylowanej, do której dodano 10 μL śliny. Następnie do próbki dodano mieszaninę odczynników miedziowych i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po upływie tego czasu próbki uzupełniano odczynnikiem Folina-Ciocalteu i inkubowano przez kolejne 60 min.

Absorbancję prób wzorcowych i badanych zmierzono wobec próbki ślepej — długość fali $\lambda = 750 \text{ nm}$.

Obliczenie stężenia białka w próbkach badanych dokonano na podstawie wzoru:

$$C_{\text{próbki}} = (A_{\text{próbki}} / A_{\text{wzorca}}) * C_{\text{wzorca}} * W \text{ [mg/mL]}$$

$C_{\text{próbki}}$ — stężenia białka próbki badanej,

C_{wzorca} — stężenie białka próbki wzorcowej,

$A_{\text{próbki}}$ — absorbancja próbki badanej,

A_{wzorca} — absorbancja próbki wzorcowej,

W — rozcieńczenie.

3.2.4.2. Wyznaczenie peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w ślinie

W celu przeprowadzenia pomiaru peroksydacji lipidów wykorzystano oznaczenie stężenia produktów powstających w reakcji z kwasem tiobarbiturowym — TBA. Po zajściu powyższej reakcji uzyskuje się barwny związek, który oznaczany jest spektrofotometrycznie [Celec et al., 2005] (tabela 7).

Tabela 7. Narzędzia badawcze potrzebne do oznaczenia peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w ślinie

Aparatura i sprzęt	Odczynniki i roztwory
<ul style="list-style-type: none">- Blok grzejny TB- 951U: JW Electronic- Wyrząsarka Multi Bio RS — 24: Biosan- Wyrząsarka Multi-spin MSC-6000: Biosan- Spektrofotometr UV — 160A: Shimadzu	<ul style="list-style-type: none">- N-butanol: Chempur- 0,25 M roztwór kwasu solnego — HCL: Sigma-Aldrich- 0,375% roztwór kwasu tiobarbiturowego — TBA: Sigma Aldrich- 15% roztwór kwasu trichlorooctowego — TCA: (Polskie Odczynniki Chemiczne)

Mieszaninę zawierającą: 15% roztwór kwasu trichlorooctowego — TCA oraz 0,375% roztwór kwasu tiobarbiturowego — TBA w 0,25 M roztworu kwasu solnego HCL sporządzono *ex tempore*.

Aby prawidłowo wyznaczyć peroksydację lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym początkowo należało uzyskać próbę ślepa.

W celu uzyskania próby ślepej do 500 μ L roztworu zawierającego 15% TCA i 0,375%TBA w 0,25 M roztworze HCl dodano 100 μ L wody. Po wymieszaniu roztworów przez 45 minut pozostawiono próbkę w bloku grzejnym w temperaturze 95°C. Po tym czasie ochłodzono próbki i dodano 1 mL n-butanolu. Kolejno próby wirowano przez 8 min (4000 obr./min.), po czym supernatant odpipetowano do kuwet.

Próby badane uzyskiwano w identyczny sposób, jak w przypadku próby ślepej, aczkolwiek w miejsce 100 μ L wody, dodano 100 μ L śliny.

Absorbancję prób badanych zmierzono wobec prób ślepej — długość fali $\lambda = 535$ nm.

Obliczenie peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w ślinie dokonano na podstawie wzoru:

$$\text{TBARS} = (A_{\text{próba badana}} - A_{\text{próba ślepa}}) : (\varepsilon * D) [\text{ng/mL}]$$

$A_{\text{próba badana}}$ — absorbancja próbka badanej,

- $A_{\text{próba ślepa}}$ — absorbancja próbki ślepej,
 ϵ — milimolowo współczynnik absorbancji barwnego kompleksu,
 D — długość drogi optycznej.

3.2.4.3. Wyznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekwiwalentów troloksu (TEAC) w ślinie

Test ma na celu ocenę zdolności antyoksydacyjnej badanych związków. Metoda opiera się na zdolnościach tych związków do redukcji stabilnego rodnika ABTS (2,2'-azynodi[sulfonian 3-etylbentiazoliny]) w stosunku do wzorca, którym jest troloks. Ilość zredukowanego ABTS została wyznaczona jako funkcja stężenia od czasu. Po czym przeliczono to na reaktywność troloksu [Erel, 2004] (tabela 8).

Tabela 8. Narzędzia badawcze potrzebne do wyznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekwiwalentów troloksu (TEAC) w ślinie

Aparatura i sprzęt	Odczynniki i roztwory
- Spektrofotometr UV — 160A: Shimadzu	- 1,7 mM roztwór ABTS: Sigma-Aldrich - 4,3 mM roztwór nadsiarczanu potasu: Sigma-Aldrich - 1000 μM roztworu troloksu w buforze fosforanowym (pH = 7,4): Sigma-Aldrich

Mieszaninę roztworów ABST i nadsiarczanu potasu, zmieszanych w stosunku 5:1, inkubowano przez 12 godzin w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Gotową mieszaniną użyto do wykonania oznaczeń pomiędzy dwunastą, a szesnastą godziną badań. Tuż przed wykonaniem oznaczeń, mieszaninę rozcieńczono wodą, aby absorbancja przy długości fali $\lambda = 734 \text{ nm}$ wynosiła 700 ± 20 .

W celu wykonania prawidłowych oznaczeń należało przygotować rozcieńczenia do przygotowania krzywej wzorcowej TEAC. W buforze fosforanowym w soli fizjologicznej przygotowano 2000 μL roztór troloksu (tabela 9).

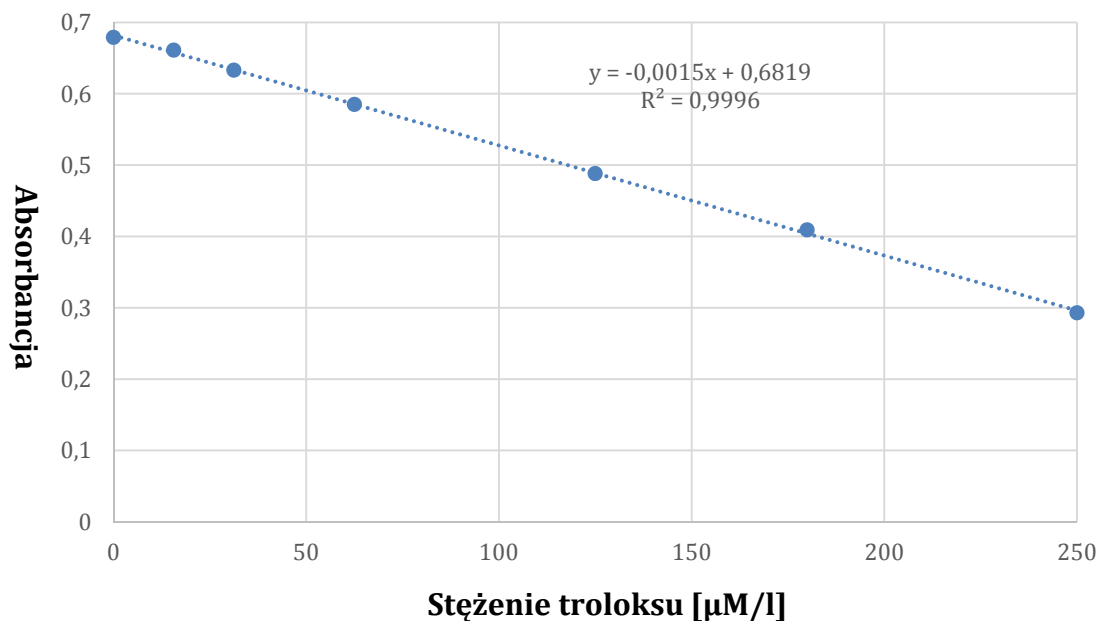
Tabela 9. Metoda przygotowania rozcieńczeń do wykonania krzywej wzorcowej TEAC

Numer roztworu	Stężenie troloksu (μM)	Sposób wykonania rozcieńczenia
1	2000	1 mL wyjściowego roztworu troloksu
2	1000	0,5 mL roztworu nr 1 + 0,5 mL buforu
3	500	0,5 mL roztworu nr 2 + 0,5 mL buforu
4	250	0,5 mL roztworu nr 3 + 0,5 mL buforu
5	125	0,5 mL roztworu nr 4 + 0,5 mL buforu
6	62,5	0,5 mL roztworu nr 5 + 0,5 mL buforu

Do 10 µL próby wzorcowej i próby badanej dodano 1000 µL wcześniej przygotowanej mieszaniny ABTS i nadisarczanu potasu. Kolejno próby inkubowano bez dostępu światła przez 6 minut.

Następnie zmierzono absorbancję prób przy długości fali $\lambda = 734 \text{ nm}$.

Powstałą krzywą wzorcową wykorzystano do obliczeń ekwiwalentów troloksu (rycina 10).



Rycina 10. Wykres wzorcowej — TEAC

3.2.4.4. Wyznaczenie produktów utleniania białek w ślinie

Metoda wykorzystuje zdolność tworzenia barwnych związków powstałych w wyniku reakcji jodku potasu z produktami utleniania białek w środowisku kwaśnym. Oznaczenie produktów zaawansowanego utleniania białek umożliwiło wykorzystanie krzywej wzorcowej reakcji jodku potasu z chloraminą T [Baskol et al., 2008] (tabela 10).

Tabela 10. Narzędzia badawcze potrzebne do wyznaczenia produktów utleniania białek AOOP w ślinie

Aparatura i sprzęt	Odczynniki i roztwory
- Spektrofotometr UV — 160A: Shimadzu	- 80% roztwór kwasu octowego: Sigma-Aldrich - 1,16 M roztwór jodku potasu KJ: Sigma-Aldrich - Bufor fosforanowy w soli fizjologicznej (pH = 7,4): Sigma-Aldrich - 100 µM roztwór chloraminy T: Sigma-Aldrich

W celu wykonania prawidłowych oznaczeń należało przygotować 100 μM roztworu chloraminy T w wodzie destylowanej, który posłużył do przygotowania krzywej wzorcowej (tabela 11).

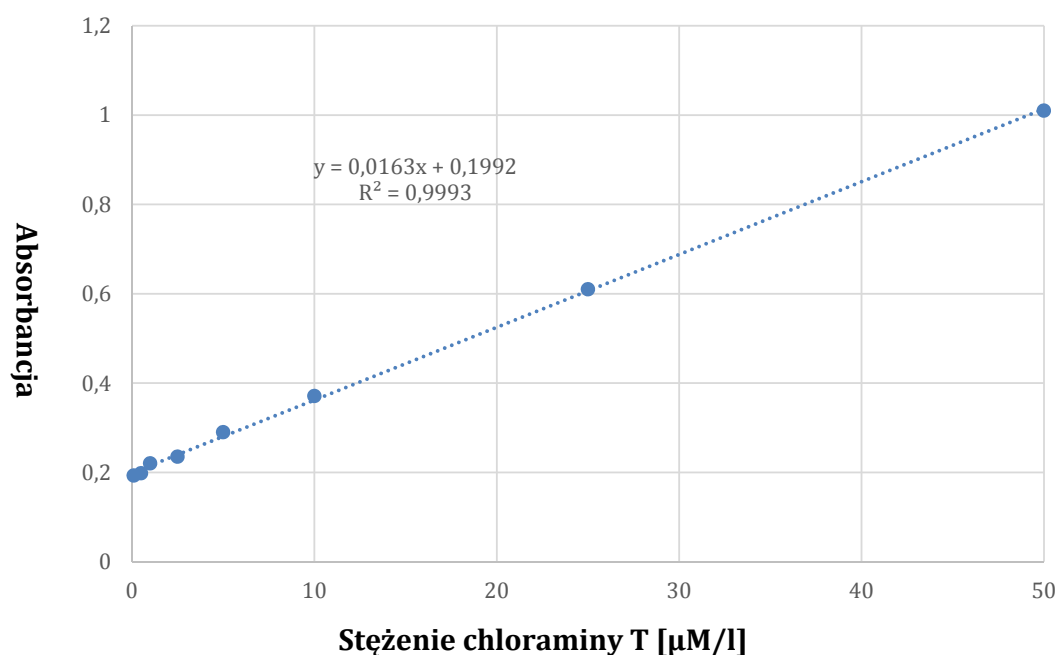
Tabela 11. Metoda przygotowania rozcieńczeń do wykonania krzywej wzorcowej AOPP

Numer roztworu	Stężenie troloksu (μM)	Sposób wykonania rozcieńczenia
1	50	0,5 mL wyjściowego roztworu wzorcowego chloraminy T + 0,5 mL wody destylowanej
2	25	0,5 mL roztworu nr 1 + 0,5 mL wody destylowanej
3	10	0,5 mL roztworu nr 2 + 0,5 mL wody destylowanej
4	5	0,5 mL roztworu nr 3 + 0,5 mL wody destylowanej
5	2,5	0,5 mL roztworu nr 4 + 0,5 mL wody destylowanej
6	1	0,5 mL roztworu nr 5 + 0,5 mL wody destylowanej
7	0,5	0,5 mL roztworu nr 6 + 0,5 mL wody destylowanej
8	0,1	0,5 mL roztworu nr 7 + 0,5 mL wody destylowanej

Do 100 μL próby badanej i wzorca wieszono 35 μL roztworu KJ, gdzie kolejno inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie po upływie tego czasu dodano 70 μL 80% roztworu kwasu octowego oraz 600 μL buforu fosforanowego i całość wymieszano ze sobą.

Absorbancję roztworu zbadano przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$.

Na podstawie otrzymanej krzywej wzorcowej dokonano obliczeń stężenia produktów utleniania białek (rycina 11).



Rycina 11. Wykres krzywej wzorcowej — AOPP

3.2.5. Metoda wyznaczenia stężenia kotyniny metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detekcją diodową w ślinie

W celu oznaczenia stężenia kotyniny w ślinie zastosowano metodę z użyciem wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detekcją diodową (HPLC-DAD). Przed wykonaniem szczegółowej analizy chromatograficznej przeprowadzono wyodrębnienie kotyniny ze śliny z wykorzystaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE) [Kulza et al., 2012]

Norefedrynę użyto jako wzorca wewnętrznego, co umożliwiło kalibrację metody. Przygotowanie wzorca wewnętrznego umożliwiło użycie norefedryny o stężeniu 100 µg/mL, którą uzyskano z roztworu wyjściowego o stężeniu 1 mg/mL poprzez rozcieńczenie metanolem.

3.2.5.1. Ekstrakcja kotyniny ze śliny do fazy stałej

Tok ekstrakcji związku badanego, kotyniny, ze śliny przebiegał wieloetapowo i wymagał użycia wyspecjalizowanego sprzętu badawczego oraz odczynników czy roztworów (tabela 12). Początkowo do 1 mL próbki śliny dodano 0,2 mL 0,1 M roztworu wodorotlenku sodu, co służyło do uzyskania pH = 9. Następnie do badanej próby dodano 150 µL wzorca wewnętrznego to znaczy roztworu norefedryny o stężeniu 100 µg/mL.

Aby proces ekstrakcji kotyniny ze śliny przebiegał prawidłowo kondycjonowano kolumny SPE poprzez dodanie kolejno:

- 2 mL metanolu,
- 2 mL dejonizowanej wody do HPLC,
- 2 mL 25 mM roztworu wodorofosforanu potasu.

W dalszym ciągu procesu naniesiono 1 mL badanej śliny na wcześniej kondycjonowane kolumny SPE. Kolejno naniesiono 2 mL 5% metanolu w celu wycięcia powstałych zanieczyszczeń ze złoża. Elucję kotyniny ze złoża kolumny SPE dokonano za pomocą metanolu do zmienionych uprzednio probówek. Probówki odparowano do sucha w blo-

Tabela 12. Narzędzia badawcze potrzebne ekstrakcji kotyniny do fazy stałej (SPE)

Aparatura i sprzęt	Odczynniki i roztwory
<ul style="list-style-type: none">- Blok grzejny TB- 951U: JW Electronic- Wytrząsarka Vortex TH- 3S: Techno Certel- PompaKNF — LAB Laboport Typ N 86. KN. 18- Kolumny do ekstrakcji do fazy stałej, Discovery reversed phases sorbent DSC — 18: Supelco- Komora próżniowa do ekstrakcji do fazy stałej: Supelco Visiprep TM DL	<ul style="list-style-type: none">- Norefedryna: Sigma — Aldrich- Woda dejonizowana do HPLC- Metanol:LiChrosolv- Wodorotlenek sodu: Sigma-Aldrich- Wodorofosforan potasu: Sigma-Aldrich

ku grzejnym w 40°C przy użyciu azotu z dodatkiem 150 µl 0,035 M HCl w metanolu. Ostatecznie suchą pozostałość z próbki rozpuszczono w 100 µL metanolu.

3.2.5.2. Warunki analizy chromatograficznej

W pierwszej kolejności wyznaczono czasy retencji zarówno dla kotyniny jak i dla wzorca wewnętrznego, czyli norefedryny. Celem wykonania oznaczenia dla badanych związków przygotowano roztwory w fazie ruchomej w stężeniu 10 µg/ml; dla norefedryny — czas retencji 2,9 min. oraz 1 µg/ml dla kotyniny — czas retencji 5,7 min.

Do rozdziału badanych związków zastosowano prekolumnę i kolumnę do chromatografii cieczowej (tabela 13). Fazę ruchomą stanowiła w 90% woda, w 10% acetonitryl, 9,15 g/l wodorofosforanu sodu, 0,5 mL/l trietyloamina. Za pomocą kwasu ortofosforowego ustalono pH dla fazy ruchomej na poziomie 4,1. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w warunkach izokratycznych. W czasie pracy chromatografu przepływ fazy był stały i wynosił 1 ml/min. Objętość dozowanej próbki wynosiła 20 µL. Przed każdym nastrzyknięciem przemywano igłę, a szybkość zarówno nastrzyku jak i pobierania próbek osiągnęła wartość 200 µL/ min. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali $\lambda = 260$ nm.

Tabela 13. Narzędzia badawcze potrzebne do analizy ilościowej kotyniny w ślinie z wykorzystaniem metody HPLC

Aparatura i sprzęt	Odczynniki i roztwory
<ul style="list-style-type: none">- Prekolumna HPLC RP — Select B: Merck- Chromatograf cieczowy HPLC: Agilent 1200 RR- pH- metr stołowy: Five Easy- Kolumna do HPLC — Selec B (105 mm * 4,5 mm * 5µm): Merck- Detektor diodowy: Diode Array Detector	<ul style="list-style-type: none">- Kotynina: Sigma — Aldrich- Trietyloamina: HiPerSolv- Kwas fosforowy: Fluka- Woda dejnizowana do HPLC- Wodorofosforan sodu: Sigma-Aldrich

3.2.5.3. Identyfikacja kotyniny

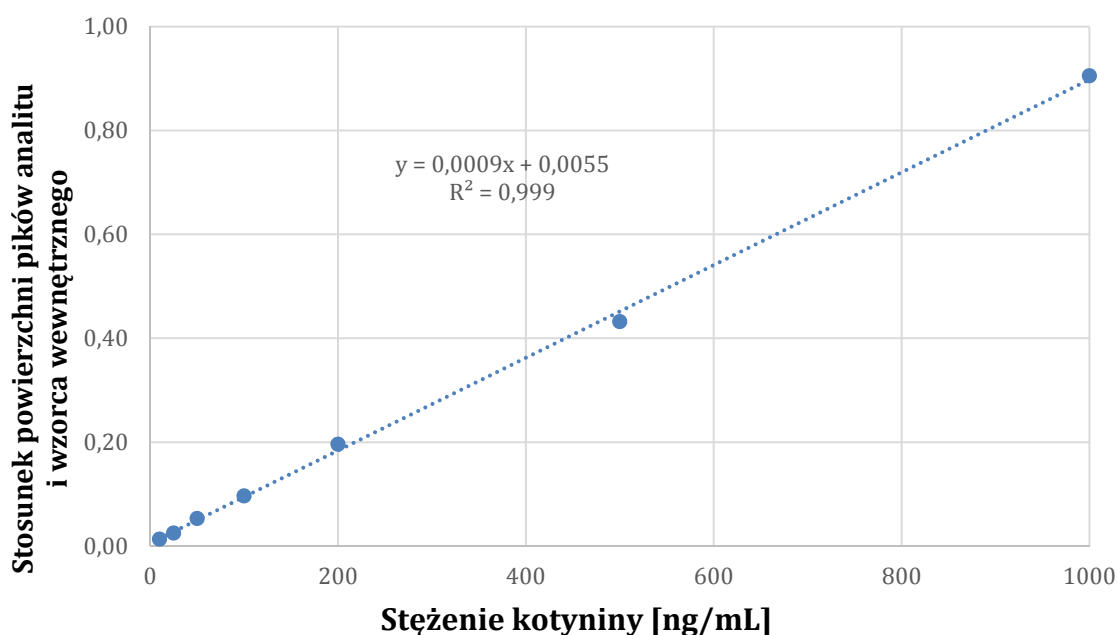
W badanych próbkach identyfikacja kotyniny polegała na porównaniu czasu retencji i widma UV pików chromatograficznych substancji wzorcowej i śliny pobranej od Pacjenta.

3.2.5.4. Walidacja metody

Przed rozpoczęciem oznaczeń wykonano walidację metody, celem której było wyznaczenie liniowości, granicy wykrywalności (LOD), granicy oznaczalności (LOQ) oraz powtarzalności.

Wyznaczenie liniowości metody uzyskano poprzez zastosowanie serii próbek wzorców zawierających kotyninę. Roztwory kalibracyjne sporządzono przez rozcieńczenie roztworu podstawowego kotyniny w stężeniu 1 mg/mL. Wartości stężeń roztworów kalibracyjnych uzyskano w zakresie od 400 do 10 ng/mL.

Krzywą kalibracyjną oszacowano przez badanie stosunku pola powierzchni znaczonego związku od stężenia. Wyniki odniesiono do wzorca zewnętrznego. Metoda liniowa w zakresie badanych stężeń (rycina 12).

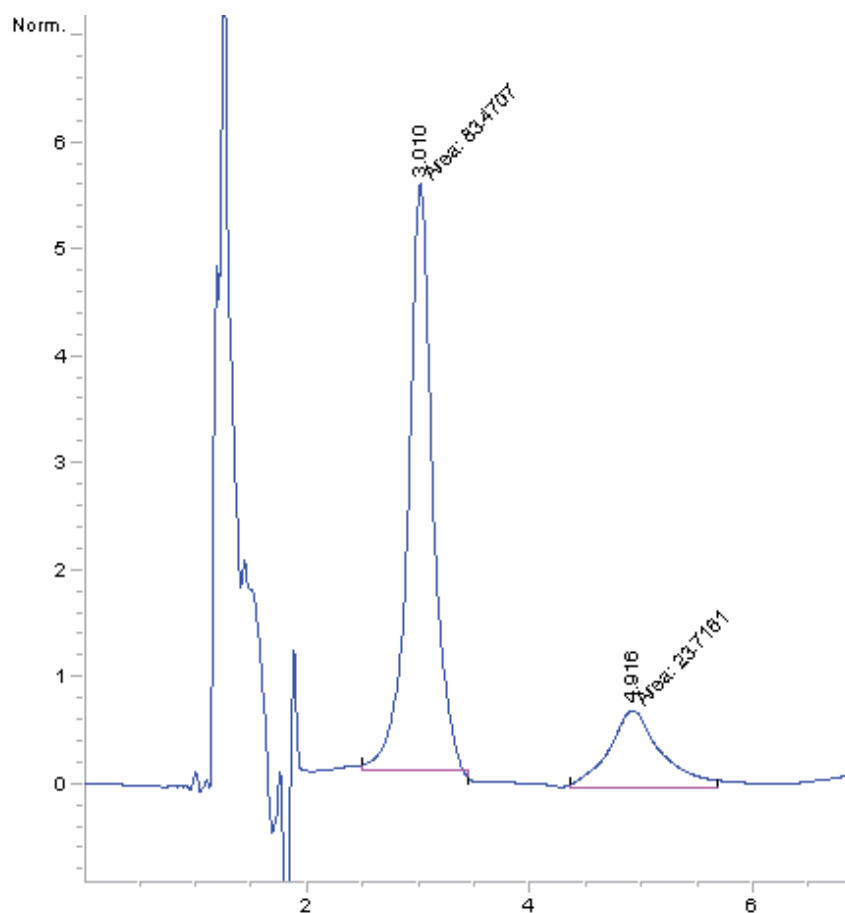


Rycina 12. Krzywa kalibracyjna kotyniny

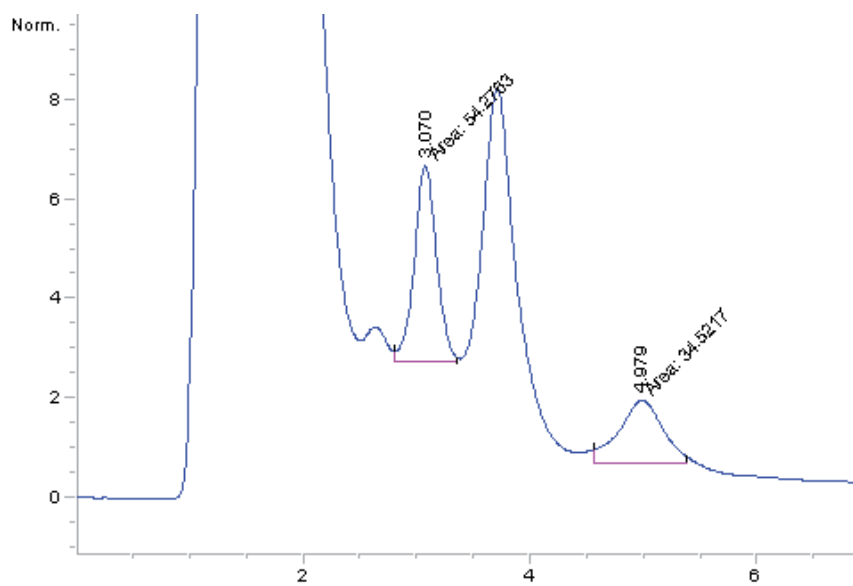
Granice wykrywalności (LOQ) i wykrywalności (LOD) określono dla kotyniny o różnych stężeniach znajdującej się w ślinie. Za granicę wykrywalności przyjęto stosunek sygnału do szumu $S/N = 3$. Na podstawie najmniejszego stężenia kotyniny możliwego do wykrycia i oznaczenia na pożądanym poziomie precyzji i poprawności ustalono granicę oznaczalności.

Powtarzalność metody zbadano poprzez analizę próbek składających się z trzech elementów, podczas jednego dnia — powtarzalność wewnątrzgrupowa, a także pomiędzy trzema dniami — powtarzalność zewnątrzgrupowa. Stężenia kotyniny w próbach analizowanej śliny wynosiły 10 ng/mL oraz 300 ng/mL.

Powtarzalność w ciągu dnia dla stężenia niskiego wynosiła 7,48%, dla stężenia wysokiego — 3,5%.



Rycina 13. Chromatogram dla substancji wzorcowych: norefedryna (10 ug/mL) — czas retencji 3,010 min; kotynina (1 ug/mL) — czas retencji 4,916 min



Rycina 14. Chromatogram próbki śliny pochodzącej od pacjenta

Powtarzalność pomiędzy dniami dla stężenia kotyniny 30 ng/ml wynosiła 2,4%, natomiast dla stężenia 110 ng/ml wynosiła 4,1%.

3.2.6. Analiza statystyczna

Parametry mierzalne takie jak wiek, białko, TBARS, TEAC, AOPP, kotynina w analizowanych grupach opisano średnią arytmetyczną, odchyleniem standardowym, medianą oraz pomiarem minimalnym i maksymalnym. Sprawdzone zgodność z rozkładem normalnym pomiarów poszczególnych parametrów w każdej z analizowanych grup testem Shapiro-Wilka. Ponieważ nie potwierdzono zgodności wyżej wymienionych parametrów z rozkładem normalnym zastosowano testy nieparametryczne. Dla porównania dwóch grup test Manna-Whitneya, dla porównania czterech grup test Kruskala-Willisa z testem wielokrotnych porównań Dunna.

Parametry na skali porządkowej takie jak wykształcenie, miejsce zamieszkania, określenie higieny według wskaźnika PII i API opisano rozkładem, czyli liczebnością i odpowiadającym im procentom w poszczególnych kategoriach w analizowanych grupach. Do porównań zastosowano wcześniej wymienione testy nieparametryczne.

Parametry jakościowe, kategoryjne takie jak płeć, palenie papierosów, użycie nitki stomatologicznej, użycie szczoteczki międzyzębowej, użycie irygatora, użycie płukanki dentystycznej, liczebnościami i odpowiadającymi im procentami. Do zbadania zależności między analizowanymi grupami stworzono tabele kontyngencji. Dla tabel 2x2 zastosowano testy χ^2 z poprawką Yatesa lub test dokładny Fishera. Dla tabel o większej wymiarowości zastosowano test χ^2 Pearsona lub test Fishera-Freemana-Haltona. Różnicę między dwoma frakcjami- wartościami procentowymi wykazano testem u-Gaussa.

Do weryfikacji hipotez statystycznych przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$.

Do obliczeń zastosowano pakiet statystyczny Dell Statistica v. 13 (Data Analysis Software System) oraz Cytel Studio-StatXact-11 v. 11.1.0.

4. Wyniki

4.1. Ogólna charakterystyka grupy badanej

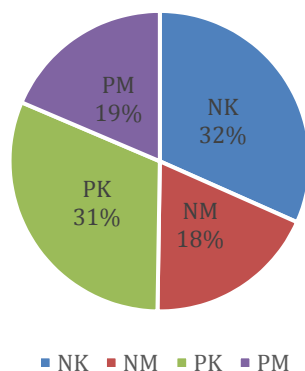
4.1.1. Rozkład ilościowy oraz wiek pacjentów

Prezentowane badanie zostało przeprowadzone u 199 osób. Do badań włączono palące kobiety oraz mężczyzn, a grupę kontrolną stanowiły osoby niepalące z obu płci. Liczba osób w poszczególnych grupach była porównywalna i została przedstawiona w tabeli 14.

Rycina 15 ilustruje procentowy udział pacjentów w każdej z podgrup.

Tabela 14. Liczbowy rozkład pacjentów w poszczególnych grupach

Grupa badana	Liczba pacjentów
Palące kobiety — PK	62
Palący mężczyźni — PM	37
Grupa kontrolna	
Niepalące kobiety — NK	63
Niepalący Mężczyźni — NM	37
Razem	199



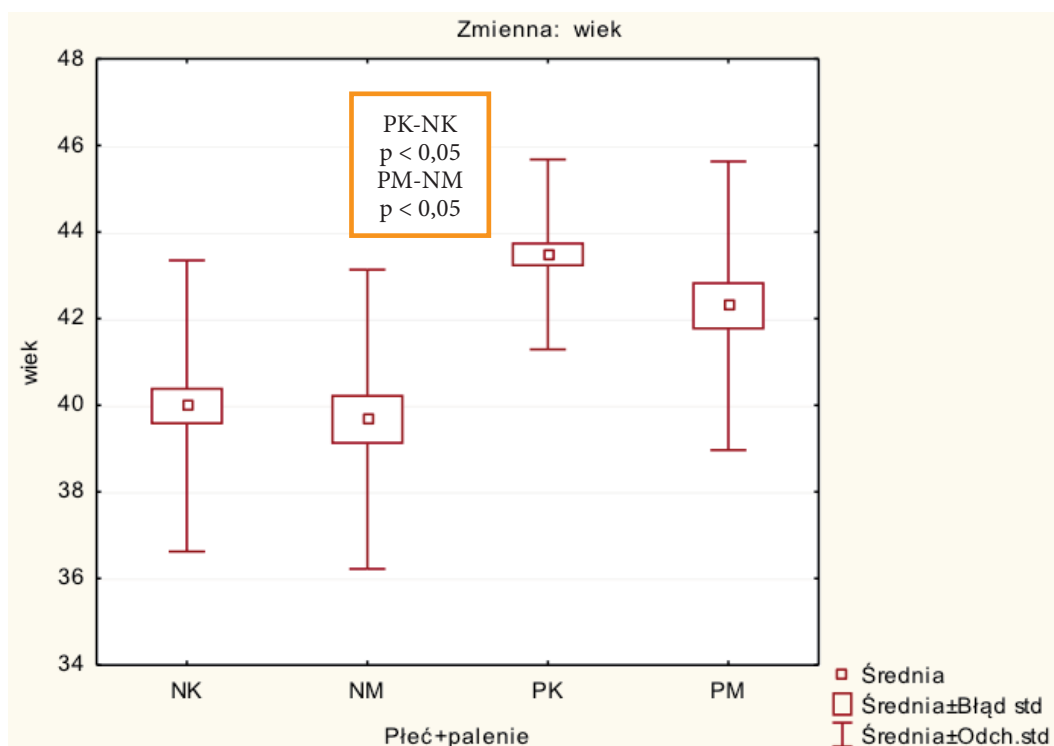
Rycina 15. Procentowa analiza poszczególnych grup pacjentów

Pacjenci zakwalifikowani do badań mieścili się w grupie wiekowej 35–45 lat. W tabeli 15 zaprezentowano wiek pacjentów z poszczególnych grupach z obliczeniem statystyki opisowej.

Tabela 15. Ilościowy rozkład wieku pacjentów w poszczególnych grupach

Grupa	Średnia	Mediana	Min	Max	SD
NK (n = 63)	39,98	40,00	35,00	46,00	3,36
NM (n = 37)	39,68	39,00	35,00	45,00	3,46
PK (n = 62)	43,48	44,50	35,00	45,00	2,19
PM (n = 37)	42,30	44,00	35,00	45,00	3,33

Po przeprowadzeniu analizy statystycznej wykazano statystycznie istotne różnice względem wieku, a poszczególnymi grupami. Wnoszący do przeprowadzonych badań jest fakt odnotowania statystycznie istotnych różnic w przypadku palących kobiet i niepalących kobiet $p = 0,0001$, oraz analogicznie mężczyzn $p = 0,006$. W przypadku obu płci palenie deklarowały osoby starsze (rycina 16).



Rycina 16. Wykres ramkowy przedstawiający średnią wiek dla poszczególnych grup

4.1.2. Status socjoekonomiczny pacjentów

Analiza danych uzyskanych z autorsko opracowanej ankiety, umożliwiła scharakteryzowanie grupy pod względem socjoekonomicznym. Podczas badania analizowano miejsce zamieszkania, rodzaj wykonywanej pracy oraz wykształcenie z poszczególnych grup pacjentów.

Rozpatrując miejsce zamieszkania badanych zaobserwowano, że kobiety niepalące przede wszystkim zamieszkiwały tereny wiejskie (46,03%), natomiast niepalący mężczyźni miasto do 50 tysięcy mieszkańców (43,24%). Zupełnie inaczej klasyfikowało się zamieszkanie u palaczy. Zarówno palące kobiety (45,16%) jak i mężczyźni (45,95%) przede wszystkim zamieszkiwali duże miasta powyżej 100 tysięcy mieszkańców (tabela 16).

Analizując odsetek pacjentów zamieszkujących na wsiach oraz trzech różnych pod względem liczebności miastach zanotowano statystycznie istotne różnice pomiędzy kobietami palącymi, a niepalącymi na wsi, w mieście 51–100 tys. oraz w mieście powyżej 100 tys ($p < 0,005$) Sytuacja inaczej wyglądała w przypadku płci męskiej, ponieważ statystycznie istotna różnica wystąpiła tylko w przypadku miasta powyżej 100 tys. (rycina 17).

Kolejnym analizowanym parametrem był rodzaj wykonywanej pracy przez pacjentów. Zauważono, iż zarówno kobiety palące (46,77%) jak i niepalące (63,49%), przede wszystkim wykonywały pracę umysłową. Natomiast u mężczyzn rozkład nie był jednolity. Niepalący mężczyźni (59,46%) głównie wykonywali fizyczny charakter pracy, natomiast palący (62,16%) pracowali umysłowo (tabela 17).

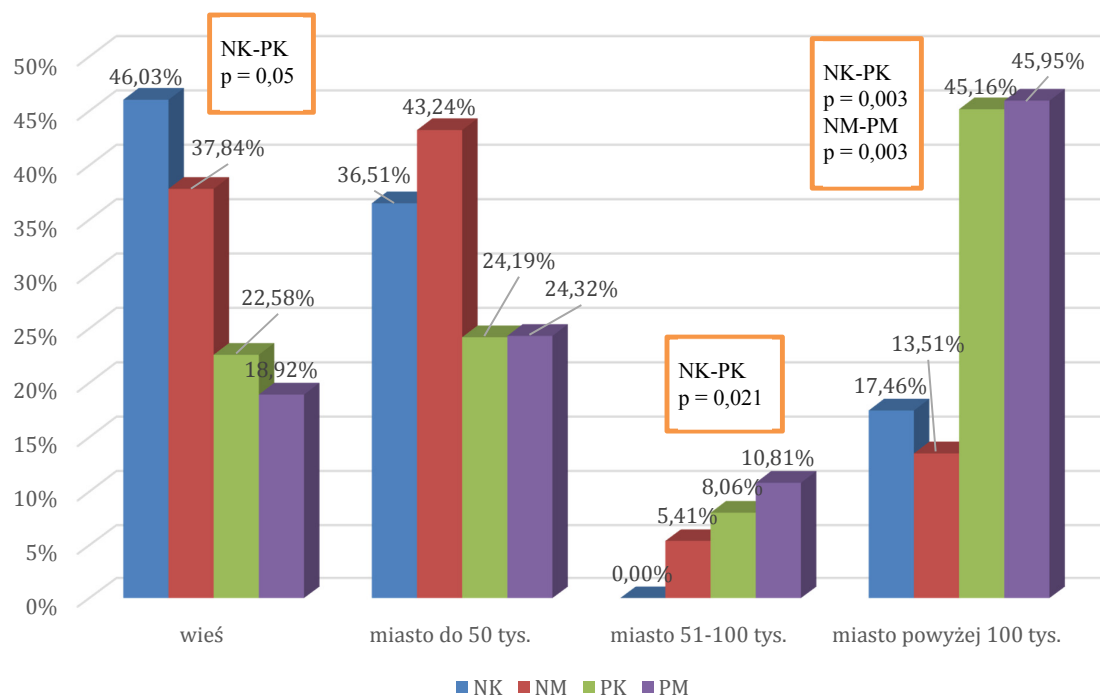
Tabela 16. Charakterystyka ilościowa poszczególnych grup pod względem zamieszkania

Grupa	Miejsce zamieszkania			
	Wieś	Miasto do 50 tys.	Miasto 51–100 tys.	Miasto powyżej 100 tys.
NK (n = 63)	29	23	0	11
NM (n = 37)	14	16	2	5
PK (n = 62)	14	15	5	28
PM (n = 37)	7	9	4	17

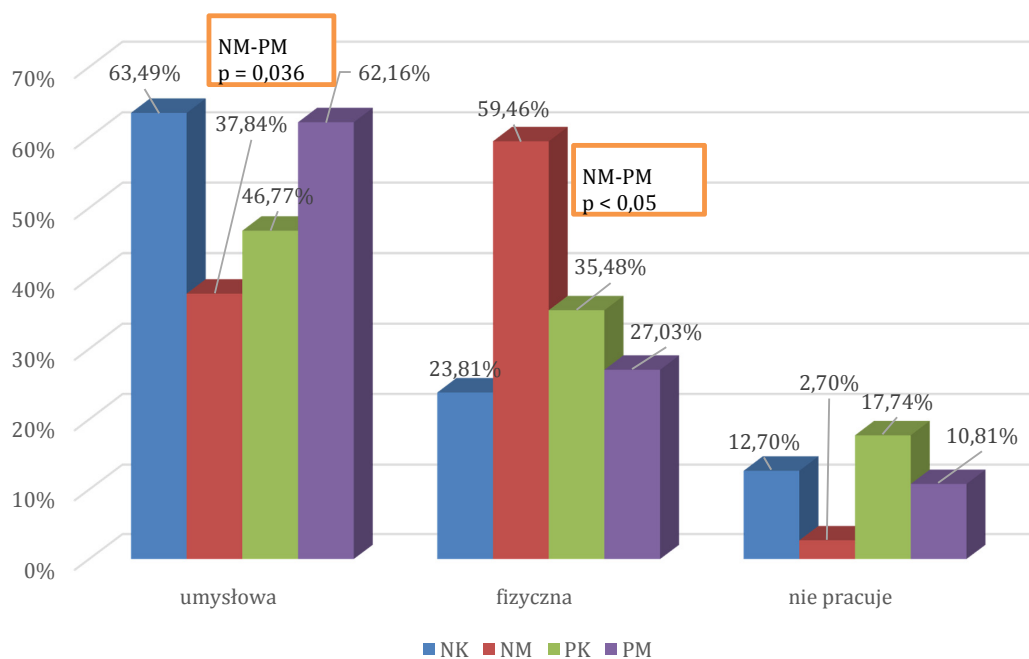
Tabela 17. Przedstawienie liczbowe rodzaju wykonywanej pracy przez badanych pacjentów

Grupa	Rodzaj wykonywanej pracy		
	Umysłowa	Fizyczna	Nie pracuje
NK (n = 63)	40	15	8
NM (n = 37)	14	22	1
PK (n = 62)	29	22	11
PM (n = 37)	23	10	4

Po przeprowadzeniu analizy statystycznej nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian pomiędzy rodzajem wykonywanej pracy, a paleniem w przypadku płci żeńskiej. Statystycznie istotna różnica wystąpiła pomiędzy mężczyznami palaczami podczas wykonywania pracy umysłowej $p = 0,036$ oraz fizycznej $p < 0,005$ (rycyna 18).



Rycina 17. Procentowe przedstawienie miejsca zamieszkania w zależności od statusu palenia oraz płci

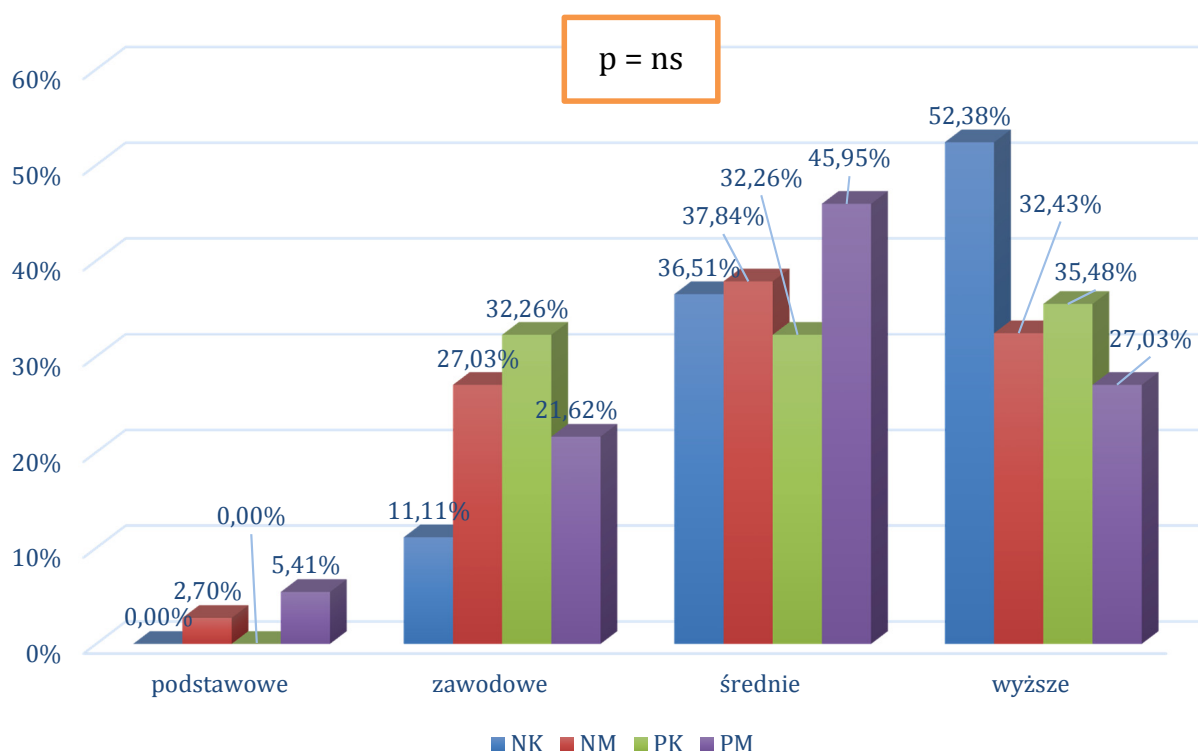


Rycina 18. Przedstawienie procentowe rodzaju wykonywanej pracy zależne od statusu palenia

Rozpatrując wykształcenie pacjentów, ustalono, iż w grupie kobiet palących domino- wało wykształcenie wyższe — 35,48%, natomiast w przypadku mężczyzn palaczy było to wykształcenie średnie — 45,95%. U osób niepalących u obu płci dominowało wy- kształcenie wyższe (kobiety — 52,38%, mężczyźni — 32,43%). Co ciekawe, nie zaobser- wowano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wykształceniem, a paleniem u obu płci (tabela 18, rycina 19).

Tabela 18. Charakterystyka ilościowa wykształcenia pacjentów w poszczególnych grupach

Grupa	Wykształcenie			
	Podstawowe	Zawodowe	Średnie	Wyższe
NK (n = 63)	0	7	23	33
NM (n = 37)	1	10	14	12
PK (n = 62)	0	20	20	22
PM (n = 37)	2	8	17	10



Rycina 19. Procentowe przedstawienie rodzaju wykształcenia pacjentów w grupach

4.2. Status palenia tytoniu — część analityczno-toksykologiczna

4.2.1. Intensywność palenia

Dane uzyskane z kwestionariusza ankiety umożliwiły scharakteryzowanie grupy palaczy pod względem intensywności dziennego palenia tytoniu (tabela 19). W przypadku płci żeńskiej najczęściej deklarowaną odpowiedzią było wypalanie od 6 do 10 papierosów dziennie, co stanowi około pół paczki papierosów w ciągu doby. Palący mężczyźni przyznawali się do podwójnie zwiększonego wypalania wyrobów tytoniowych dobowo.

Tabela 19. Ilość papierosów wypalanych w ciągu doby

Grupa	Liczba dziennie wypalanych papierosów			
	1–5	6–10	11–15	powyżej 16
PK (n = 62)	3	24	20	15
PM (n = 37)	3	7	8	19

Tendencja ta została również odnotowana w przypadku średniego stężenia kotyniny w ślinie palaczy. Szerzej omówiono zagadnienie w podrozdziale poniżej.

Biorące udział w badaniu osoby palące deklarowały czas trwania nałogu palenia tytoniu wynoszący co najmniej dwa lata.

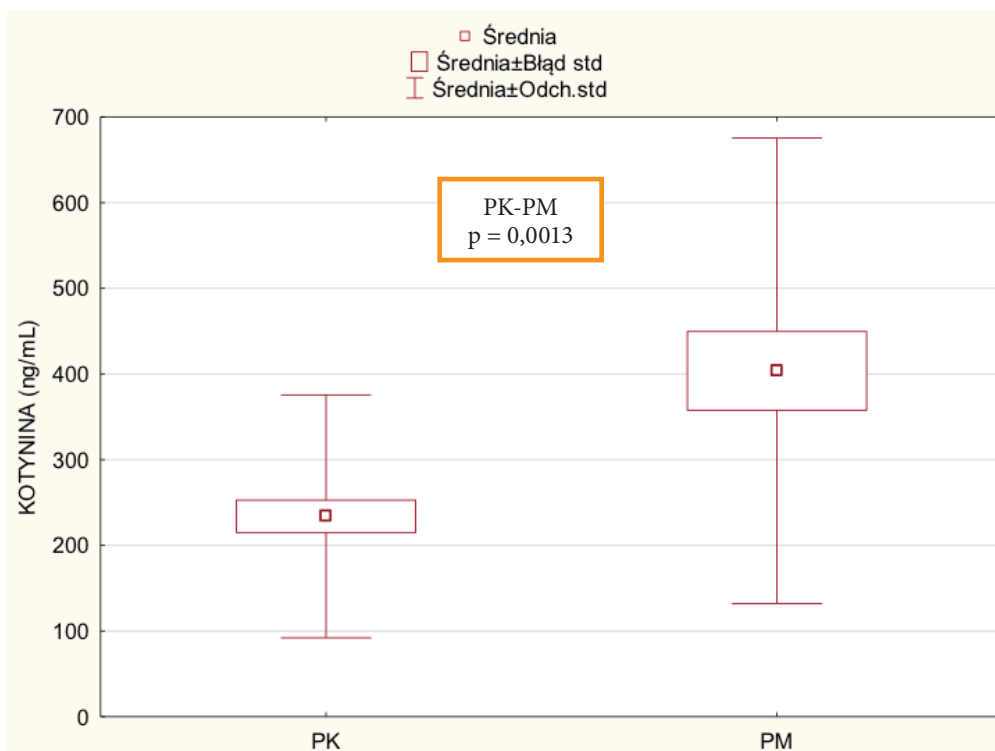
4.2.2. Kotynina

Stężenie kotyniny w ślinie pacjentów oznaczano tylko u osób palących. Liczba prób oznaczonych (n) w przypadku kobiet jest mniejsza o 10, natomiast u mężczyzn o 3 od wszystkich osób palących biorących udział w badaniu. Zostało to spowodowane uzyskaniem niedostatecznej ilości materiału badawczego — śliny.

Średnie stężenie kotyniny w ślinie pacjentów palących — kobiet wynosiło 233,87 ng/mL, a mężczyzn 403,68 ng/mL. Na podstawie analizy statystycznej wykazano, iż poziom kotyniny u kobiet palących jest statystycznie istotnie niższy, niż u mężczyzn palących (tabela 20, rycina 20).

Tabela 20. Wartości średnie dla kotyniny w ślinie u kobiet i mężczyzn palących

Grupa	Kotynina (ng/mL)				
	Średnia	Mediana	Min	Max	SD
PK (n = 53)	233,87	211,19	66,24	599,47	141,77
PM (n = 34)	403,68	369,66	88,02	1167,55	271,53



Rycina 20. Wykres ramkowy przedstawiające średnie stężenie kotyniny u kobiet i mężczyzn palących

4.2.3. Ocena błony śluzowej osób przewlekle palących tytoń

Jednym z etapów badania stomatologicznego jamy ustnej pacjentów stanowiła ocena błony śluzowej. W grupie osób palących u obu płci najczęściej obserwowaną zmianą było przebarwienie melaninowe. Melanoza zazwyczaj lokalizowała się na błonie śluzowej policzków, wargi dolnej, a rzadko podniebienia. Drugą w kolejności odnotowaną zmianą była leukoplakia. Białe plamy i smugi występowały najczęściej na bocznej powierzchni języka oraz w trójkącie zatrzonowcowym. Wyłącznie u jednego pacjenta zdiagnozowano zmianę o charakterze erytroleukoplakii. Uogólnione zapalenie jamy ustnej w postaci *stomatitis nicotinic*a wystąpiło u 3 osób badanych. Dodatkowo u większości palaczy wystąpiła suchość jamy ustnej oraz efekt nieprzyjemnego zapachu z ust. Występowanie nieprawidłowości zmian zlokalizowanych w jamie ustnych palaczy przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Występowanie nieprawidłowości i chorób błony śluzowej u osób palących tytoń

Grupa	Przebarwienie melaninowe	Leukoplakia	<i>Stomatitis nicotinic</i> a	Erytroleukoplakia	Kserostomia	Halitosis
PK (n = 53)	18	7	1	0	33	25
PM (n = 34)	12	9	2	1	21	16

Pacjenci, u których stwierdzono wystąpienie zmian patologicznych na błonie śluzowej jamy ustnej, zostali skierowani do poradni specjalistycznych w celu dalszej diagnostyki oraz objęcia leczeniem.

4.3. Higiena jamy ustnej — część kliniczna

Podstawą oceny zróżnicowania stanu higieny jamy ustnej było przeanalizowanie i opracowanie zadeklarowanych przez Pacjentów odpowiedzi w ankiecie dotyczące częstotliwości szczotkowania zębów, korzystania z dodatkowych instrumentów higienizacyjnych, takich jak: irygator wodny, szczoteczka międzyzębowa, nić dentystyczna oraz płukan-ka stomatologiczna. Dodatkowo zmierzono i poddano analizie statystyki opisowej dwa wskaźniki płytki nazębnej API oraz PII.

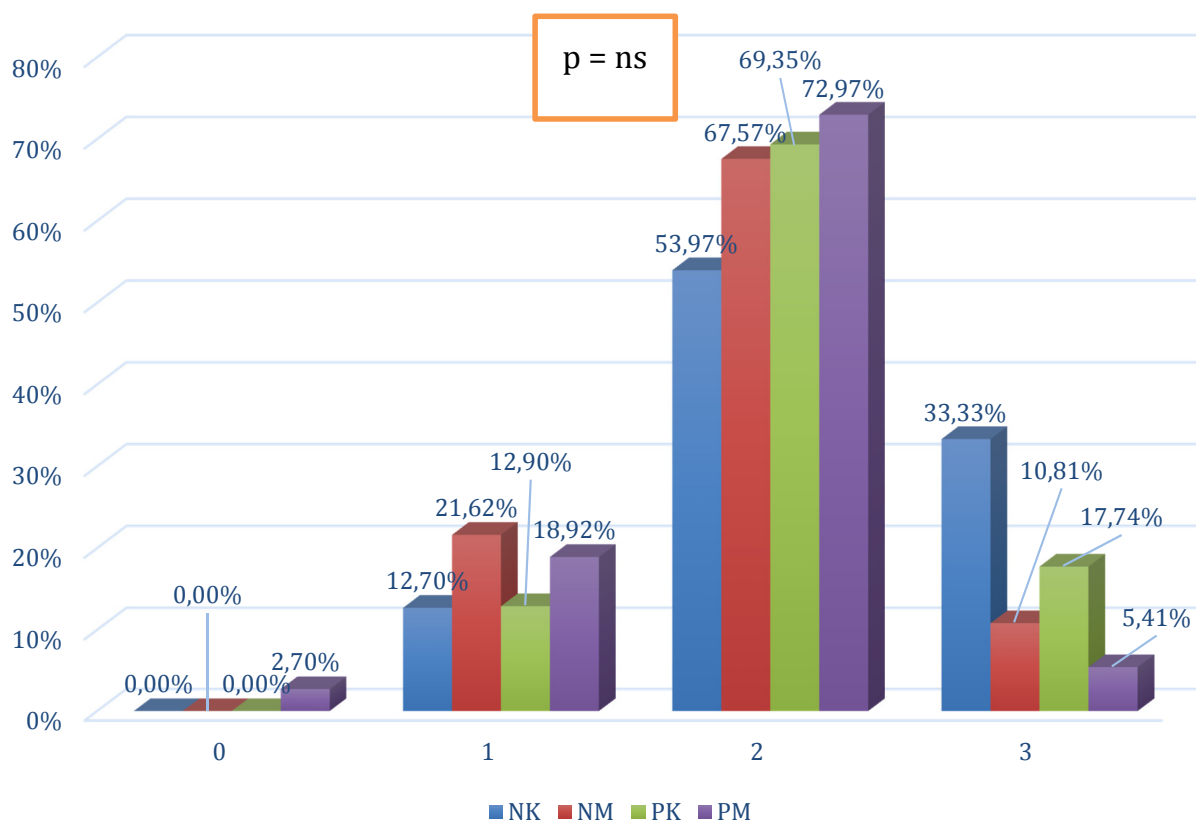
4.3.1. Szczotkowanie zębów

W przeprowadzonej ankiecie wśród pacjentów, do regularnego szczotkowania zębów, przy pomocy szczoteczki do zębów i pasty, dwa lub więcej razy dziennie, przyznało się 55 kobiet niepalących oraz 54 kobiety palące i 29 mężczyzn niepalących oraz 29 mężczyzn palących. Rzadsze szczotkowanie jamy ustnej, czyli raz lub wcale, deklarowała zdecydowana mniejszość pacjentów ze wszystkich grup. Na rycinie przedstawiono procentowy rozkład częstotliwości szczotkowania grup, natomiast w tabeli ilości rozkład pacjentów (tabela 22, rycina 21).

Tabela 22. Dobowa częstotliwość szczotkowania zębów przez pacjentów

Grupa	Częstość szczotkowania zębów na dobę			
	Wcale	Raz	Dwa	Trzy i więcej
NK (n = 63)	0	8	34	21
NM (n = 37)	0	8	25	4
PK (n = 62)	0	8	43	11
PM (n = 37)	1	7	27	2

Uzyskane wyniki były zbliżone w badanych grupach kobiet i mężczyzn niepalących i palących, stąd podczas analizy statystycznej, nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy paleniem, a częstością szczotkowania zębów.



Rycina 21. Graficzne przedstawienie częstości szczotkowania zębów przez pacjentów w grupach

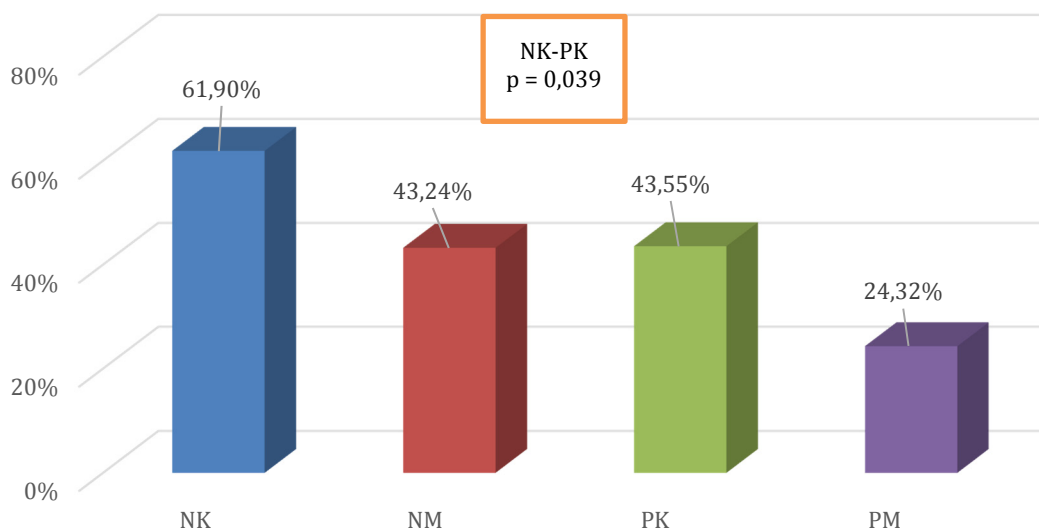
4.3.2. Stosowanie nici dentystycznej

Stosowanie przez pacjentów nici dentystycznej, która służy do oczyszczania przestrzeni międzyzębowych, zaobserwowano przede wszystkim u płci żeńskiej. W grupie badanej odnotowano, że 43,55% kobiet, a 24,32% mężczyzn nitkuje zęby. Natomiast w grupie kontrolnej 61,90% kobiet, a 43,24% mężczyzn stosuje ten dodatkowy przyrząd higieniczny (tabela 23, rycina 22).

Wykazano statystycznie istotną różnicę, pomiędzy grupą niepalących, a palących kobiet w stosunku do użycia nitki dentystycznej ($p = 0,039$). W porównaniu pozostałych grup ze względu na zbliżone wyniki różnic nie stwierdzono.

Tabela 23. Deklarowane stosowanie nici dentystycznej przez pacjentów

Grupa	Stosowanie nici dentystycznej	
	Nie	Tak
NK (n = 63)	24	39
NM (n = 37)	21	16
PK (n = 62)	35	27
PM (n = 37)	28	9



Rycina 22. Graficzne przedstawienie stosowania nici dentystycznej przez pacjentów w grupach

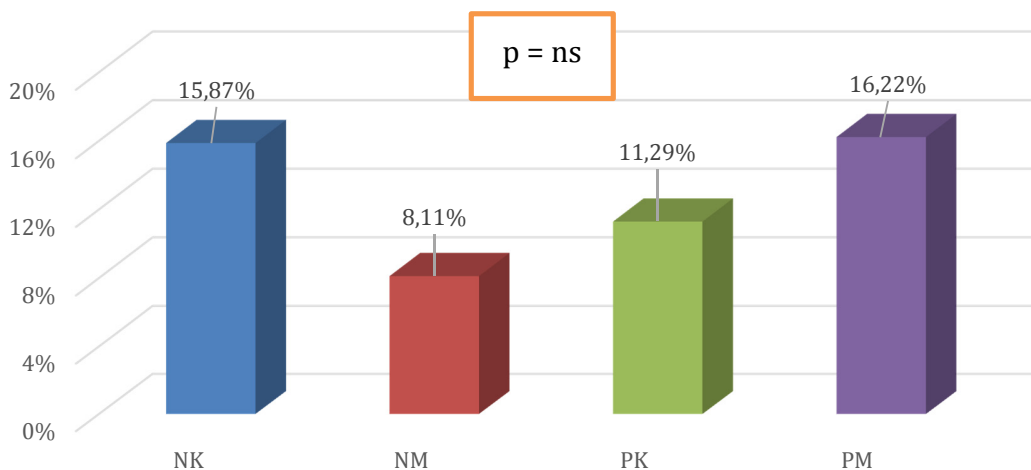
4.3.3. Stosowanie szczoteczki międzyzębowej

Użytkowanie przez pacjentów szczoteczki międzyzębowej zaobserwowano przede wszystkim u mężczyzn palaczy, bo aż w 16,22%. Kolejną grupą, w której ten element higieniczny używany był w 15,87% to kobiety niepalące. W pozostałych dwóch grupach to znaczy u niepalących mężczyzn oraz palących kobiet wyniki były podobne, ponieważ mieściły się w przedziale 8–12% (tabela 24).

Tabela 24. Deklarowane stosowanie szczoteczki międzyzębowej przez pacjentów

Grupa	Stosowanie szczoteczki międzyzębowej	
	Nie	Tak
NK (n = 63)	53	10
NM (n = 37)	34	3
PK (n = 62)	55	7
PM (n = 37)	31	6

Stosując analizę statystyczną, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy stosowaniem szczoteczek międzyzębowych, a paleniem tytoniu (rycina 23).



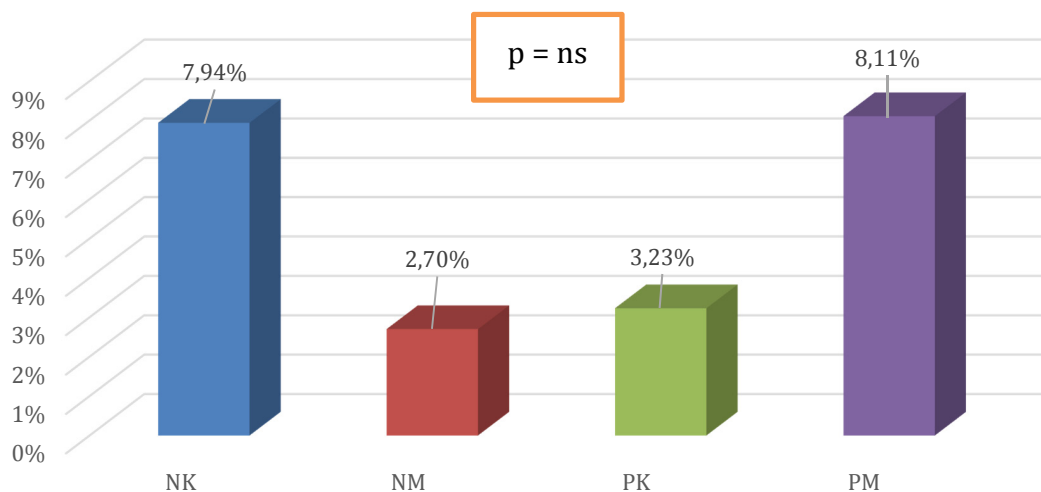
Rycina 23. Graficzne przedstawienie stosowania przez pacjentów szczoteczki międzyzębowej

4.3.4. Stosowanie irygatora wodnego

Do korzystania z irygacji wodnych, jako dodatkowego elementu oczyszczania przestrzeni międzyzębowych, przyznała się najmniejsza liczba badanych. Zaledwie 5 kobiet niepalących i 1 mężczyzna niepalący posiadali i stosowali irygacje wodne, natomiast wśród palaczy tylko 2 kobiety i 3 mężczyzn (tabela 25, rycina 24).

Tabela 25. Deklarowane stosowanie irygatora przez pacjentów

Grupa	Stosowanie irygatora	
	Nie	Tak
NK (n = 63)	58	5
NM (n = 37)	36	1
PK (n = 62)	60	2
PM (n = 37)	34	3



Rycina 24. Graficzne przedstawienie stosowania przez pacjentów irygacji wodnych

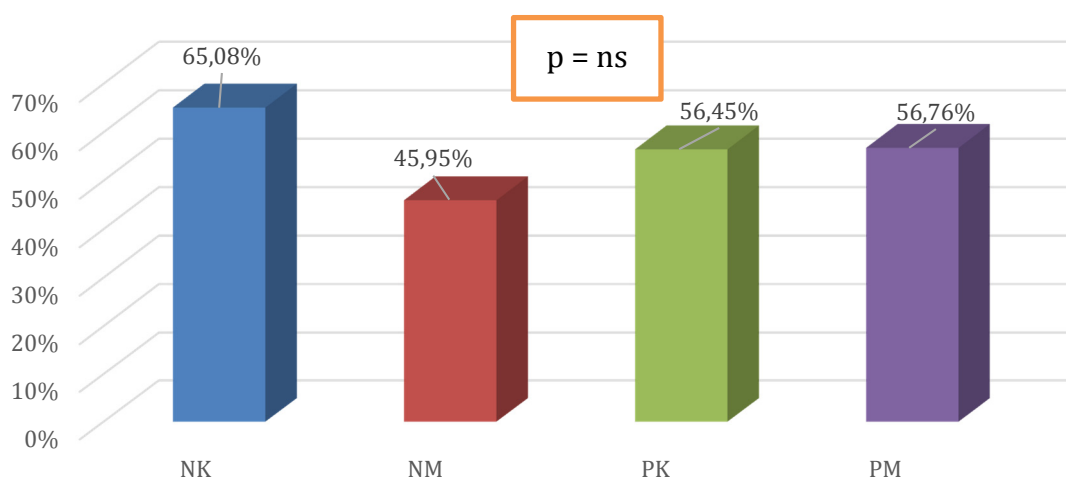
Ze względu na tak stosunkowo niewielkie zastosowanie przez pacjentów irygacji wodnych, nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy badanymi grupami palących kobiet i mężczyzn oraz niepalący obu płci.

4.3.5. Stosowanie płukanki stomatologicznej

Zaraz za szczotkowaniem jamy ustnej, stosowanie płukanki stomatologicznej stanowiło, jako elementu oczyszczania jamy ustnej występowało najczęściej wśród przebadanych pacjentów. Grupą najchętniej sięgającą po płukanki dentystyczne stanowiły niepalące kobiety (65,08%), najrzadziej zaś palący mężczyźni (45,95%). W pozostałych dwóch grupach, czyli w grupach palących kobiet i mężczyzn, użycie płukanki stomatologicznej jest na równym poziomie (tabela 26, rycina 25).

Tabela 26. Deklarowane stosowanie płukanki stomatologicznej przez pacjentów

Grupa	Stosowanie płukanki stomatologicznej.	
	Nie	Tak
NK (n = 63)	22	41
NM (n = 37)	20	17
PK (n = 62)	27	35
PM (n = 37)	16	21



Rycina 25. Graficzne przedstawienie stosowania przez pacjentów płukanek stomatologicznych

4.3.6. Wskaźnik Plaque Index

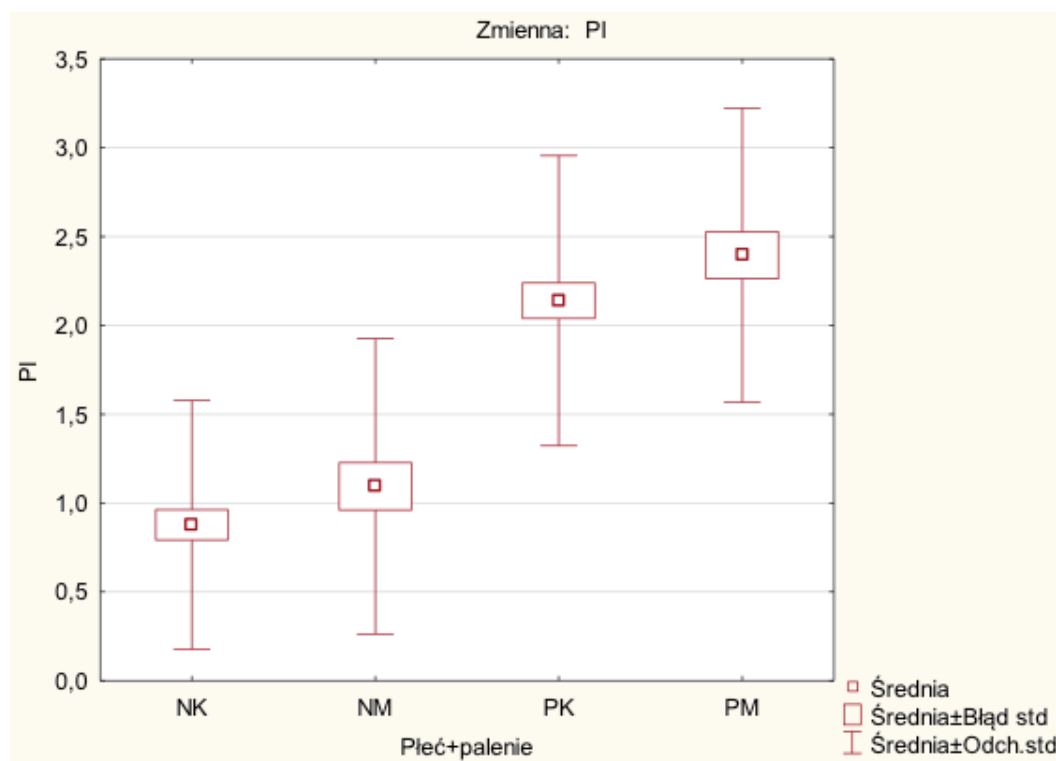
Wartości średnie wskaźnika PII obliczone dla wszystkich grup wahały się w granicach 0,88, a 2,39 (tabela 27).

Tabela 27. Statystyka opisowa wskaźnika płytki nazębnej PII dla czterech badanych grup

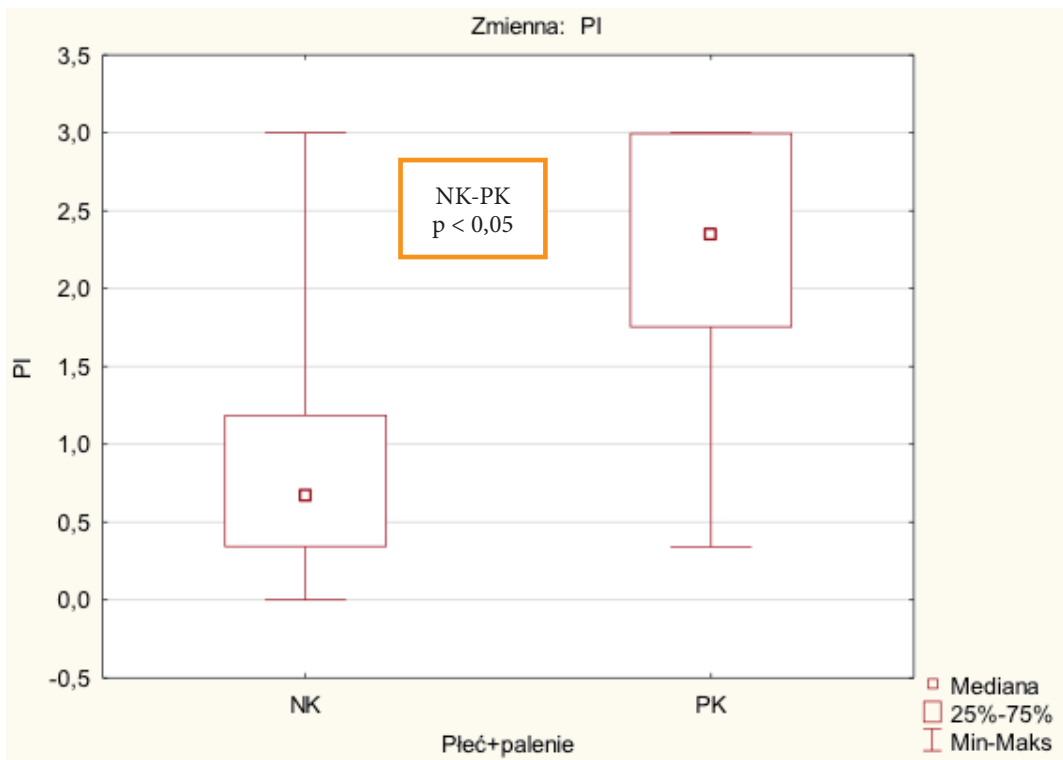
Grupa	Wskaźnik płytki nazębnej PII						
	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
NK (n = 63)	0,88	0,67	0,00	3,00	0,34	1,19	0,70
NM (n = 37)	1,09	0,85	0,00	3,00	0,50	1,50	0,83
PK (n = 62)	2,14	2,35	0,34	3,00	1,75	3,00	0,82
PM (n = 37)	2,39	2,70	0,00	3,00	2,23	3,00	0,83

Na podstawie analizy statystycznej wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy kobietami niepalącymi, a palącymi $p < 0,05$ oraz pomiędzy niepalącymi mężczyznami, a palącymi $p < 0,05$ (rycina 26).

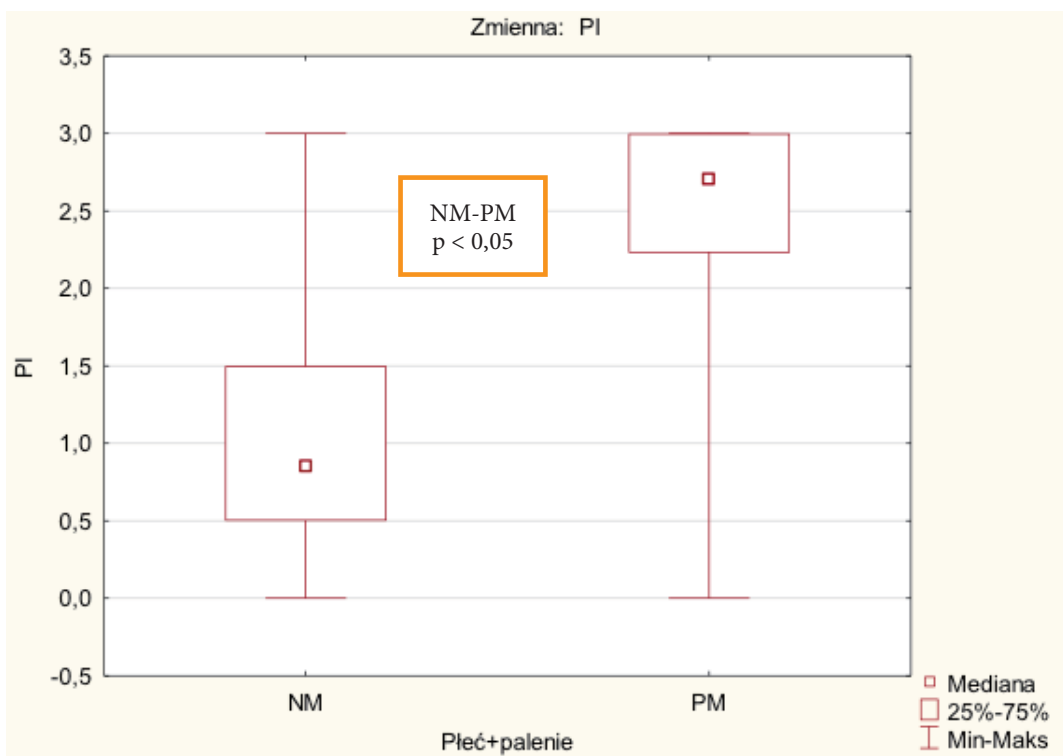
W porównaniu statystycznym grup palących kobiet i palących mężczyzn oraz niepalących kobiet i niepalących mężczyzn nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie wskaźnika PII (ryciny 27–30).



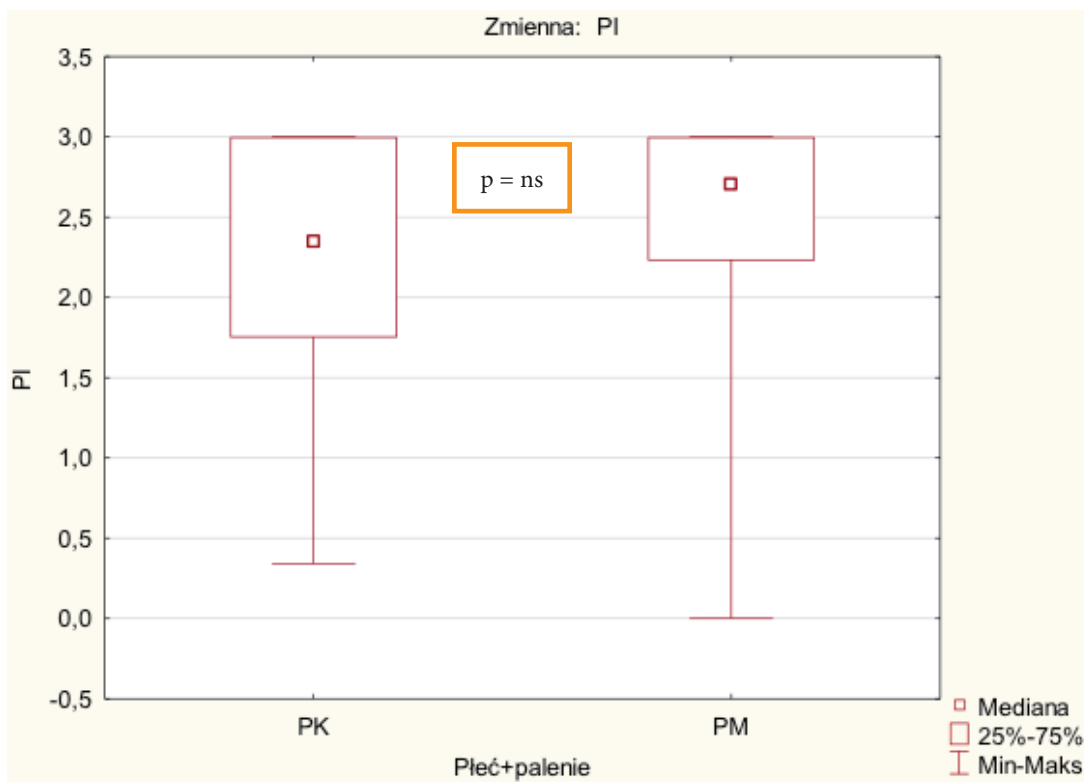
Rycina 26. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie dla wskaźnika PII



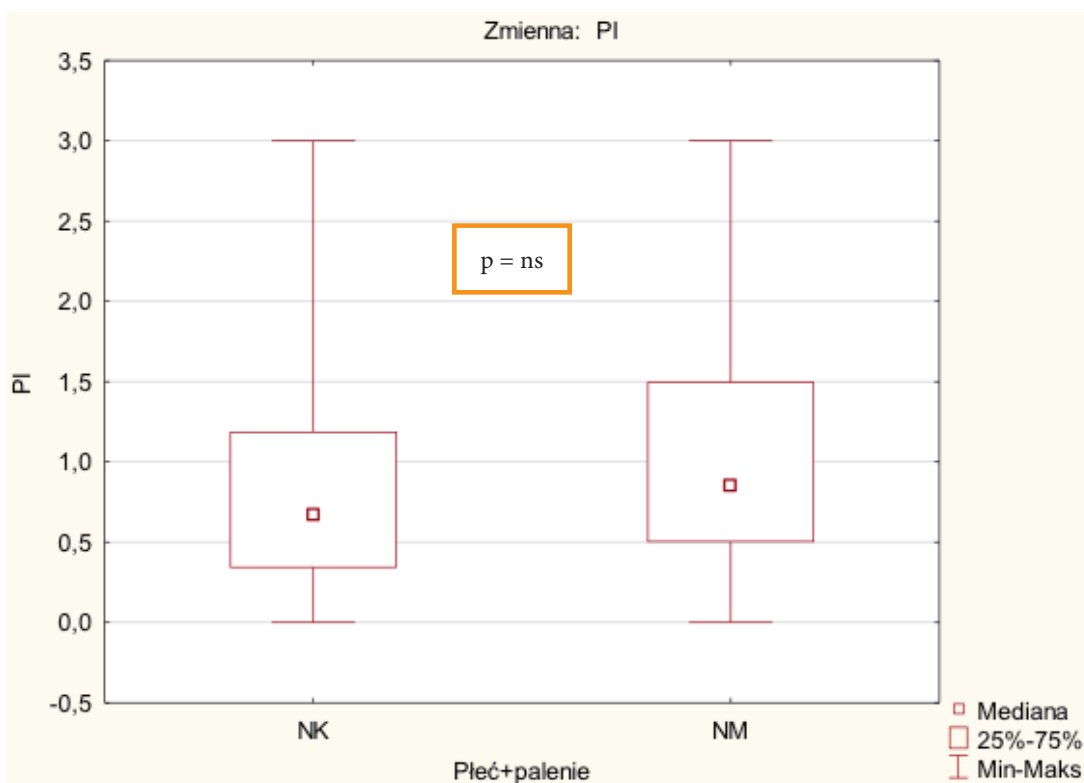
Rycina 27. Wykres ramkowy przedstawiający statystycznie istotną różnicę w wartości wskaźnika higieny P1I pomiędzy kobietami palącymi i niepalącymi



Rycina 28. Wykres ramkowy przedstawiający statystycznie istotną różnicę w wartości wskaźnika higieny P1I pomiędzy mężczyznami palącymi i niepalącymi



Rycina 29. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny P1I pomiędzy palącymi mężczyznami i kobietami



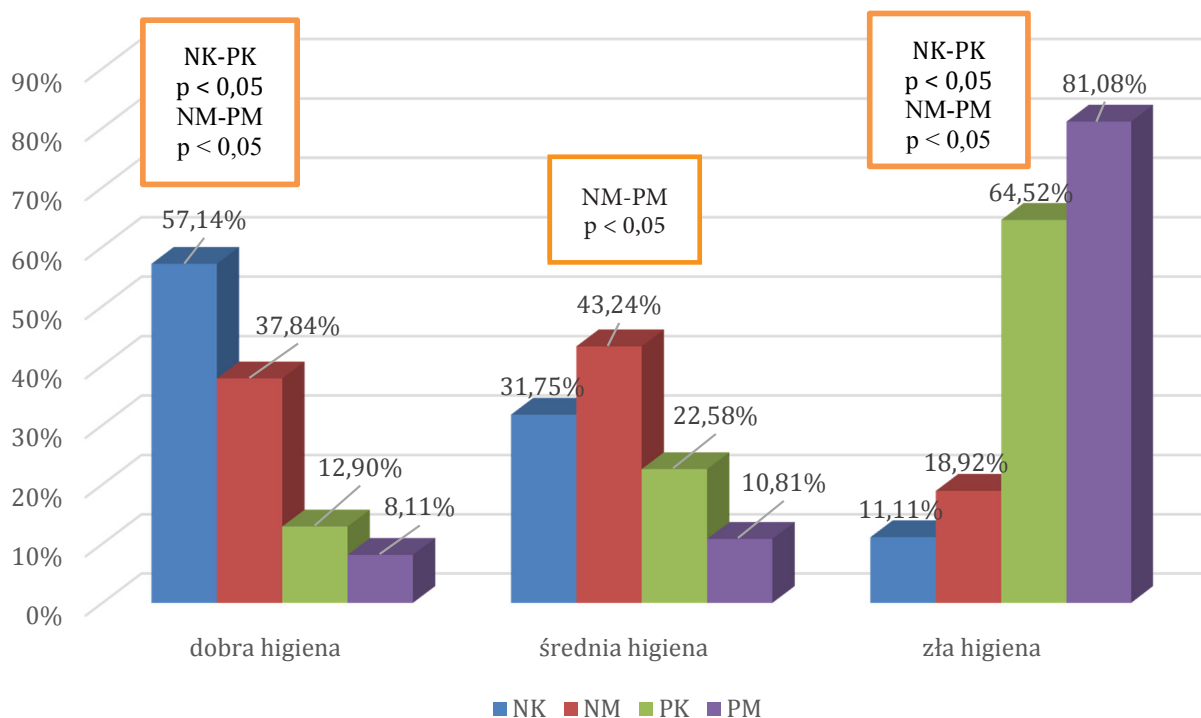
Rycina 30. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny P1I pomiędzy niepalącymi mężczyznami i kobietami

W celu oceny higieny jamy ustnej oraz wykonania analizy statystycznej pogrupowano pacjentów według wskaźnika PII. W pierwszej grupie z optymalną (dobrą) higieną jamy ustnej znalazło się 57,14% kobiet niepalących, 37,84% mężczyzn niepalących, 12,90% kobiet palących oraz 8,11% mężczyzn palących. W grupie z umiarkowaną (średnią) higieną znajdowało się 31,75% kobiet niepalących, 43,24% mężczyzn niepalących, 22,58% kobiet palących oraz 10,81% mężczyzn palących. Do ostatniej grupy, ze złą higieną jamy ustnej, zakwalifikowały się pozostałe osoby, to znaczy 11,11% kobiet niepalących, 18,92% mężczyzn niepalących, 64,52% kobiet palących oraz 81,08% mężczyzn palących (tabela 28).

Przeprowadzając analizę statystyczną pomiędzy wszystkimi grupami badanymi w każdej z podgrup dotyczącej jakości higieny (rycina 31) wykazano statystycznie istotne różnice. W przypadku prawidłowej (dobrej higieny) różnicę odnotowano zarówno

Tabela 28. Klasyfikacja pacjentów w zależności od jakości higieny jamy ustnej

Grupa	Wskaźnik PII		
	Dobra higiena	Średnia higiena	Zła higiena
NK (n = 63)	36	20	7
NM (n = 37)	14	16	7
PK (n = 62)	8	14	40
PM (n = 37)	3	4	30



Rycina 31. Graficzne przedstawienie klasyfikacji pacjentów do podgrup w zależności od jakości higieny

między palącymi i niepalącymi kobietami ($p = 0,0023$) oraz palącymi i niepalącymi mężczyznami ($p = 0,00037$). Podobne istotne statystycznie różnice zaobserwowano w przypadku złej higieny jamy ustnej pomiędzy palaczami i osobami niepalącymi u obu płci ($p < 0,05$). W grupie środkowej, ze średnią higieną jamy ustnej, różnica wystąpiła wyłącznie pomiędzy niepalącymi, a palącymi mężczyznami ($p = 0,0017$).

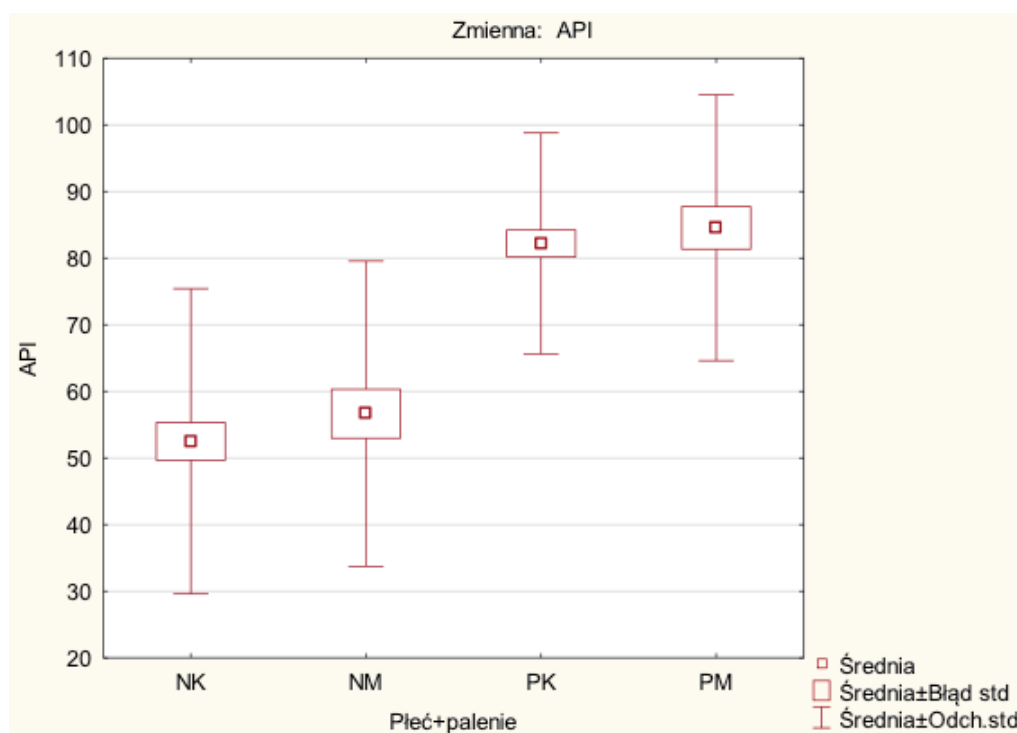
4.3.7. Wskaźnik Aproximal Plaque Index

Wskaźnik obecności płytki nazębnej w przestrzeniach międzyzębowych (API) w grupach badanych wykazywał średnie wartości wahające się pomiędzy 52,50, a 84,54 procent (tabela 29).

Na podstawie analizy statystycznej wykazano wystąpienie statystycznie istotnej różnicy pomiędzy palącymi kobietami, a niepalącymi kobietami $p < 0,05$ oraz palącymi mężczyznami, a niepalącymi mężczyznami $p < 0,05$ (rycina 32).

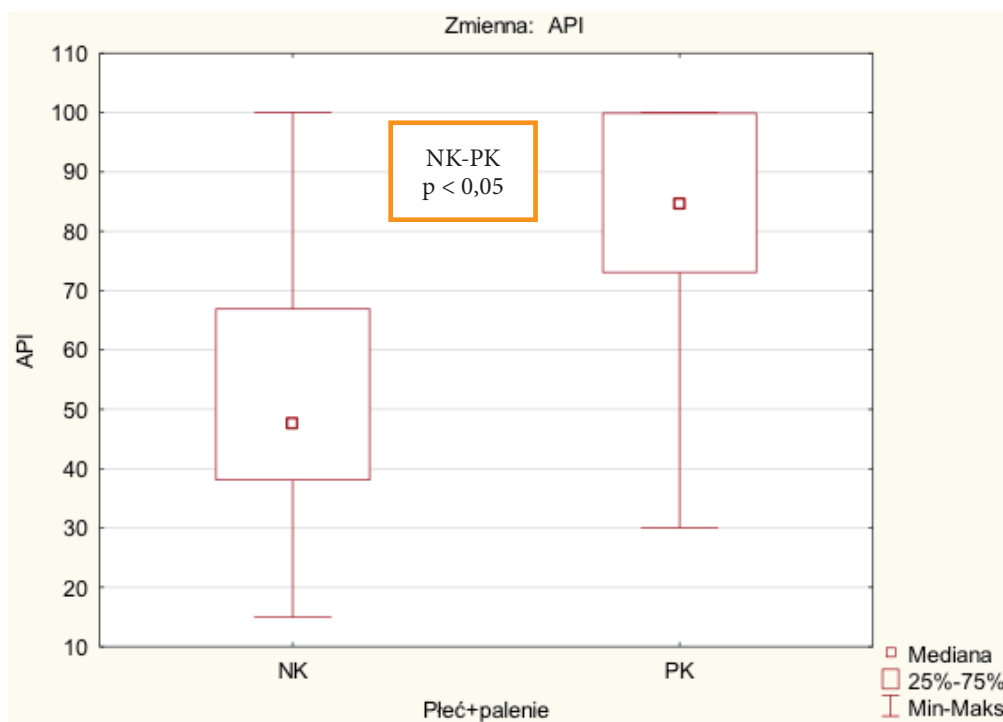
Tabela 29. Statystyka opisowa wskaźnika płytki nazębnej API dla czterech badanych grup

Grupa	Wskaźnik płytki nazębnej API						
	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
NK (n = 63)	52,50	47,50	15,00	100,00	38,00	67,00	22,92
NM (n = 37)	56,65	51,00	18,00	100,00	41,00	70,00	22,91
PK (n = 62)	82,19	84,50	30,00	100,00	73,00	100,00	16,60618
PM (n = 37)	84,54	89,00	15,00	100,00	80,00	100,00	19,94

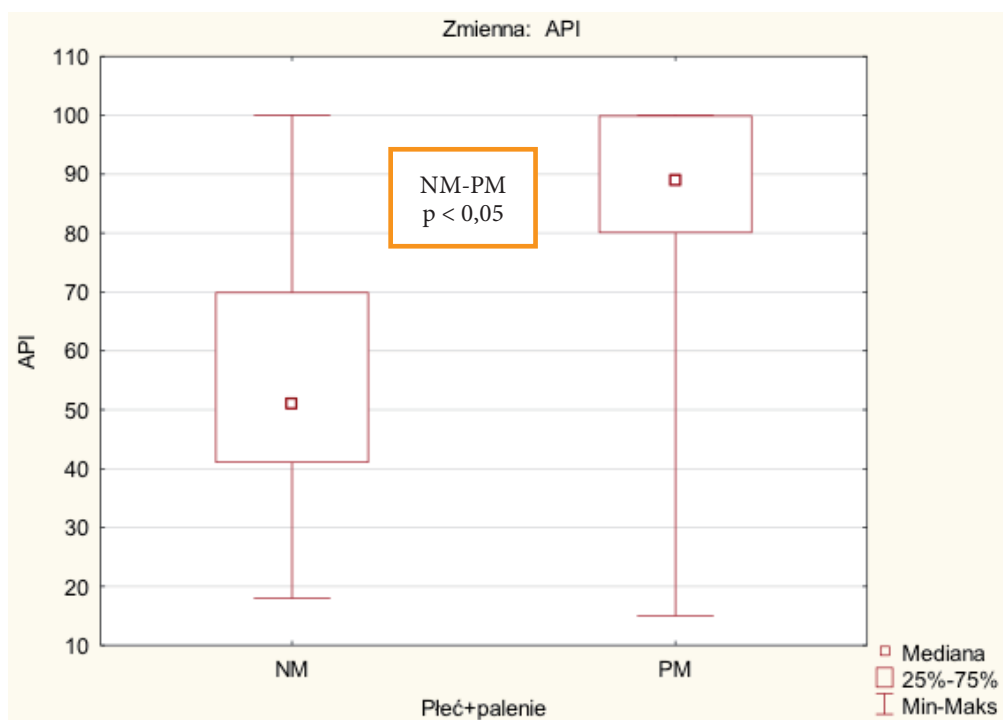


Rycina 32. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie dla wskaźnika API

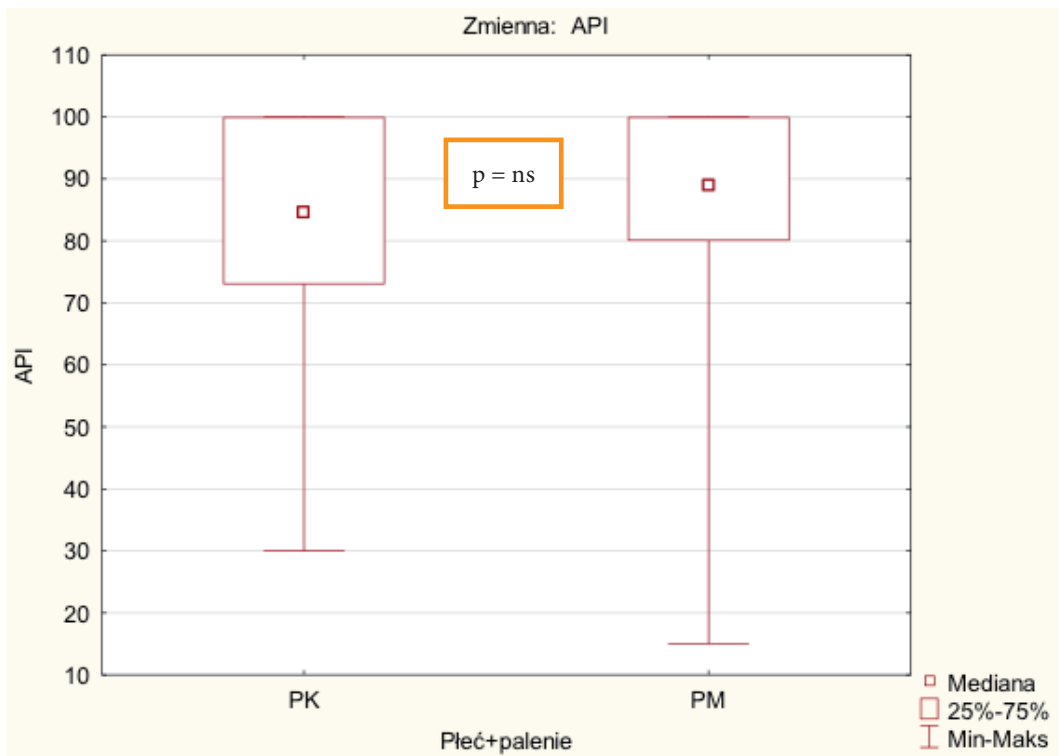
W porównaniu statystycznym grup palących kobiet i palących mężczyzn oraz niepalących kobiet i niepalących mężczyzn nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie wskaźnika PII (ryciny 33–36).



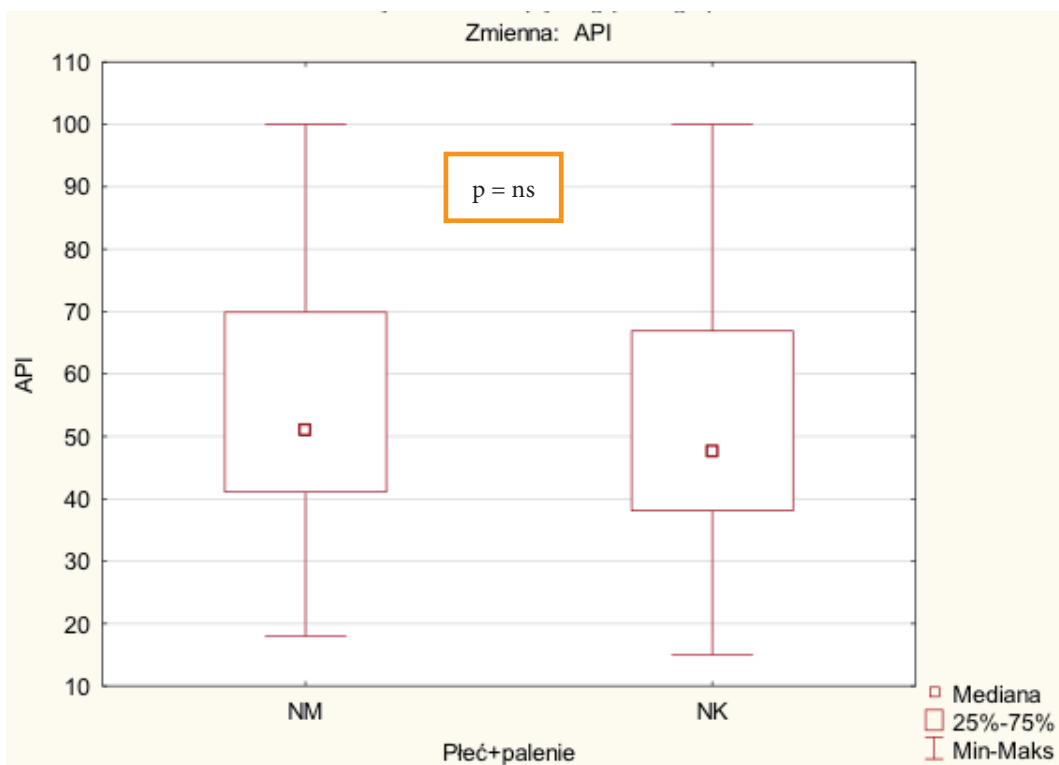
Rycina 33. Wykres ramkowy przedstawiający statystycznie istotną różnicę w wartości wskaźnika higieny API pomiędzy kobietami palącymi i niepalącymi



Rycina 34. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny API pomiędzy palącymi mężczyznami i kobietami



Rycina 35. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny API pomiędzy palącymi mężczyznami i kobietami



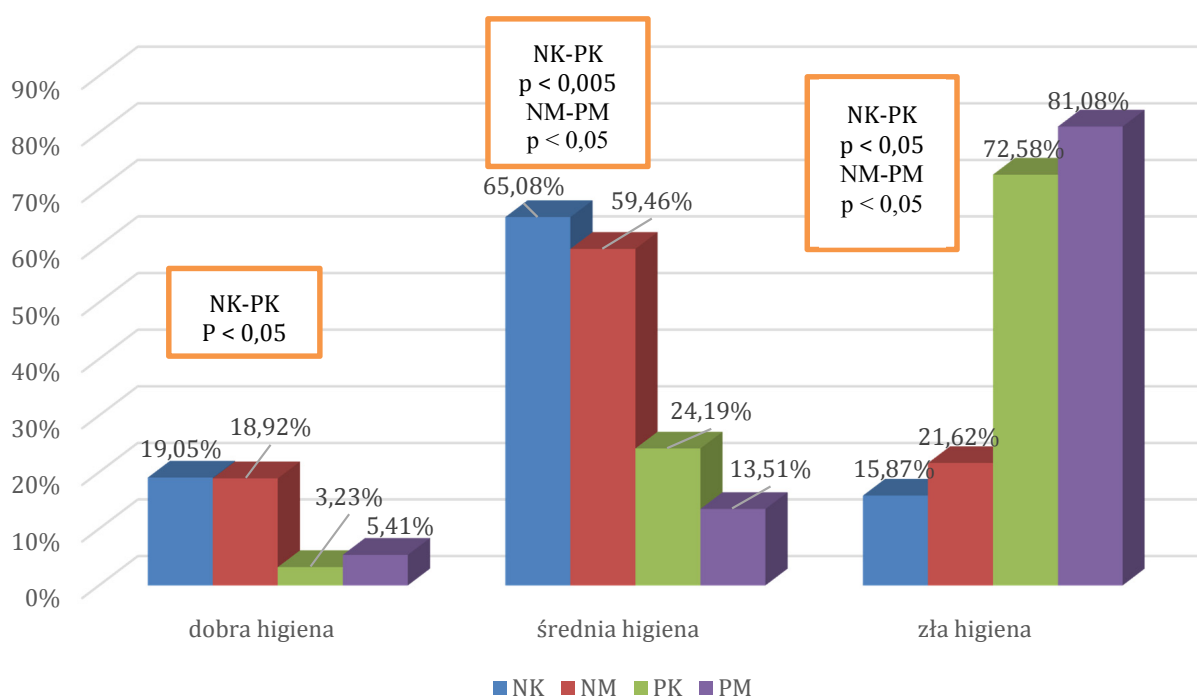
Rycina 36. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny API pomiędzy niepalącymi mężczyznami i kobietami

Odpowiednio, jak przy poprzednim wskaźniku oceny higieny jamy ustnej, pacjentów badanych, zakwalifikowano do trzech podgrup: z dobrą, średnią oraz złą higieną jamy ustnej. Do grupy pierwszej, z dobrą higieną jamy ustnej, zaliczono 19,05% kobiet niepalących, 18,92% mężczyzn niepalących, 3,23% kobiet palących oraz 5,41% mężczyzn palących. Do grupy drugiej, ze średnią higieną zaliczono: 65,08% kobiet niepalących, 59,46% mężczyzn niepalących, 24,19% kobiet palących oraz 13,51% mężczyzn palących. W trzeciej, ostatniej grupie ze złą higieną, umieszczono pozostałych pacjentów ze wszystkich 4 grup (tabela 30).

Analiza statystyczna przeprowadzona w podgrupach dotyczących higieny jamy ustnej (rycina 37) wykazała, iż w grupie z dobrą higieną jamy ustnej występuje statystycznie istotna różnica pomiędzy niepalącymi, a palącymi kobietami ($p < 0,05$). W drugiej gru-

Tabela 30. Klasyfikacja pacjentów w zależności od jakości higieny jamy ustnej

Grupa	Wskaźnik API		
	Dobra higiena	Średnia higiena	Zła higiena
NK (n = 63)	12	41	10
NM (n = 37)	7	22	8
PK (n = 62)	2	15	45
PM (n = 37)	2	5	30



Rycina 37. Graficzne przedstawienie klasyfikacji pacjentów do podgrup w zależności od jakości higieny

pie ze średnią higieną jamy ustnej, wyżej wymieniona różnica wystąpiła pomiędzy niepalącymi, a palącymi kobietami oraz niepalącymi ($p < 0,05$), a palącymi mężczyznami ($p < 0,05$). W grupie ze złą higieną jamy ustnej, również wystąpiła statystycznie istotna różnica u osób palących i niepalących u obu płci ($p < 0,05$).

4.4. Parametry stresu oksydacyjnego — część analityczno-biochemiczna

4.4.1. Białko

Średnie stężenia białka całkowitego w ślinie pacjentów wynosiło: kobiety niepalące 2,15 mg/mL, kobiety palące 1,50 mg/mL, mężczyźni niepalący 1,83 mg/mL oraz mężczyźni palący 1,66 mg/mL (tabela 31).

Zasadnicze dla przeprowadzonych badań było wykazanie wystąpienia istotnych różnic w stężeniu białka całkowitego u osób palących i niepalących. Na podstawie analizy statystycznej wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy niepalącymi kobietami, a palącymi kobietami ($p < 0,05$), natomiast w odniesieniu do mężczyzn palących i nie-

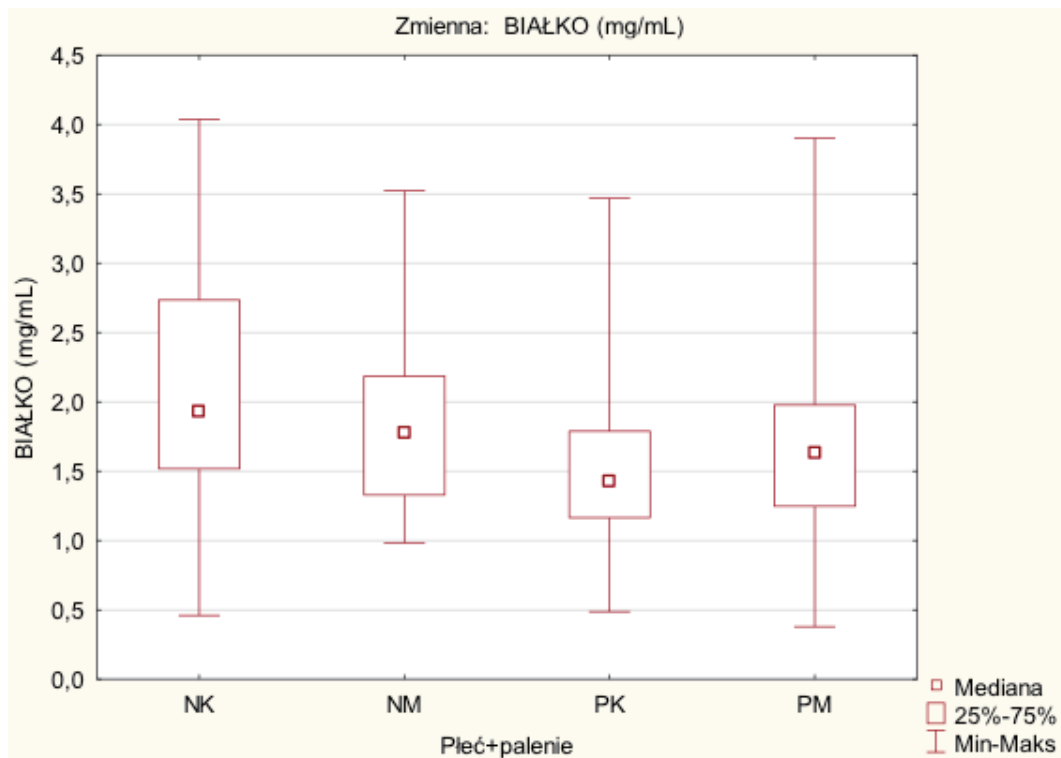
Tabela 31. Statystyka opisowa parametru stresu oksydacyjnego (białka) dla czterech badanych grup

Grupa	Białko mg/mL						
	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
NK (n = 62)	2,15	1,93	0,46	4,04	1,51	2,74	0,82
NM (n = 34)	1,84	1,77	0,98	3,52	1,32	2,19	0,60
PK (n = 53)	1,50	1,42	0,49	3,47	1,16	1,79	0,50
PM (n = 33)	1,66	1,63	0,38	3,90	1,24	1,98	0,70

Tabela 32. Analiza statystyczna porównania grup w odniesieniu do stężenia białka (test Manna-Whitneya)

Porównywane grupy	Poziom istotności
NK-NM	0,049991
NK-PK	0,000005
NK-PM	0,010587
NM-PK	0,009408
NM-PM	0,383358
PK-PM	0,185742

palących różnicy nie stwierdzono. Szczegółowe przedstawienie zaobserwowanych statystycznie istotnych różnic pomiędzy wszystkimi grupami przedstawiono tabeli oraz na rycinie (tabela 32, rycina 38).



Rycina 38. Wykres ramkowy przedstawiający średni rozkład stężenia białka w ślinie pacjentów

4.4.2. Peroksydacja lipidów-TBARS

W wyniku przeprowadzonych badań średnie stężenie peroksydacji lipidów w ślinie pacjentów wahało się w poszczególnych grupach pomiędzy 3,33 nM/mg, a 10,08 nM/mg (tabela 33).

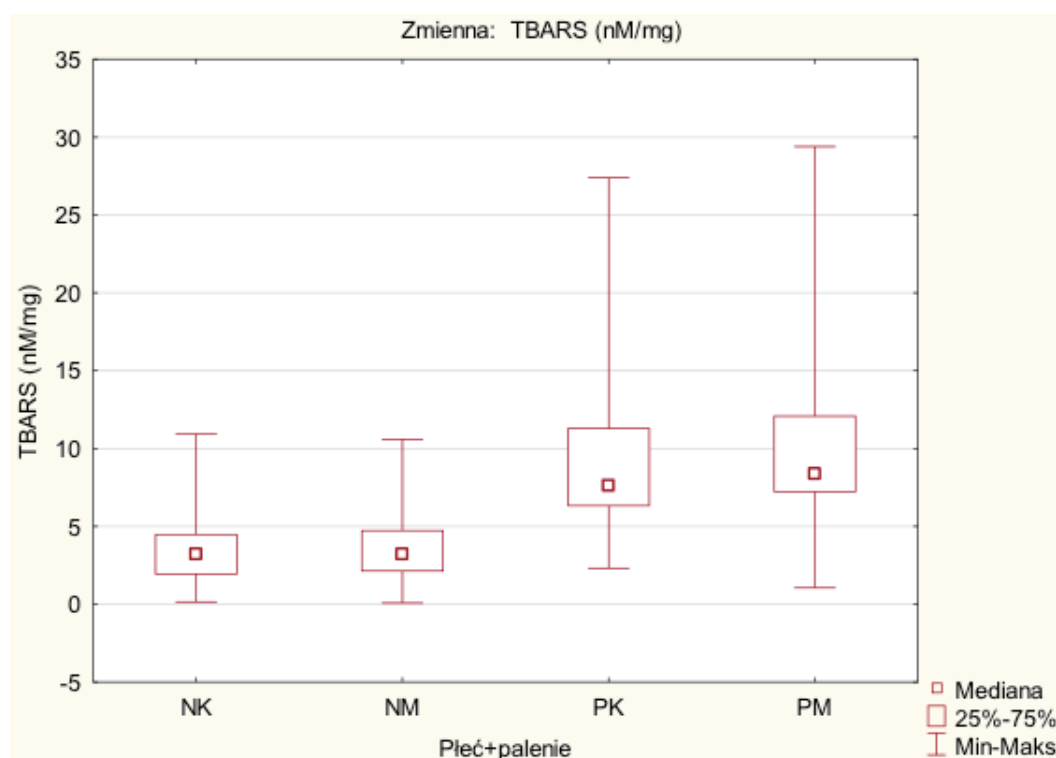
Tabela 33. Statystyka opisowa parametru stresu oksydacyjnego (TBARS) dla czterech badanych grup

Grupa	TBARS nM/mg						
	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył	SD
NK (n = 58)	3,40	3,22	0,15	10,94	1,91	4,51	2,15
NM (n = 33)	3,33	3,19	0,08	10,59	2,10	4,77	2,23
PK (n = 52)	9,59	7,57	2,32	27,39	6,29	11,33	5,79
PM (n = 33)	10,08	8,36	1,06	29,39	7,19	12,12	5,17

Na podstawie analizy statystycznej wykazano, iż wyłącznie pomiędzy niepalącymi i palącymi osobami z obu płci nie wystąpiła statystycznie istotna różnica w stężeniu białka w ślinie (tabela 34). Uzyskane wyniki były zbliżone w przypadku kobiet i mężczyzn palących oraz niepalących (rycina 39).

Tabela 34. Analiza statystyczna porównania grup w odniesieniu do TBARS (test Manna-Whitneya)

Porównywane grupy	Poziom istotności
NK-NM	0,924367
NK-PK	0,000000
NK-PM	0,000000
NM-PK	0,000000
NM-PM	0,000000
PK-PM	0,232144



Rycina 39. Wykres ramkowy przedstawiający średni rozkład peroksydacji lipidów w ślinie pacjentów

4.4.3. Zdolności antyoksydacyjna ekwiwalentów troloksu — TEAC

Średnie wartości uzyskane w przypadku oznaczania zdolności antyoksydacyjnej ekwiwalentów troloksu wynosiła u kobiety niepalących 168,87 nM/mg, u mężczyzn niepalących 187,12 nM/mg, natomiast u kobiet palących 233,21 nM/mg oraz mężczyzn palących 194,00 nM/mg (tabela 35).

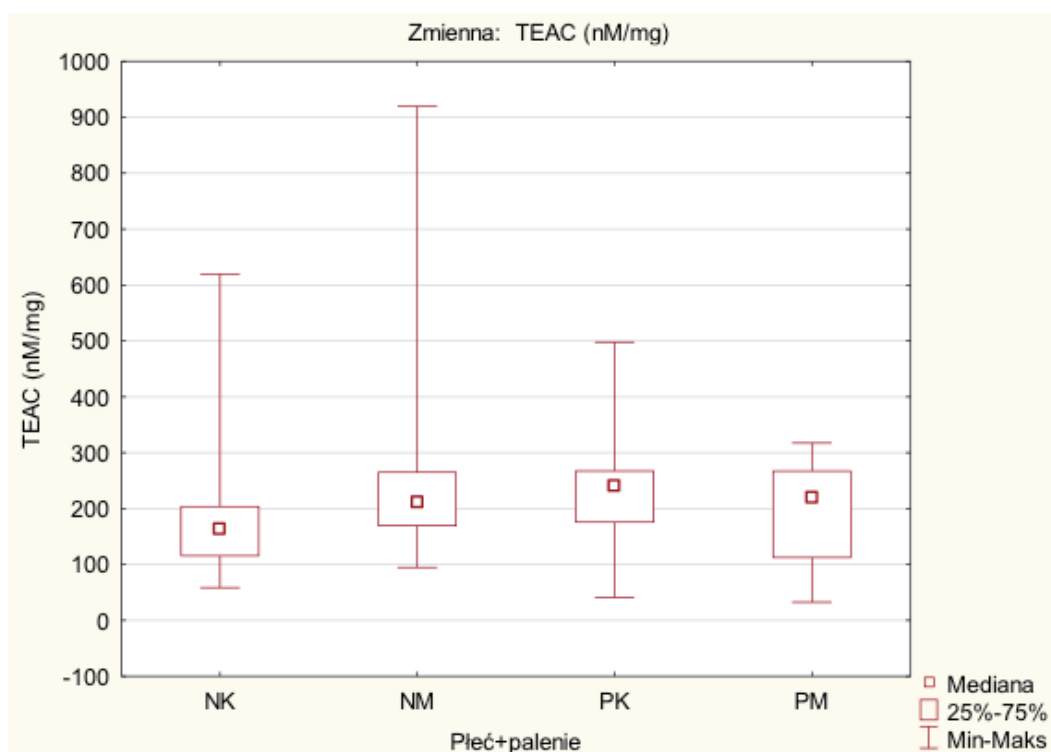
Tabela 35. Statystyka opisowa parametru stresu oksydacyjnego (TEAC) dla czterech badanych grup

Grupa	TEAC nM/mg						
	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
NK (n = 62)	168,87	164,19	58,59	619,42	114,59	204,70	85,25
NM (n = 34)	235,20	211,62	94,80	919,67	168,31	266,07	137,81
PK (n = 53)	223,21	239,72	40,45	497,72	174,66	268,23	83,45
PM (n = 33)	194,00	219,18	32,64	317,40	111,42	268,16	91,04

Uzyskane wyniki były zbliżone we wszystkich czterech badanych grupach, dlatego statystycznie istotne różnice uzyskano pomiędzy niepalącymi kobietami, a palącymi kobietami oraz pomiędzy niepalącymi osobami obu płci (tabela 36, rycina 40).

Tabela 36. Analiza statystyczna porównania grup w odniesieniu do TEAC (test Manna-Whitneya)

Porównywane grupy	Poziom istotności
NK-NM	0,000444
NK-PK	000025
NK-PM	0,054995
NM-PK	0,685832
NM-PM	0,494281
PK-PM	0,307116



Rycina 40. Wykres ramkowy przedstawiający średnią zdolność antyoksydacyjną troloksu w ślinie pacjentów

4.4.4. Produkty utleniania białek — AOPP

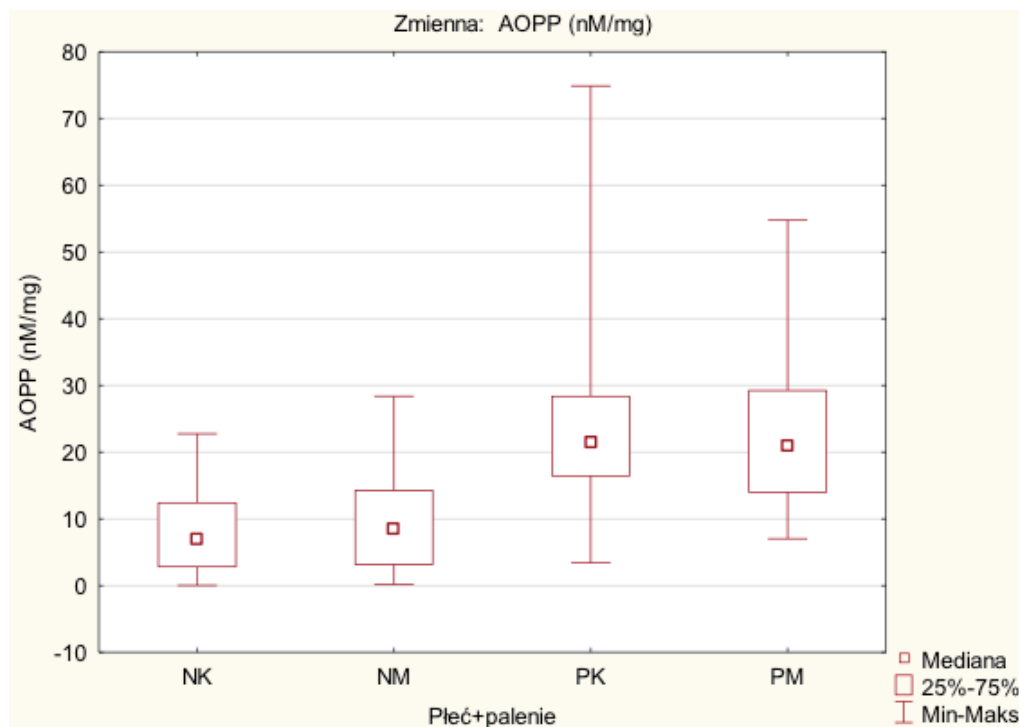
Średnie stężenie produktów utleniania białek w ślinie pacjentów badanych wyniosła u kobiet niepalących 7,98 nM/mg, u mężczyzn niepalących 10,24 nM/mg natomiast u palaczy kobiet 22,72 nM/mg oraz mężczyzn 23,04 nM/mg (tabela 37).

Tabela 37. Statystyka opisowa parametru stresu oksydacyjnego (AOPP) dla czterech badanych grup

Grupa	AOPP nM/mg						
	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
NK (n = 59)	7,98	7,00	0,032	22,75	2,75	12,49	5,94
NM (n = 33)	10,24	8,48	0,15	28,38	3,07	14,34	7,87
PK (n = 53)	22,72	21,50	3,39	74,88	16,36	28,45	11,85
PM (n = 33)	23,04	20,86	7,03	54,77	13,93	29,32	12,65

Tabela 38. Analiza statystyczna porównania grup w odniesieniu do AOPP (test Manna-Whitneya)

Porównywane grupy	Poziom istotności
NK-NM	0,264726
NK-PK	0,000000
NK-PM	0,000000
NM-PK	0,000000
NM-PM	0,000009
PK-PM	0,722415



Rycina 41. Wykres ramkowy przedstawiający średni rozkład produktów utleniania białek w ślinie pacjentów

Na podstawie analizy statystycznej w odniesieniu do stężenia produktów utleniania białek nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami niepalących kobiet i mężczyzn oraz palących kobiet i mężczyzn. Poziom istotności pomiędzy pozostałymi grupami został przedstawiony w tabeli (tabela 38, rycina 41).

4.5. Parametry stresu oksydacyjnego a higiena jamy ustnej

4.5.1. Porównanie poszczególnych parametrów stresu oksydacyjnego w zależności od higieny jamy ustnej w grupach kontrolnych i badanych

Podjęto próbę zbadania stanu równowagi redoks, w grupach ze szczególnym uwzględnieniem stanu higieny jamy ustnej. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego zostały oznaczone w ślinie pacjentów.

4.5.1.1. W zależności od wskaźnika P1I

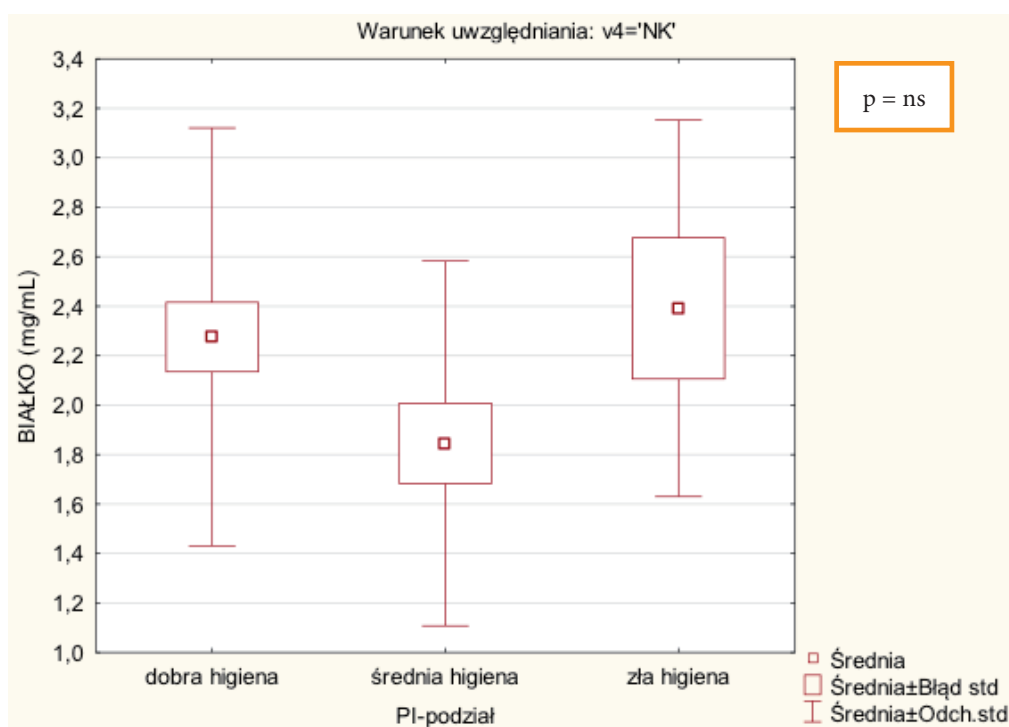
4.5.1.1.1. Grupa kobiet niepalących

Średnie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w tej grupie pacjentek przedstawiono w tabeli 39.

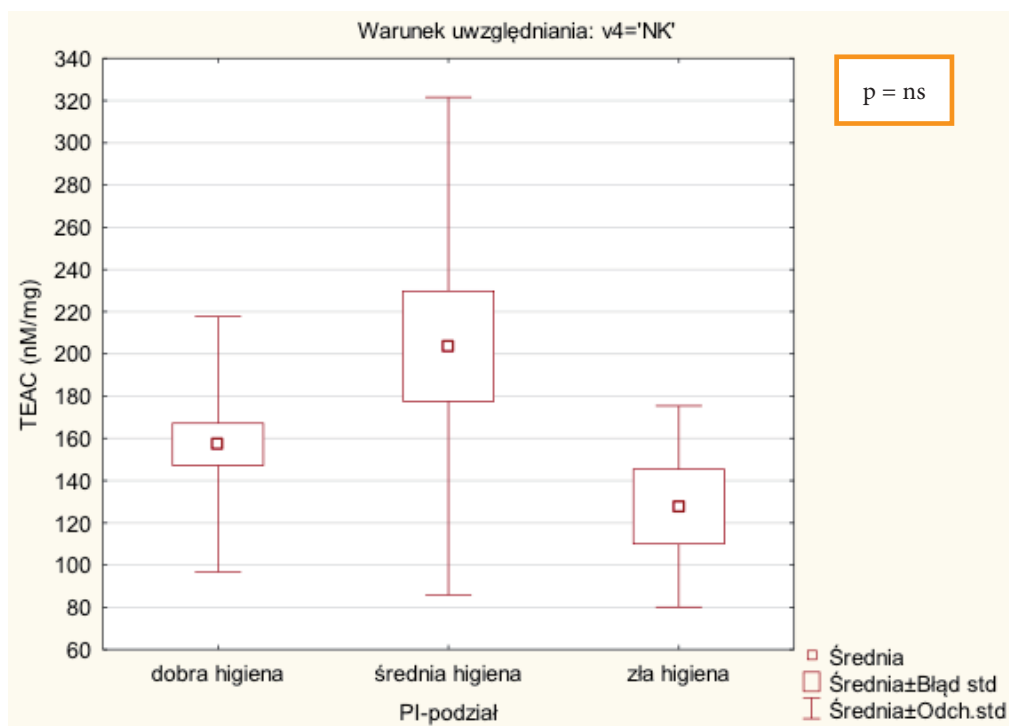
Tabela 39. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla kobiet niepalących (P1I)

Higiena	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
Dobra	35	2,28	2,21	1,03	4,04	1,50	2,99	0,84
Średnia	20	1,85	1,68	0,46	3,86	1,52	2,06	0,74
Zła	7	2,39	2,38	1,36	3,53	1,58	2,95	0,76
TEAC nM/mg								
Dobra	35	157,20	163,49	63,44	286,20	105,19	204,70	60,54
Średnia	20	203,70	174,79	58,60	619,42	140,60	218,30	117,93
Zła	7	127,75	116,27	81,15	222,11	85,18	148,22	47,65
AOPP nM/mg								
Dobra	33	8,34	6,89	0,03	22,75	3,71	13,25	6,07
Średnia	19	9,05	9,32	0,25	21,62	3,64	12,77	5,76
Zła	7	3,38	0,97	0,08	9,60	0,15	6,65	3,95
TBARS nM/mg								
Dobra	33	3,41	2,99	0,23	8,81	1,89	4,85	2,01
Średnia	18	3,80	3,40	0,38	10,94	2,63	4,51	2,53
Zła	7	2,28	2,33	0,15	4,23	0,64	3,39	1,50

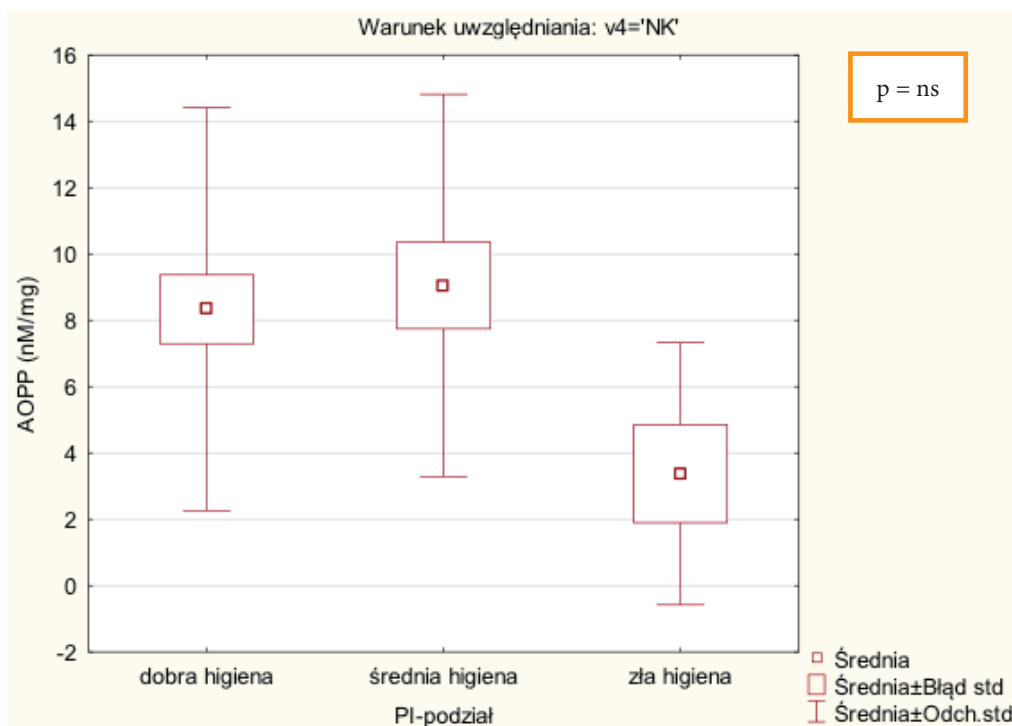
Na podstawie analizy statystycznej, w odniesieniu do niepalących kobiet, dla stężeń żadnego z badanych parametrów stresu oksydacyjnego w zależności od jakości higieny jamy ustnej nie wykazano statystycznie istotnych różnic (ryciny 42–45).



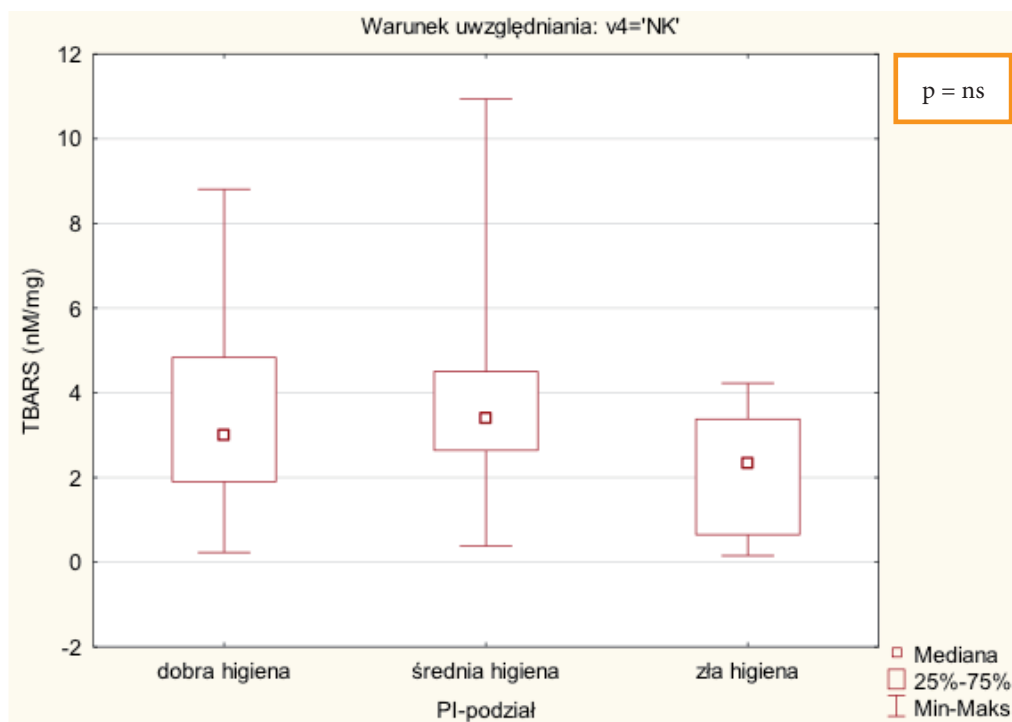
Rycina 42. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie kobiet niepalących w podgrupach



Rycina 43. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach



Rycina 44. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach



Rycina 45. Wykres ramkowy przedstawiający mediane stężenie TBARS nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach

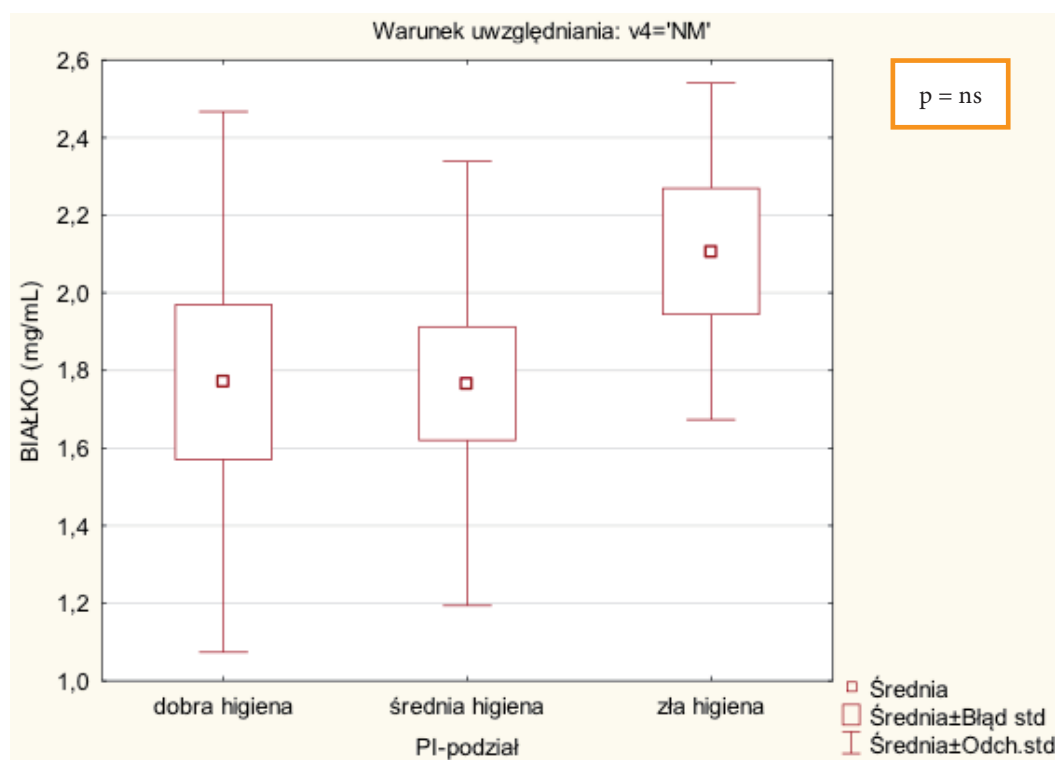
4.5.1.1.2. Grupa niepalących mężczyzn

Średnie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w grupie niepalących mężczyzn zaprezentowano w tabeli 40.

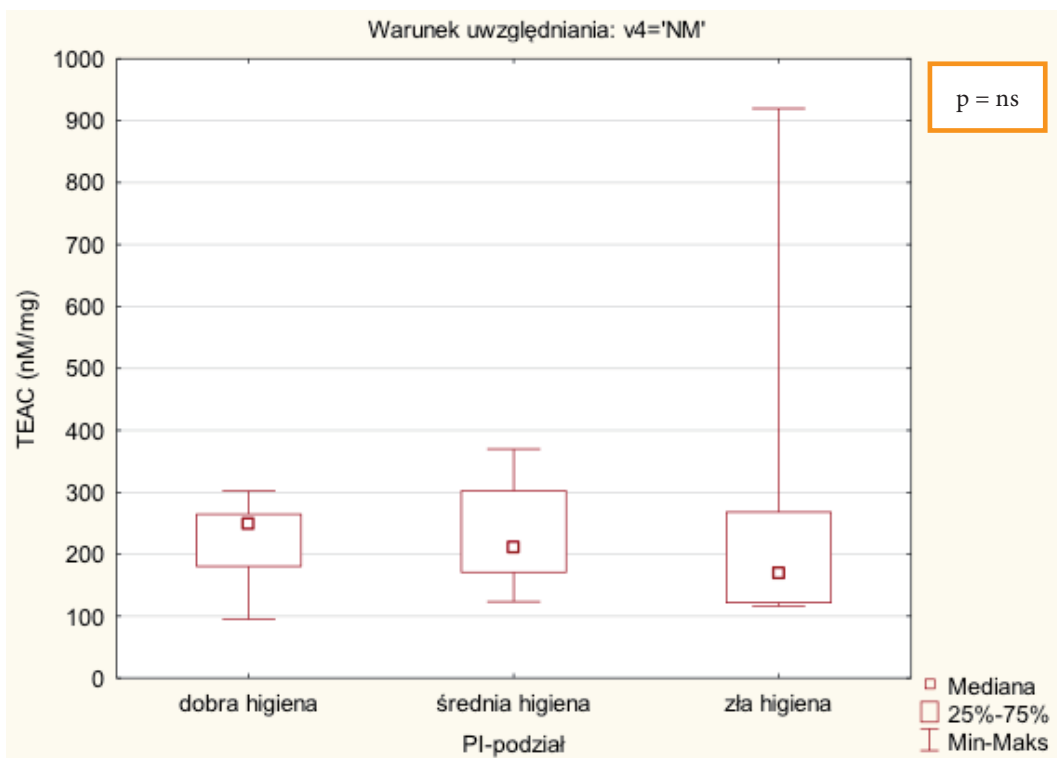
Tabela 40. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla niepalących mężczyzn (P1I)

Higiena	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
Dobra	12	1,77	1,49	1,23	3,52	1,31	2,05	0,70
Średnia	15	1,77	1,81	0,98	2,91	1,28	2,00	0,57
Zła	7	2,11	2,05	1,52	2,88	1,85	2,36	0,43
TEAC nM/mg								
Dobra	12	222,37	249,25	94,80	302,21	179,42	265,63	61,26
Średnia	15	226,02	211,60	123,31	369,66	169,94	303,36	71,79
Zła	7	276,88	168,31	115,83	919,67	120,87	269,07	288,07
AOPP nM/mg								
Dobra	12	12,60	13,22	0,15	28,38	4,60	18,37	9,55
Średnia	14	10,98	12,67	1,69	21,26	2,82	16,31	7,05
Zła	7	4,70	4,32	0,50	9,59	3,07	6,17	2,79
TBARS nM/mg								
Dobra	12	2,97	3,06	0,08	7,36	1,33	4,29	2,14
Średnia	15	4,01	3,68	1,17	10,59	2,18	5,34	2,45
Zła	6	2,33	2,27	0,20	4,11	1,41	3,72	1,45

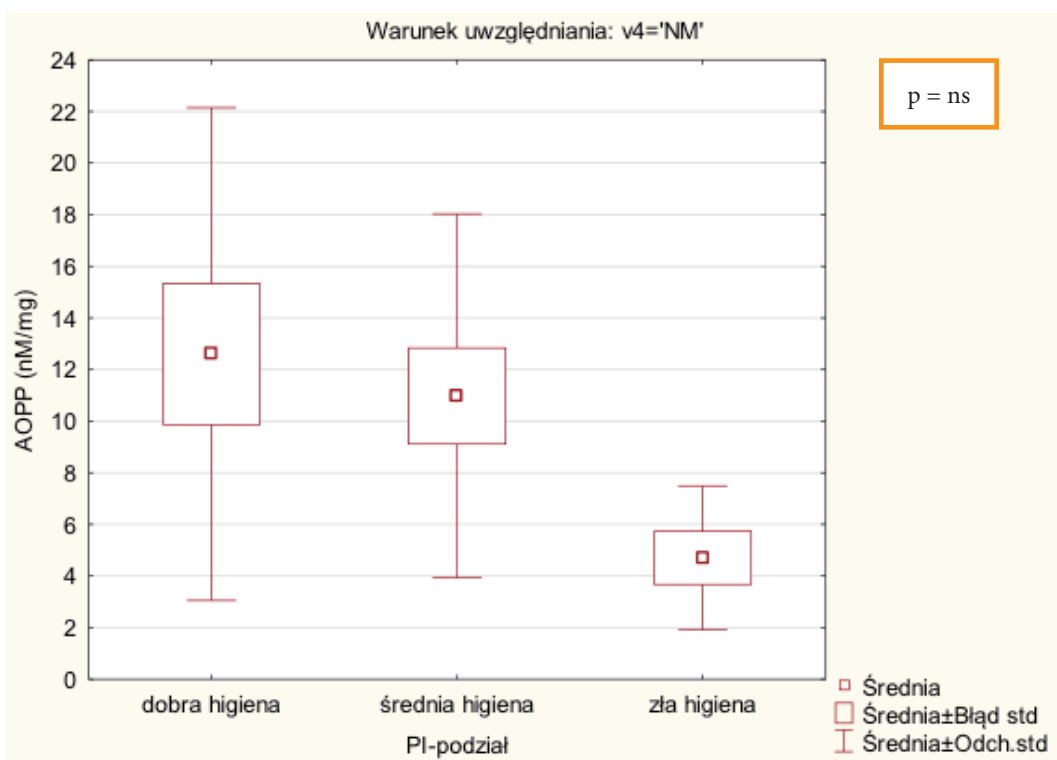
Podobnie jak w przypadku niepalących kobiet, w grupie niepalących mężczyzn nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w poziomie parametrów stresu oksydacyjnego, a jakości higieny niepalących mężczyzn (ryciny 46–49).



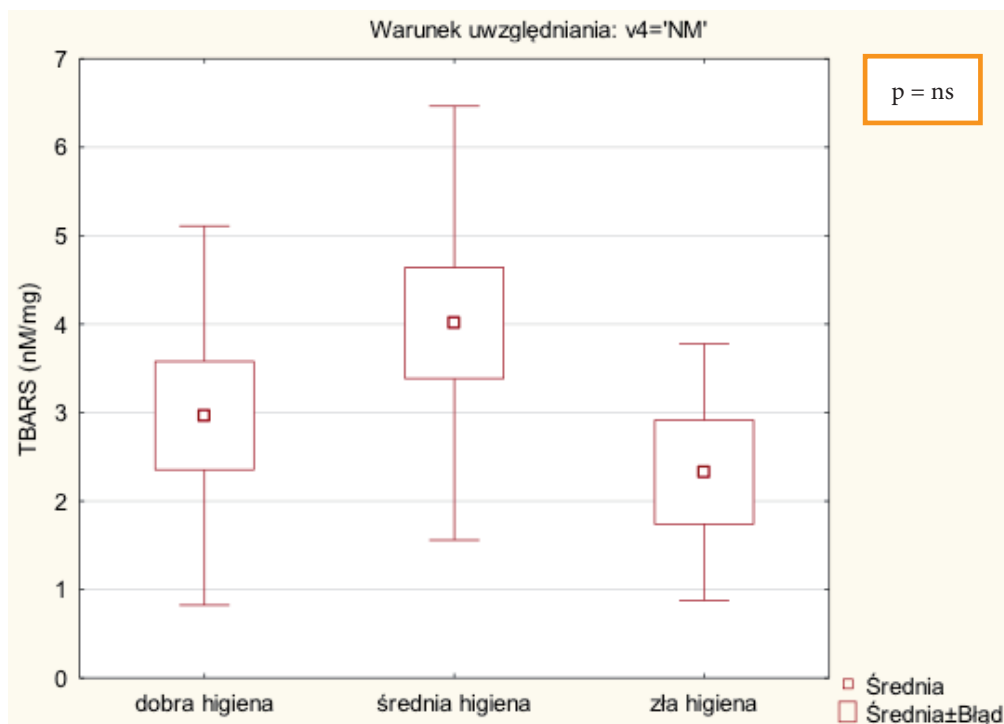
Rycina 46. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach



Rycina 47. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach



Rycina 48. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach



Rycina 49. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach

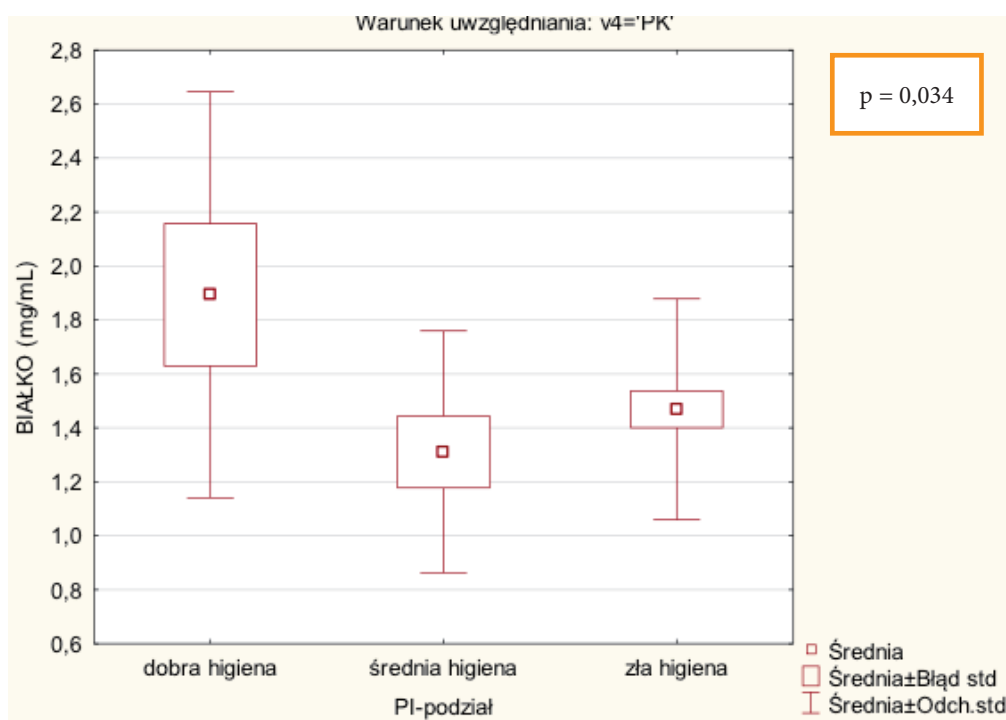
4.5.1.1.3. Grupa palących kobiet

Średnie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w grupie palących kobiet przedstawia tabela 41.

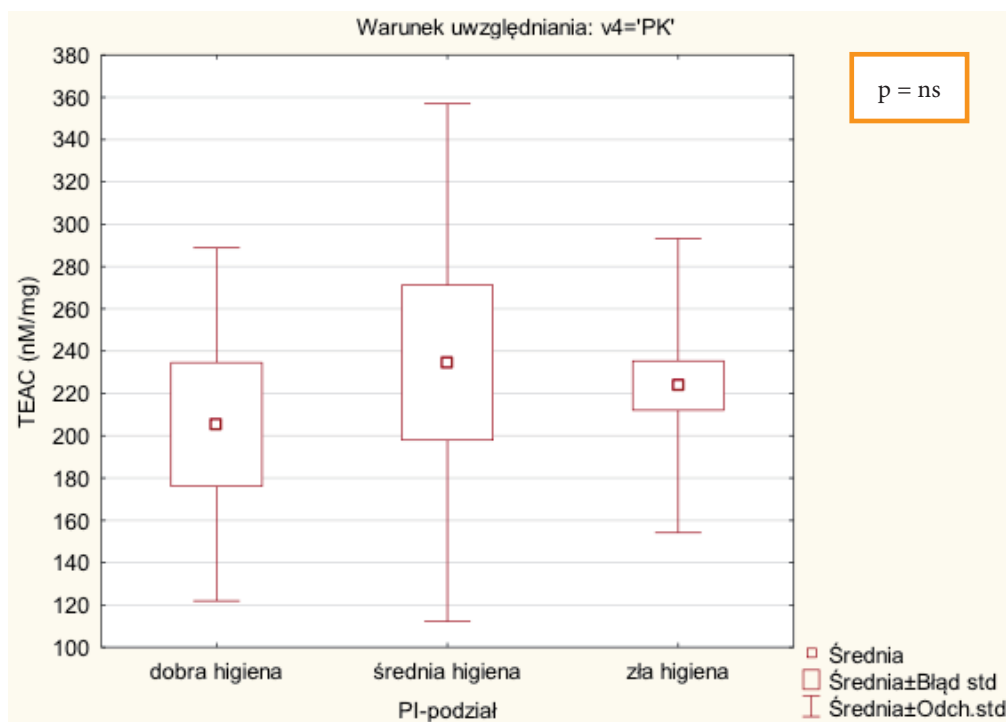
Tabela 41. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla kobiet palących (P11)

Higiena	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
Dobra	8	1,89	1,81	0,86	3,47	1,53	2,07	0,75
Średnia	11	1,31	1,41	0,49	2,09	1,09	1,58	0,45
Zła	34	1,47	1,41	0,86	2,62	1,14	1,78	0,41
TEAC nM/mg								
Dobra	8	205,37	211,43	107,35	313,84	124,02	275,41	83,46
Średnia	11	234,55	241,05	40,45	497,72	216,54	272,03	122,36
Zła	34	223,74	229,91	60,83	324,04	180,45	268,23	69,55
AOPP nM/mg								
Dobra	8	18,80	18,22	6,72	38,98	11,69	22,43	9,95
Średnia	11	26,06	21,50	13,91	74,88	18,78	25,45	16,77
Zła	34	22,56	21,83	3,39	41,52	16,36	28,89	10,38
TBARS nM/mg								
Dobra	7	8,23	7,43	6,06	14,01	6,30	9,45	2,78
Średnia	11	11,43	11,89	5,62	26,25	6,59	12,78	6,00
Zła	34	9,28	7,43	2,32	27,39	6,13	9,83	6,15

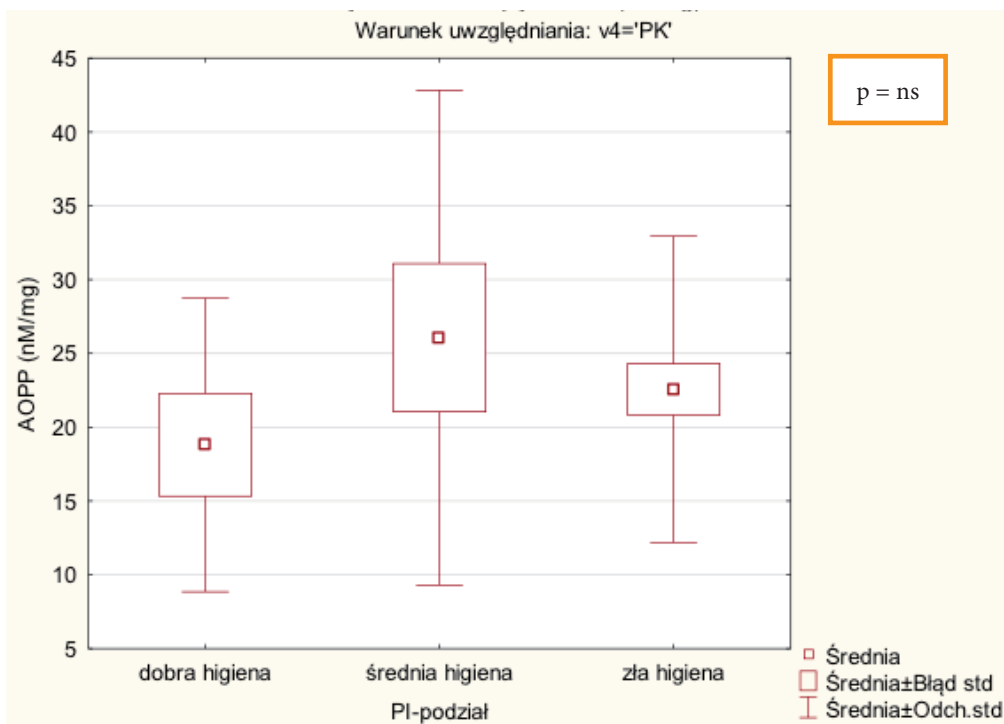
Po wykonaniu analizy statystycznej wykazano, iż wystąpiła w tej grupie statystycznie istotna różnica w poziomie stężenia białka całkowitego w ślinie, a higieną jamy ustnej. W przypadku analizy pozostałych parametrów różnicy nie stwierdzono (ryciny 50–53).



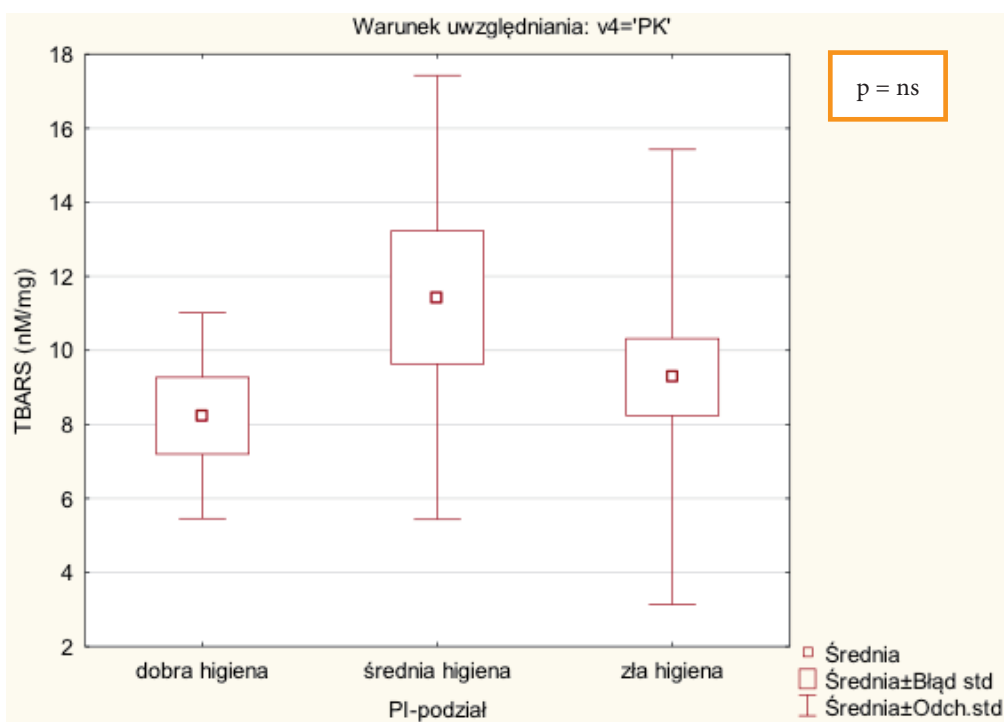
Rycina 50. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie kobiet palących w podgrupach



Rycina 51. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach



Rycina 52. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach



Rycina 53. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach

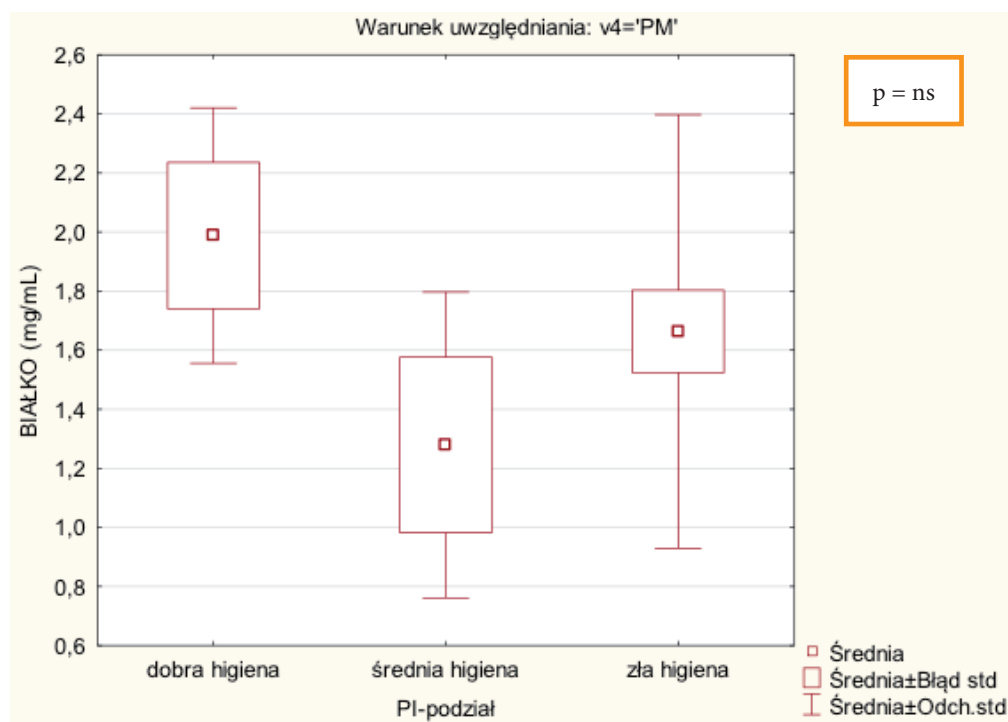
4.5.1.1.4. Grupa palących mężczyzn

Średnie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w tej grupie pacjentów przedstawiono w tabeli 42.

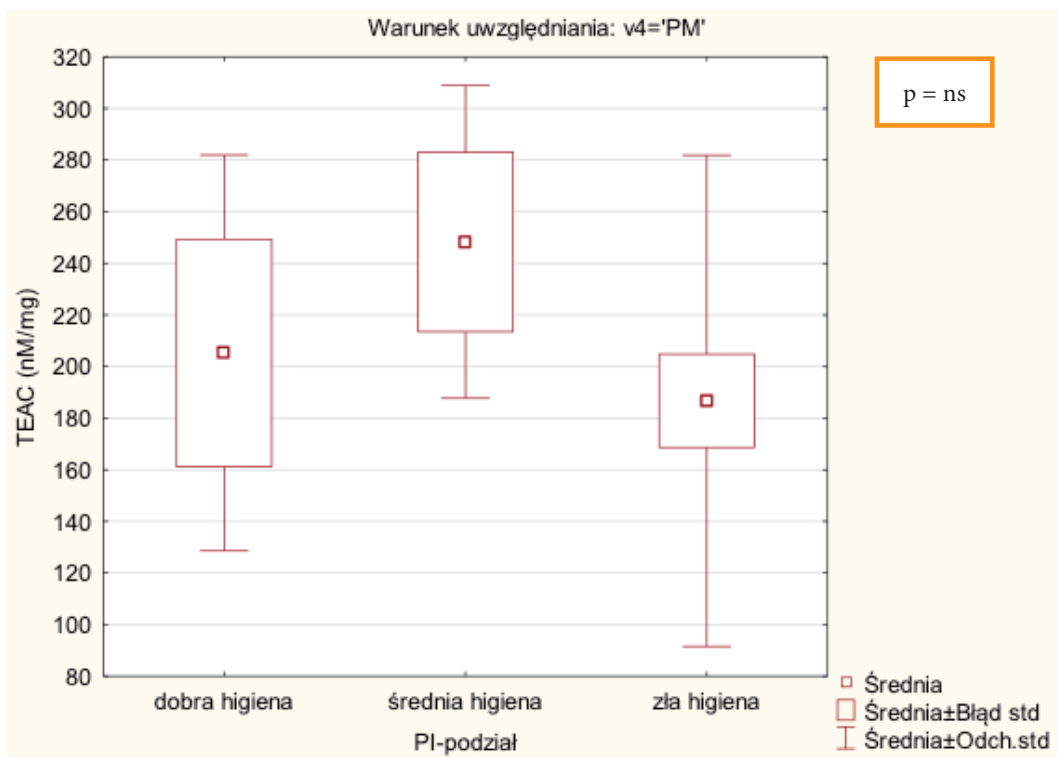
Tabela 42. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla mężczyzn palących (P11)

Higiena	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
Dobra	3	1,99	1,98	1,56	2,42	1,56	2,42	0,43
Średnia	3	1,28	1,52	0,68	1,63	0,68	1,63	0,52
Zła	27	1,66	1,64	0,38	3,90	1,23	2,12	0,73
TEAC nM/mg								
Dobra	8	205,37	211,43	107,35	313,84	124,02	275,42	83,46
Średnia	11	234,55	241,05	40,45	497,72	216,54	272,03	122,36
Zła	34	223,74	229,91	60,83	324,04	180,45	268,23	69,55
AOPP nM/mg								
Dobra	3	15,06	16,93	7,03	21,21	7,03	21,21	7,27
Średnia	3	21,14	15,04	13,53	34,84	13,53	34,84	11,89
Zła	27	24,14	21,05	9,35	54,77	13,93	29,37	13,15
TBARS nM/mg								
Dobra	3	5,08	6,98	1,06	7,19	1,06	7,19	3,48
Średnia	3	11,01	11,38	7,61	14,04	7,61	14,04	3,23
Zła	27	10,54	8,78	3,64	29,39	7,40	14,23	5,29

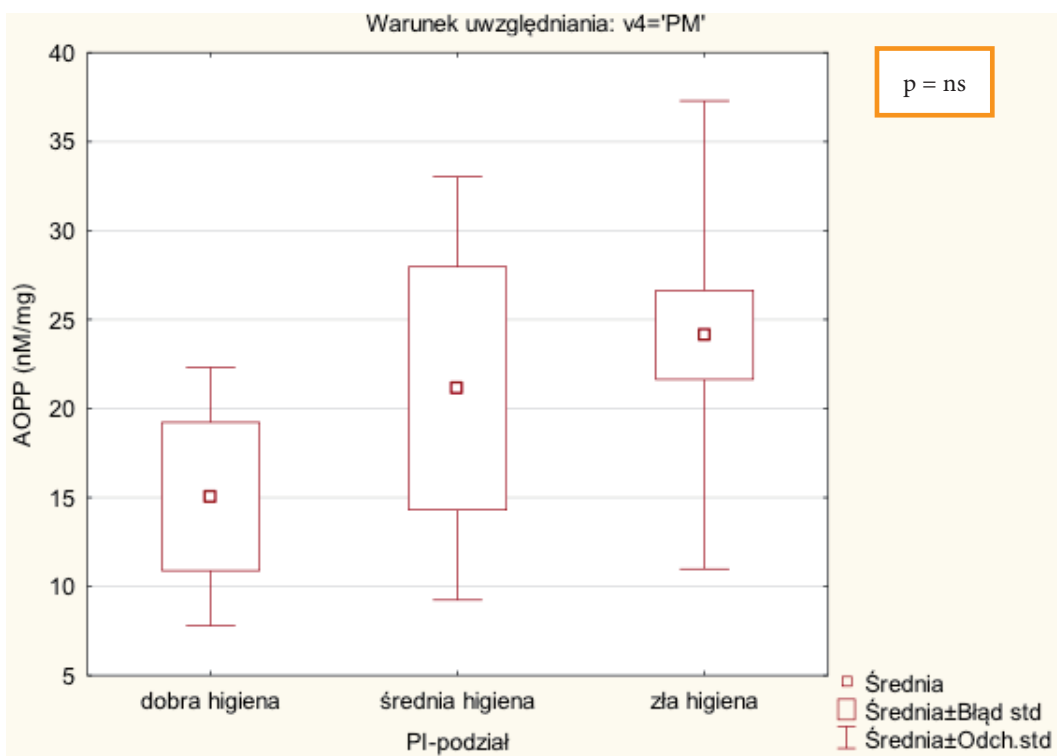
W odniesieniu do higieny jamy ustnej nie stwierdzono w grupie palących mężczyzn statystycznie istotnych różnic w aktywności parametrów stresu oksydacyjnego (ryciny 54–57).



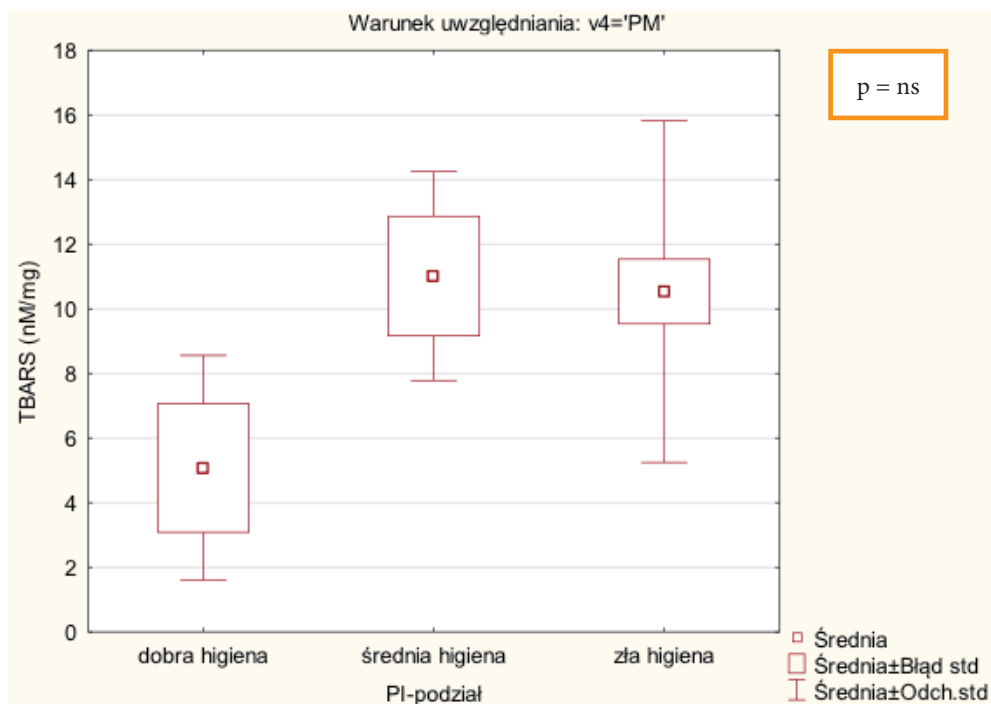
Rycina 54. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mLw ślinie mężczyzn palących w podgrupach



Rycina 55. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach



Rycina 56. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach



Rycina 57. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach

4.5.1.2. W zależności od wskaźnika API

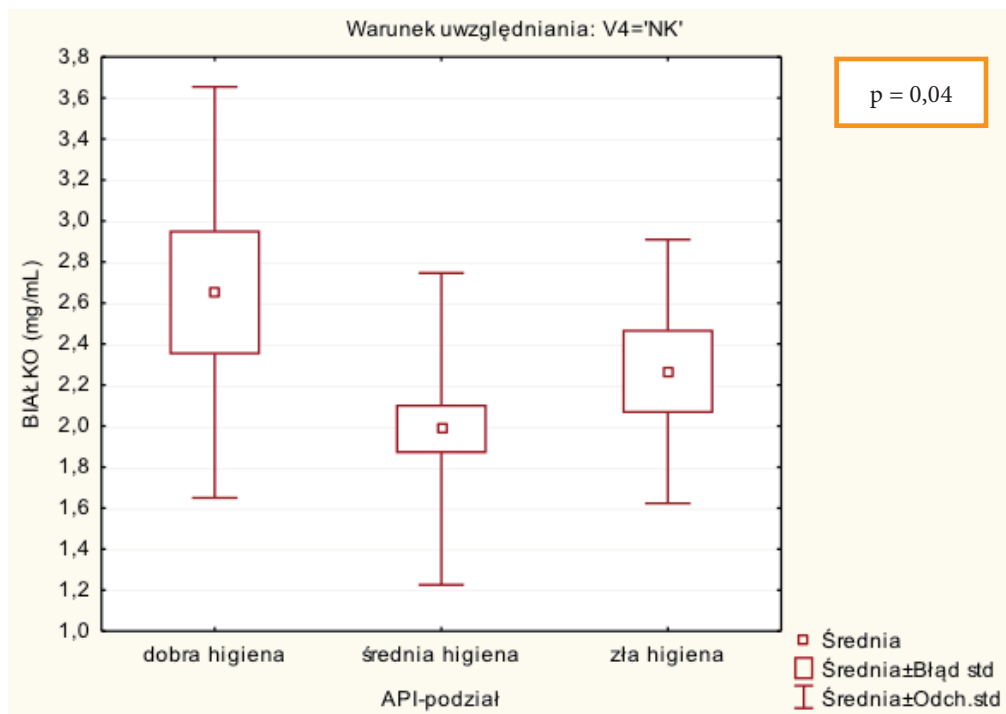
4.5.1.2.1. Grupa kobiet niepalących

Średnie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w tej grupie pacjentek przedstawiono w tabeli 43.

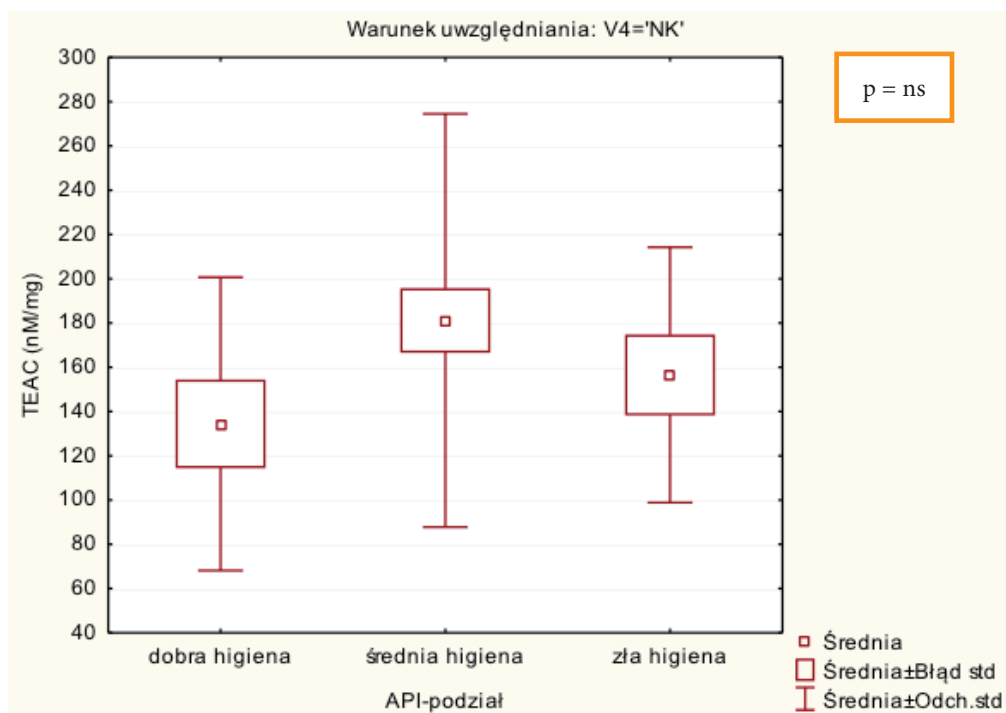
Tabela 43. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla kobiet niepalących (API)

Higiena	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
Dobra	11	2,65	2,73	1,15	4,04	1,79	3,65	1,00
Średnia	41	1,99	1,83	0,46	3,86	1,46	2,55	0,76
Zła	10	2,27	2,19	1,58	3,53	1,76	2,71	0,64
TEAC nM/mg								
Dobra	11	134,39	115,02	63,44	261,97	82,05	197,54	66,27
Średnia	41	181,14	168,79	58,59	619,42	127,17	204,70	93,37
Zła	10	156,52	157,96	81,15	246,34	114,12	210,44	57,69
AOPP nM/mg								
Dobra	10	10,21	8,24	2,66	19,60	6,73	13,67	5,37
Średnia	40	7,81	7,66	0,03	21,62	3,22	12,02	5,47
Zła	9	6,26	2,53	0,08	22,75	0,18	6,65	8,24
TBARS nM/mg								
Dobra	10	3,39	3,81	0,87	5,22	1,89	4,75	1,59
Średnia	39	3,72	3,35	0,51	10,94	2,26	4,82	2,25
Zła	9	2,00	1,91	0,15	4,85	0,38	3,32	1,80

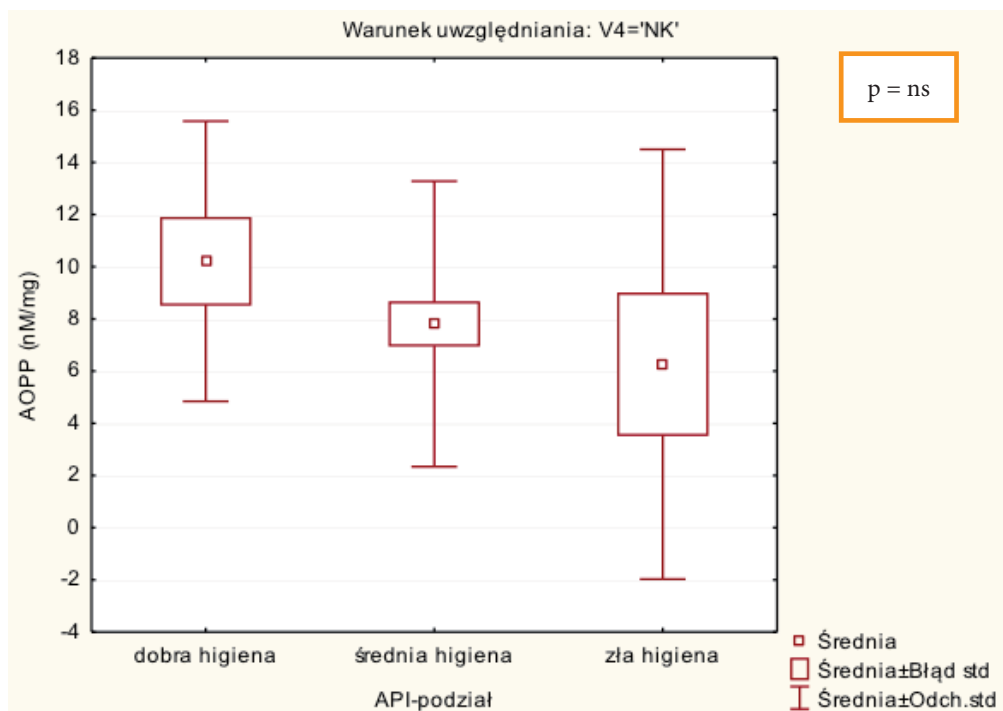
Po przeprowadzeniu analizy statystycznej wykazano, iż w tej grupie wystąpiła statystycznie istotna różnica w poziomie stężenia białka całkowitego w ślinie, a higieną jamy ustnej. W przypadku analizy pozostałych parametrów różnicy nie stwierdzono (ryciny 58–61).



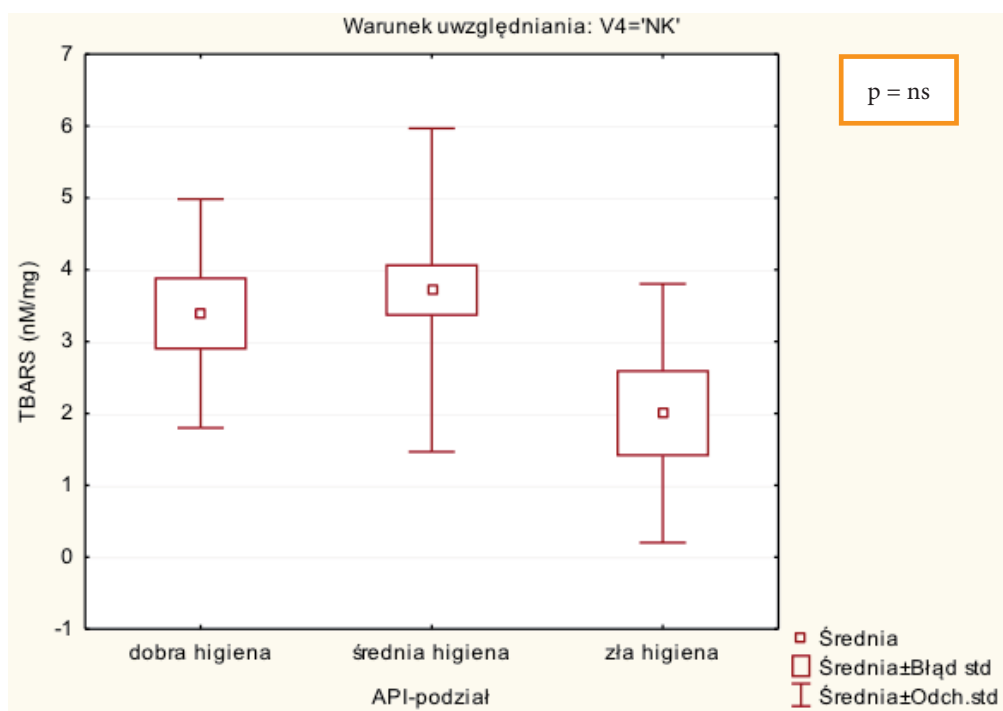
Rycina 58. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie kobiet niepalących w podgrupach



Rycina 59. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg kobiet w ślinie niepalących w podgrupach



Rycina 60. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach



Rycina 61. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach

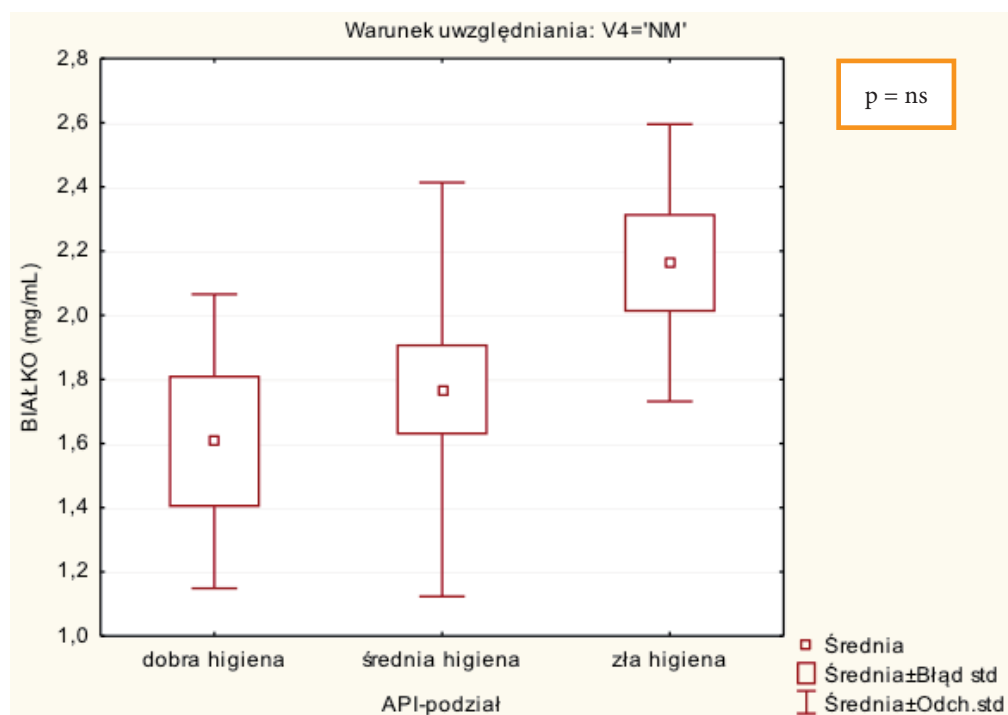
4.5.1.2.2. Grupa niepalących mężczyzn

Średnie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w grupie niepalących mężczyzn zaprezentowano w tabeli 44.

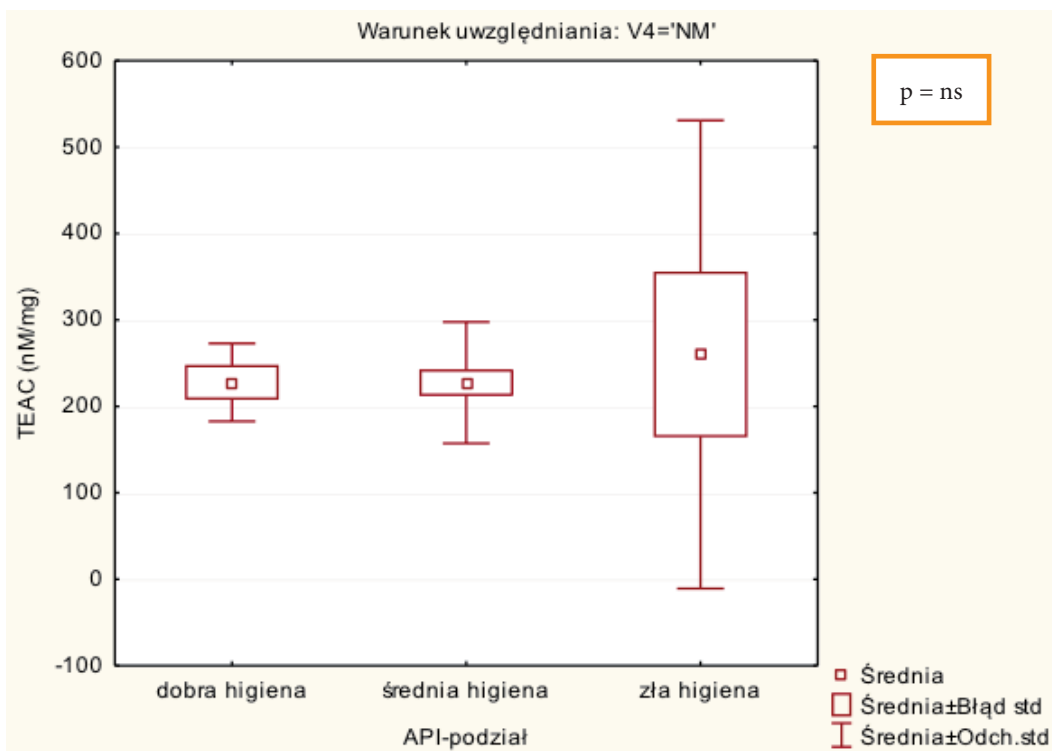
W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy stężeniem produktów utleniania białek (AOPP) w stosunku do higieny jamy ustnej. W przypadku pozostałych parametrów stanu pro- i antyoksydacyjnego różnicy nie wykazano (ryciny 62–65).

Tabela 44. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla mężczyzn niepalących (API)

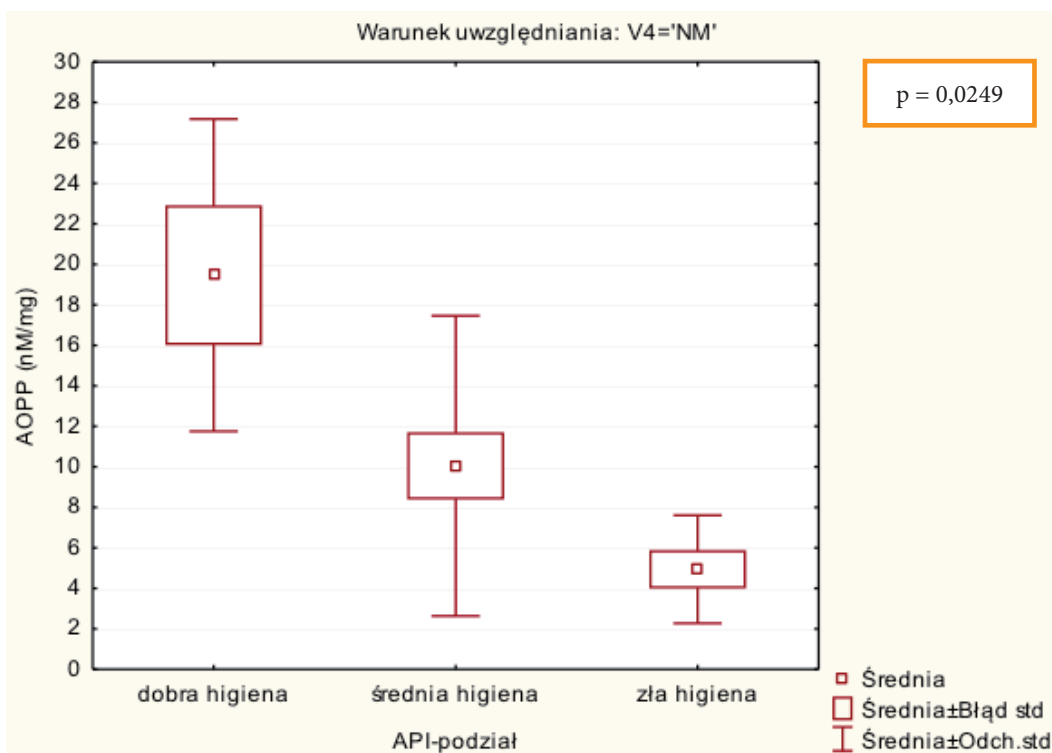
Higiena	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
Dobra	5	1,61	1,41	1,26	2,35	1,28	1,74	0,46
Średnia	21	1,77	1,58	0,98	3,52	1,30	1,86	0,65
Zła	8	2,16	2,12	1,52	2,88	1,87	2,46	0,43
TEAC nM/mg								
Dobra	5	227,80	248,90	171,39	266,07	187,45	265,20	45,05
Średnia	21	227,45	213,92	94,80	369,66	189,64	266,65	70,21
Zła	8	260,18	161,07	115,83	919,67	132,08	229,82	270,85
AOPP nM/mg								
Dobra	5	19,47	14,34	13,17	28,38	14,04	27,41	7,71
Średnia	20	10,05	10,09	0,15	22,39	2,70	15,89	7,42
Zła	8	4,94	4,69	0,50	9,59	3,64	6,38	2,67
TBARS nM/mg								
Dobra	5	3,42	2,93	2,18	4,89	2,24	4,84	1,35
Średnia	21	3,74	3,44	0,23	10,59	2,18	4,91	2,47
Zła	7	2,01	2,10	0,08	4,11	0,20	3,72	1,58



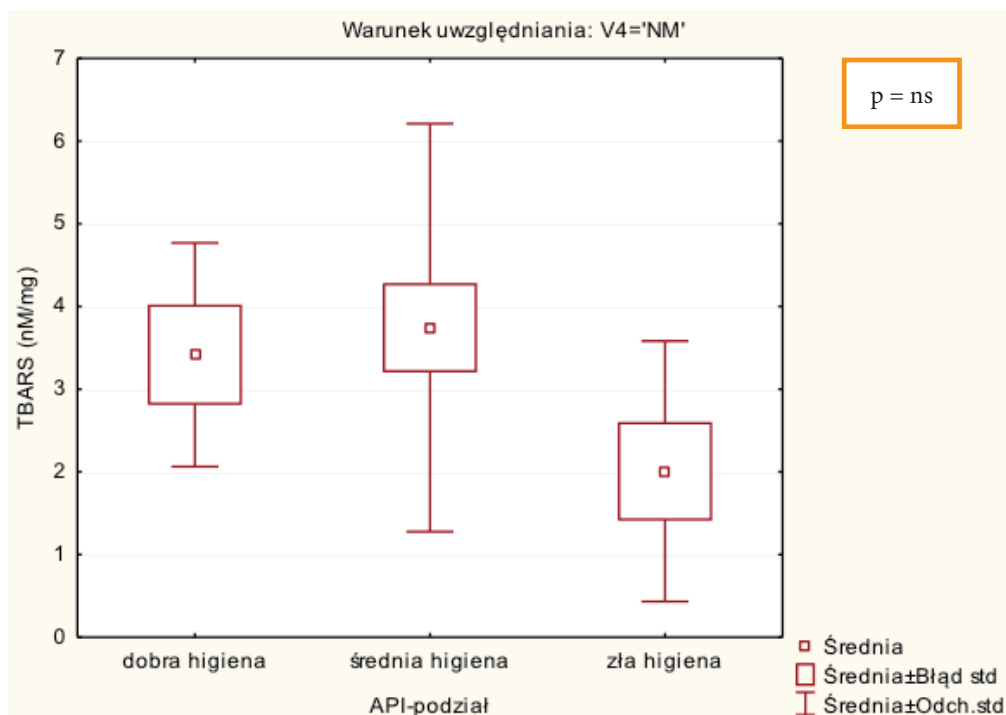
Rycina 62. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach



Rycina 63. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach



Rycina 64. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach



Rycina 65. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach

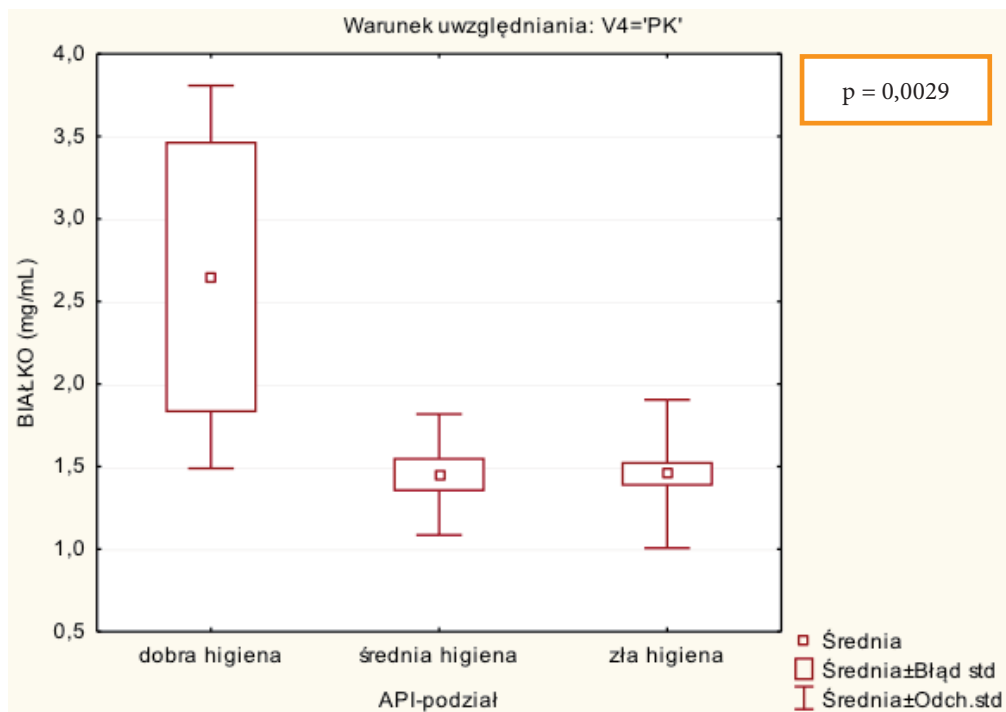
4.5.1.2.3. Grupa palących kobiet

Średnie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w grupie palących kobiet przedstawia tabela 45.

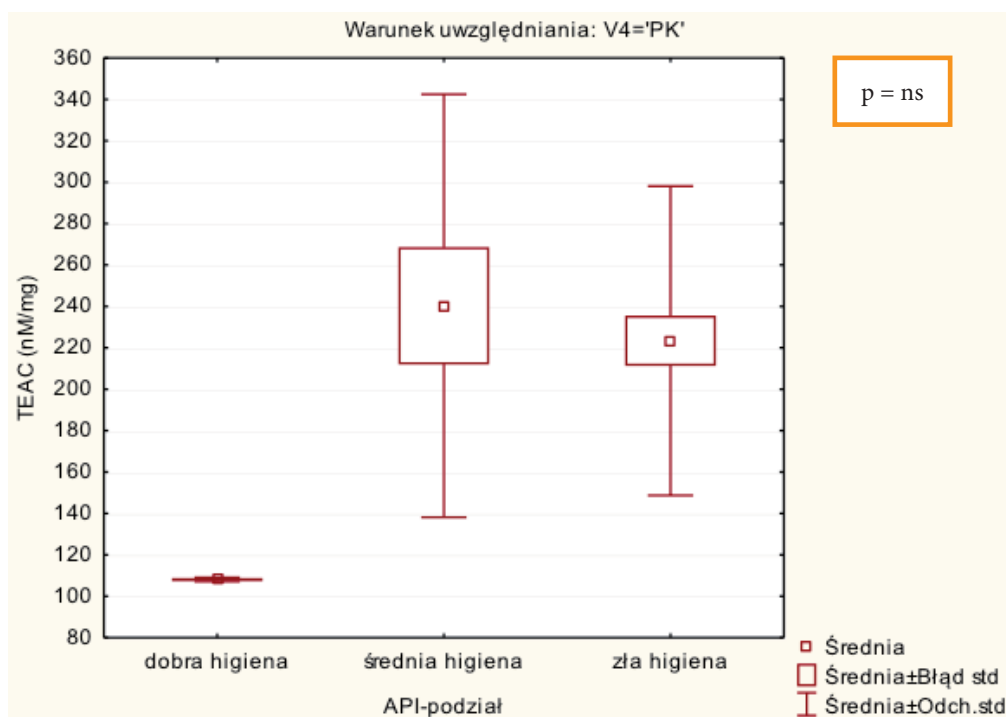
Tabela 45. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla kobiet palących (API)

Higiena	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
Dobra	2	2,65	2,65	1,83	3,47	1,83	3,47	1,16
Średnia	13	1,45	1,42	0,69	2,20	1,32	1,64	0,37
Zła	38	1,46	1,414	0,49	2,62	1,14	1,80	0,45
TEAC nM/mg								
Dobra	2	108,06	108,06	107,35	108,77	107,35	108,77	1,00
Średnia	13	240,34	243,96	43,23	497,72	216,54	258,92	102,17
Zła	38	223,41	236,25	40,45	324,04	180,45	277,07	74,70
AOPP nM/mg								
Dobra	2	11,69	11,69	11,37	12,02	11,37	12,02	0,47
Średnia	13	19,43	19,14	6,72	25,45	17,41	24,67	5,28
Zła	38	24,43	21,91	3,39	74,88	16,36	29,78	13,23
TBARS nM/mg								
Dobra	1	6,79	6,79	6,79	6,79	6,79	6,79	
Średnia	13	11,12	9,45	5,72	26,25	6,59	12,78	5,84
Zła	38	9,15	7,43	2,32	27,39	6,13	9,83	5,82

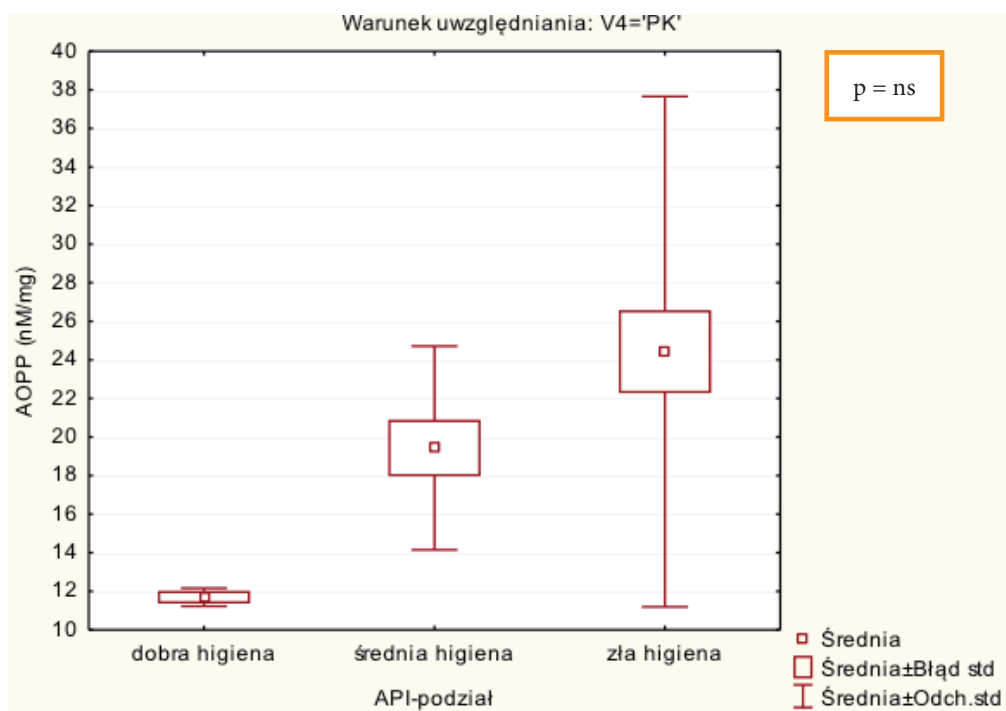
Średnie stężenie białka całkowitego kobiet palących statystycznie istotnie różni się względem jakości higieny jamy ustnej. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy pozostałymi parametrami stresu oksydacyjnego (ryciny 66–69).



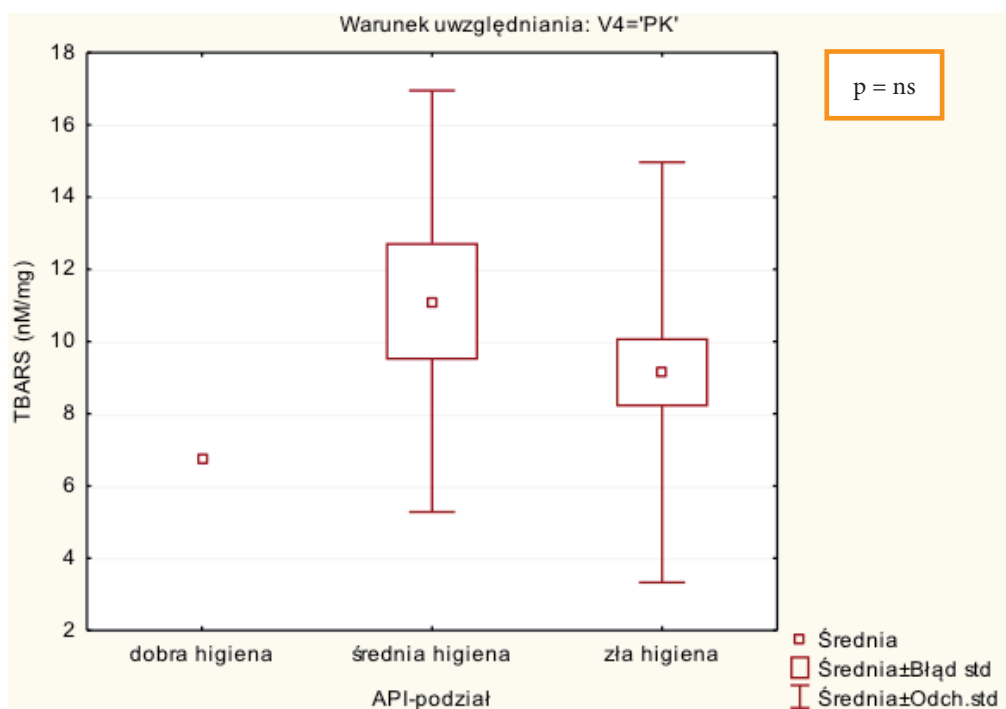
Rycina 66. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie kobiet palących w podgrupach



Rycina 67. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach



Rycina 68. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach



Rycina 69. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach

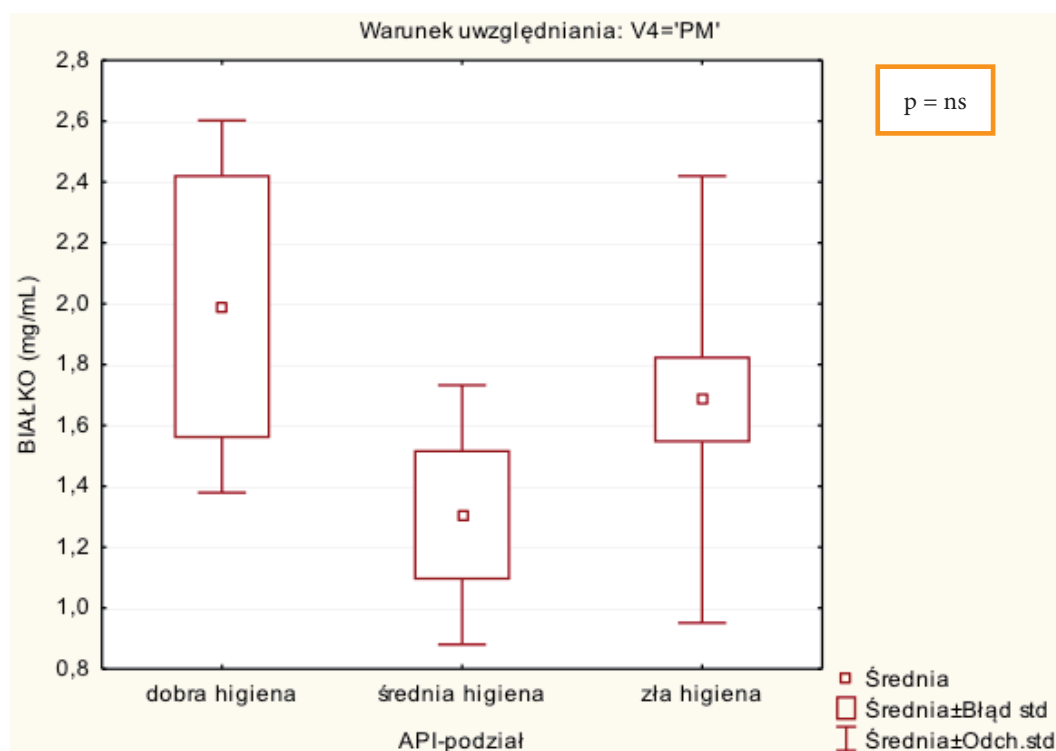
4.5.1.2.4. Grupa palących mężczyzn

Średnie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w tej grupie pacjentów przedstawiono w tabeli 46.

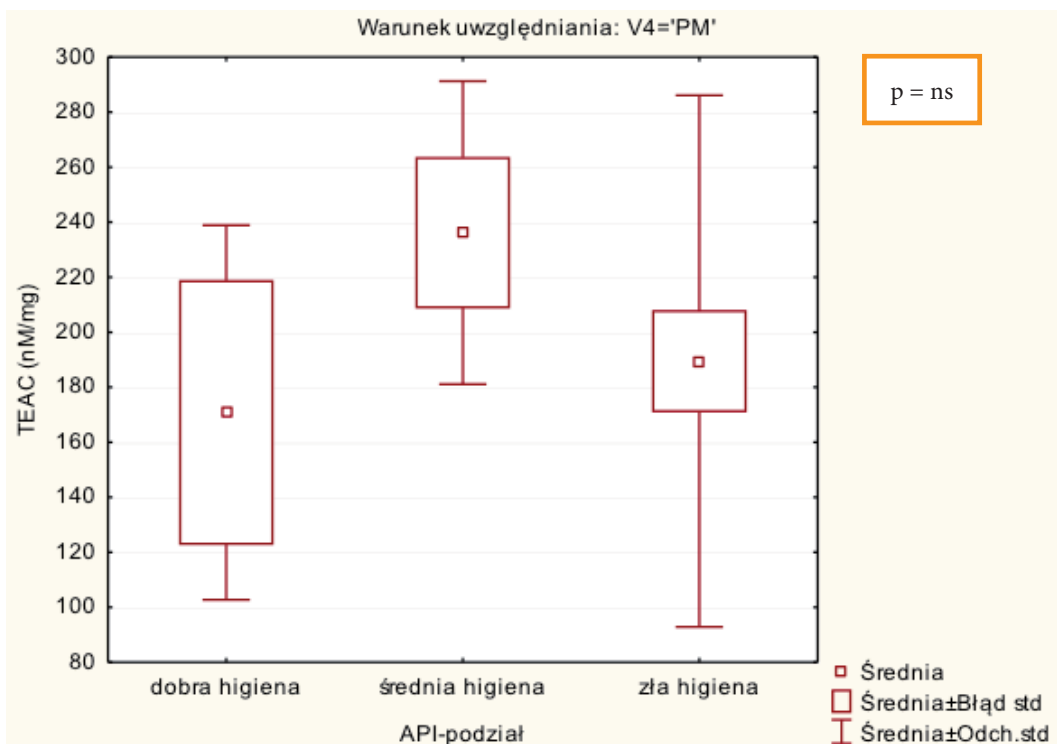
Tabela 46. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla mężczyzn palących (API)

Higiena	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
Dobra	2	1,99	1,99	1,56	2,42	1,56	2,42	0,61
Średnia	4	1,31	1,45	0,68	1,63	1,04	1,58	0,43
Zła	27	1,69	1,68	0,38	3,90	1,23	2,12	0,73
TEAC nM/mg								
Dobra	2	170,81	170,81	122,66	218,96	122,66	218,96	68,09
Średnia	4	236,18	217,47	195,38	314,40	197,62	274,75	55,09
Zła	27	189,47	230,63	32,64	317,40	92,47	273,26	96,62
AOPP nM/mg								
Dobra	2	14,12	14,12	7,03	21,21	7,03	21,21	10,02
Średnia	4	21,07	17,95	13,53	34,84	14,29	27,85	9,71
Zła	27	23,99	21,05	9,35	54,77	13,93	29,37	13,21
TBARS nM/mg								
Dobra	2	4,02	4,02	1,06	6,98	1,06	6,98	4,18
Średnia	4	10,26	9,68	7,61	14,04	7,80	12,71	3,04
Zła	27	10,51	8,78	3,64	29,39	7,19	14,23	5,31

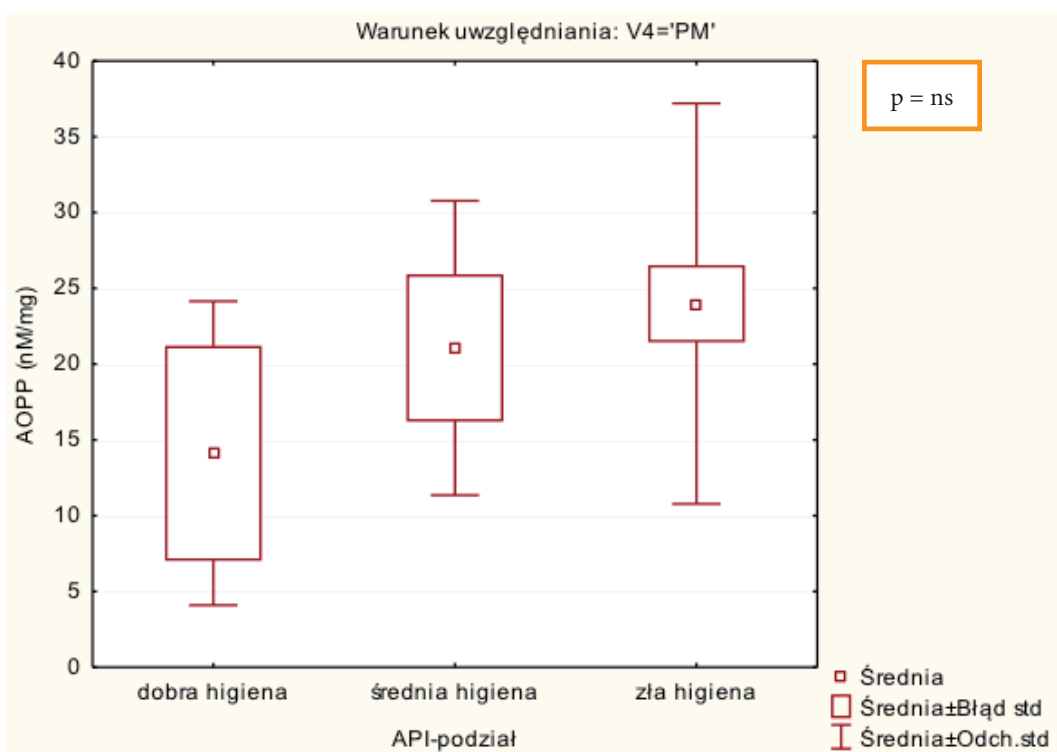
W grupie palących mężczyzn nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy żadnym z parametru stresu oksydacyjnego, a higieną jamy ustnej (ryciny 70–73).



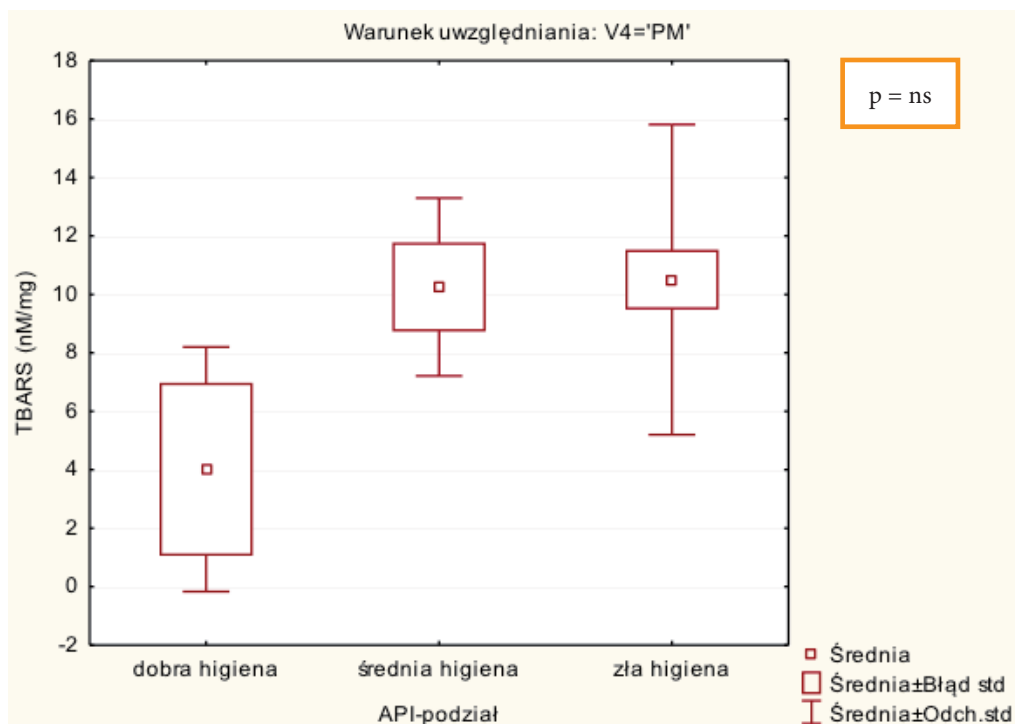
Rycina 70. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach



Rycina 71. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach



Rycina 72. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach



Rycina 73. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach

4.5.2. Porównanie poszczególnych parametrów stresu oksydacyjnego w zależności od higieny jamy ustnej pomiędzy grupami

Podjęto próbę zbadania stanu równowagi redoks, pomiędzy grupami ze szczególnym uwzględnieniem stanu higieny jamy ustnej. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego zostały oznaczone w ślinie pacjentów.

4.5.2.1. Według wskaźnika P11

4.5.2.1.1. Dobra higiena jamy ustnej

Celem przedstawienia wyników w sposób przejrzysty w tabeli zbiorczej zaprezentowano średnie stężenia wszystkich badanych parametrów stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów, którzy charakteryzowali się dobrą higieną jamy ustnej według wskaźnika P11 (tabela 47).

Następnie przy pomocy testów statystycznych porównano stężenia parametrów równowagi redoks pomiędzy wszystkimi badanymi grupami.

W przypadku średniego stężenia całkowitego białka w ślinie nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy wszystkim grupami. Różnice takie wystąpiły w przypadku parametru stresu oksydacyjnego TEAC, AOPP oraz TBARS.

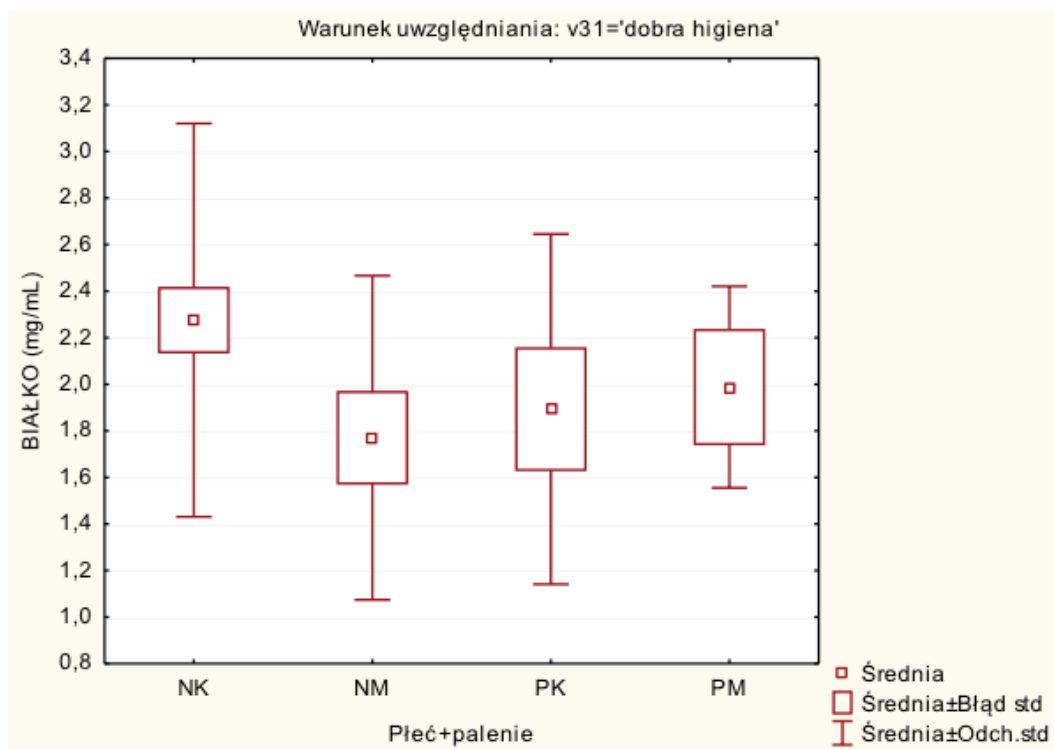
Tabela 47. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności dobrej higieny jamy ustnej (P1I)

Grupa	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
NK	35	2,28	2,21	1,03	4,04	1,50	2,99	0,84
NM	12	1,77	1,49	1,23	3,52	1,31	2,05	0,70
PK	8	1,89	1,81	0,86	3,47	1,53	2,07	0,75
PM	3	1,99	1,98	1,56	2,42	1,56	2,42	0,43
TEAC nM/mg								
NK	35	157,20	163,49	63,44	286,20	105,19	204,70	60,54
NM	12	222,37	249,25	94,80	302,21	179,42	265,63	61,26
PK	8	205,37	211,43	107,35	313,84	124,02	275,42	83,46
PM	3	205,28	218,96	122,66	274,20	122,66	274,20	76,69
AOPP nM/mg								
NK	33	8,34	6,89	0,03	22,75	3,71	13,25	6,07
NM	12	12,60	13,22	0,15	28,38	4,60	18,37	9,55
PK	8	18,80	18,22	6,72	38,98	11,69	22,43	9,95
PM	3	15,06	16,93	7,03	21,21	7,03	21,21	7,27
TBARS nM/mg								
NK	33	3,41	2,99	0,23	8,81	1,89	4,85	2,01
NM	12	2,97	3,06	0,08	7,36	1,33	4,29	2,14
PK	7	8,23	7,43	6,06	14,01	6,30	9,45	2,78
PM	3	5,08	6,98	1,06	7,19	1,06	7,19	3,48

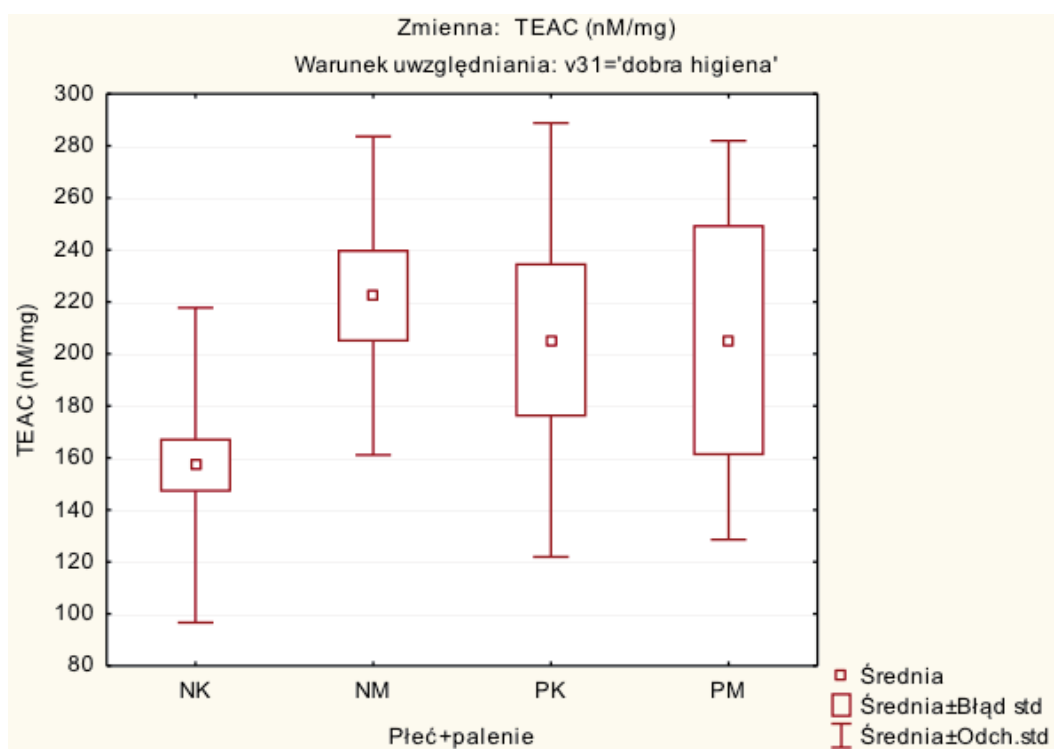
Średnia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekwiwalentów troloksu w ślinie (TEAC) statystycznie istotnie różniła się pomiędzy grupami niepalących mężczyzn oraz niepalących kobiet. Z kolei podczas analizy statystycznej średnich produktów utleniania białek (AOPP) odnotowano statystycznie istotną różnicę pomiędzy grupami palących i niepalących kobiet. Również w przypadku porównywania ostatniego z parametrów stresu czyli peroksydacji lipidów TBARS statystycznie istotną różnicę wykazano pomiędzy niepalącymi, a palącymi kobietami (tabela 48, ryciny 74–77).

Tabela 48. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów z dobrą higieną jamy ustnej (P1I)

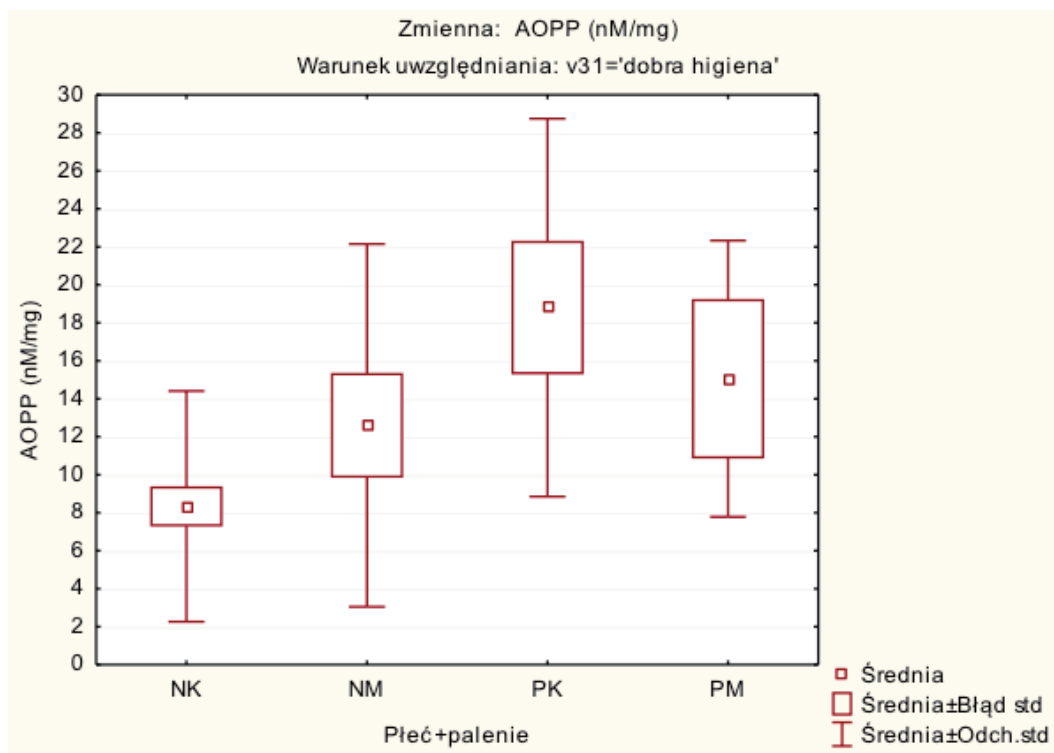
Porównywane grupy	Poziom istotności			
	BIAŁKO mg/mL	TEAC nM/mg	AOPP nM/mg	TBARS nM/mg
NK-NM	0,314925	0,037677	0,432971	0,948764
NK-PK	0,680417	0,318252	0,010990	0,000061
NK-PM	0,947300	0,678627	0,543587	0,672014
NM-PK	0,989823	0,953705	0,368690	0,000130
NM-PM	0,980354	0,982507	0,968402	0,541238
PK-PM	0,998521	1,000000	0,910905	0,246111



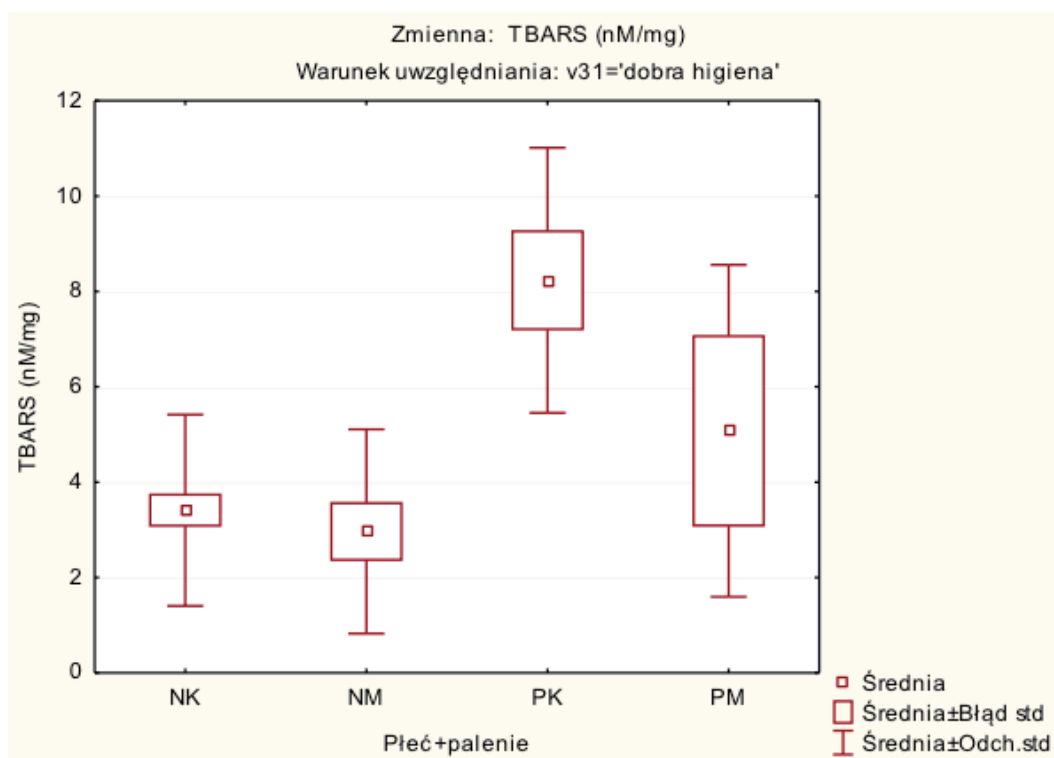
Rycina 74. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup z dobrą higieną jamy ustnej



Rycina 75. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup z dobrą higieną jamy ustnej



Rycina 76. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup z dobrą higieną jamy ustnej



Rycina 77. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS nM/mg w ślinie dla grup z dobrą higieną jamy ustnej

4.5.2.1.2. Średnia higiena jamy ustnej

Parametru stanu pro- i antyoksydacyjnego pacjentów ze średnią higieną jamy ustnej przedstawia tabela 49.

Porównując statystycznie parametry stresu oksydacyjnego pomiędzy badanymi grupami ze średnią higieną jamy ustnej (tabela 50, ryciny 78–81), zaobserwowano statystycznie istotne różnice w stężeniu AOPP oraz TBARS. Różnice wystąpiły przede wszystkim

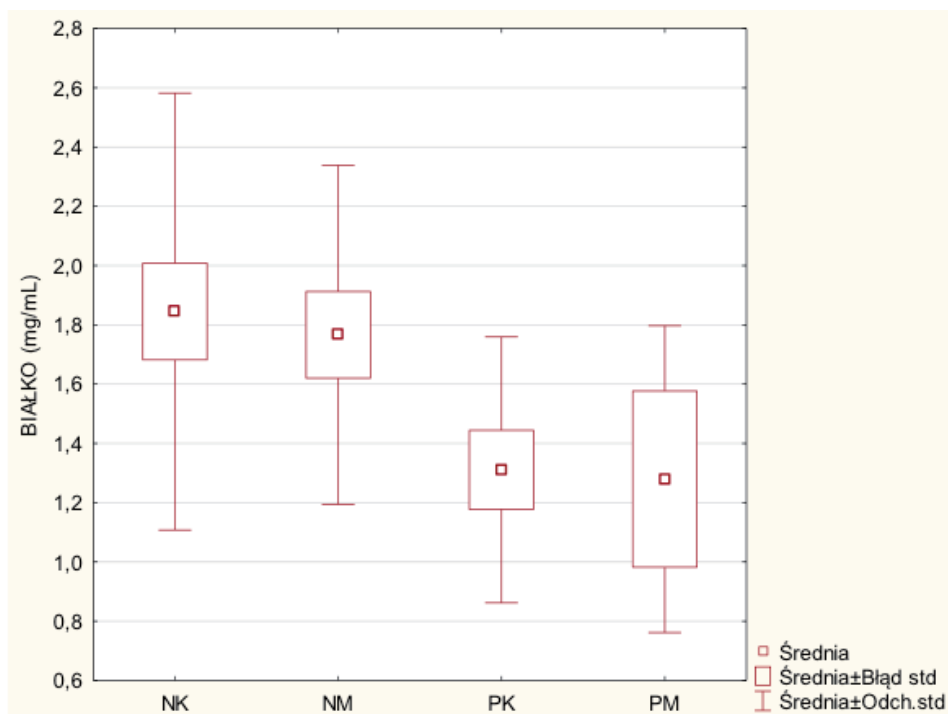
Tabela 49. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności średniej higieny jamy ustnej (P1I)

Grupa	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył	SD
BIAŁKO mg/mL								
NK	20	1,85	1,68	0,46	3,86	1,52	2,06	0,73
NM	15	1,77	1,81	0,98	2,91	1,28	2,00	0,57
PK	11	1,31	1,41	0,49	2,09	1,09	1,58	0,45
PM	3	1,28	1,52	0,68	1,63	0,68	1,63	0,52
TEAC nM/mg								
NK	20	203,70	174,79	58,59	619,42	140,60	218,30	117,93
NM	15	226,02	211,60	123,31	369,66	169,94	303,36	71,79
PK	11	234,55	241,05	40,45	497,72	216,54	272,03	122,36
PM	3	248,29	235,09	195,38	314,40	195,38	314,40	60,60
AOPP nM/mg								
NK	19	9,05	9,32	0,25	21,62	3,64	12,77	5,76
NM	14	10,98	12,67	1,69	21,26	2,82	16,31	7,05
PK	11	26,06	21,50	13,91	74,88	18,78	25,45	16,77
PM	3	21,14	15,04	13,53	34,84	13,53	34,84	11,89
TBARS nM/mg								
NK	18	3,80	3,40	0,38	10,94	2,63	4,51	2,53
NM	15	4,01	3,68	1,17	10,59	2,18	5,34	2,45
PK	11	11,43	11,89	5,62	26,25	6,59	12,78	6,00
PM	3	11,01	11,38	7,61	14,04	7,61	14,04	3,23

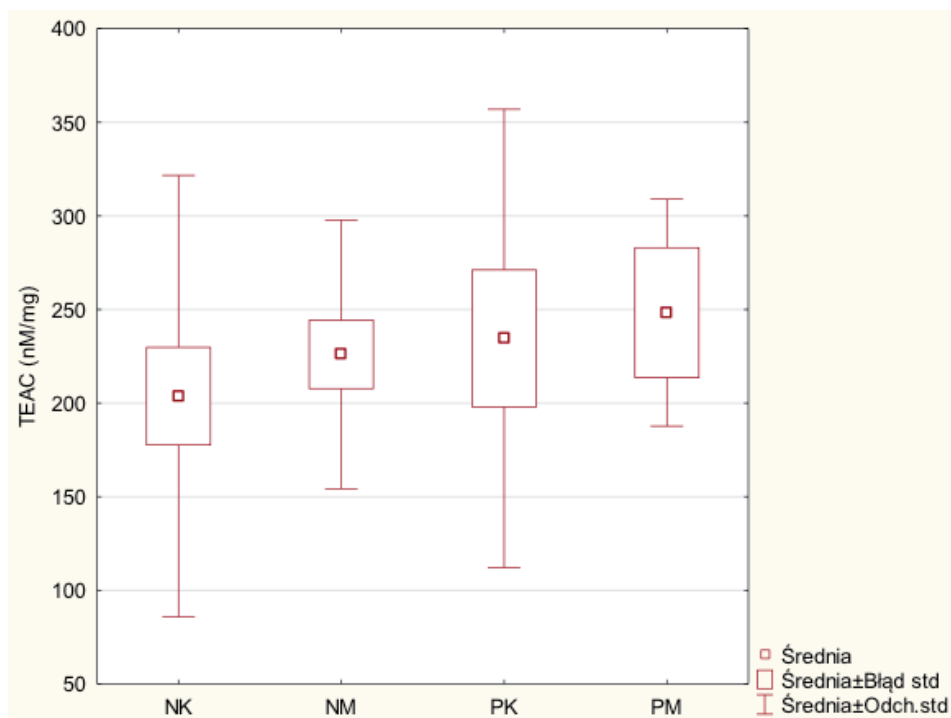
Tabela 50. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów z średnią higieną jamy ustnej (P1I)

Porównywane grupy	Poziom istotności			
	BIAŁKO mg/mL	TEAC nM/mg	AOPP nM/mg	TBARS nM/mg
NK-NM	0,986832	0,975005	1,000000	1,000000
NK-PK	0,172196	0,443356	0,000121	0,000202
NK-PM	0,546829	1,000000	0,353667	0,043726
NM-PK	0,346623	1,000000	0,006373	0,000957
NM-PM	0,677947	1,000000	1,000000	0,073220
PK-PM	0,999875	1,000000	1,000000	1,000000

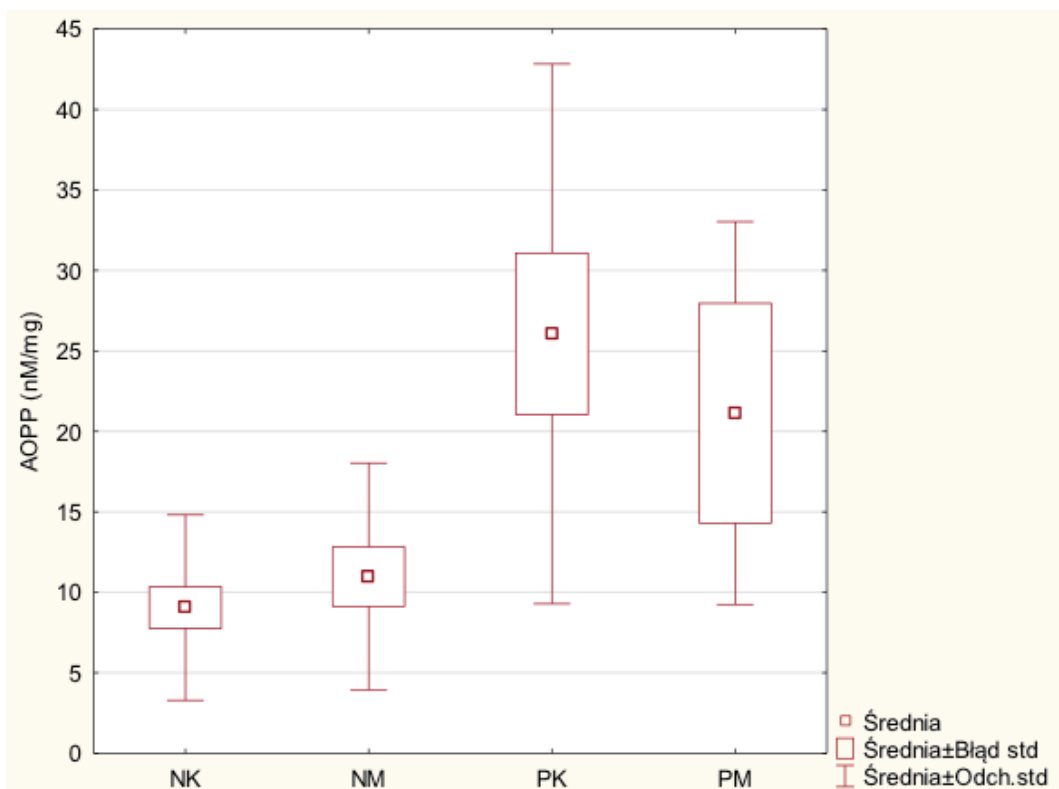
pomiędzy niepalącymi, a palącymi kobietami oraz pomiędzy niepalącymi mężczyznami, a palącymi kobietami. W odniesieniu do stężenia białka i TEAC, statystycznie istotnej różnicy nie stwierdzono.



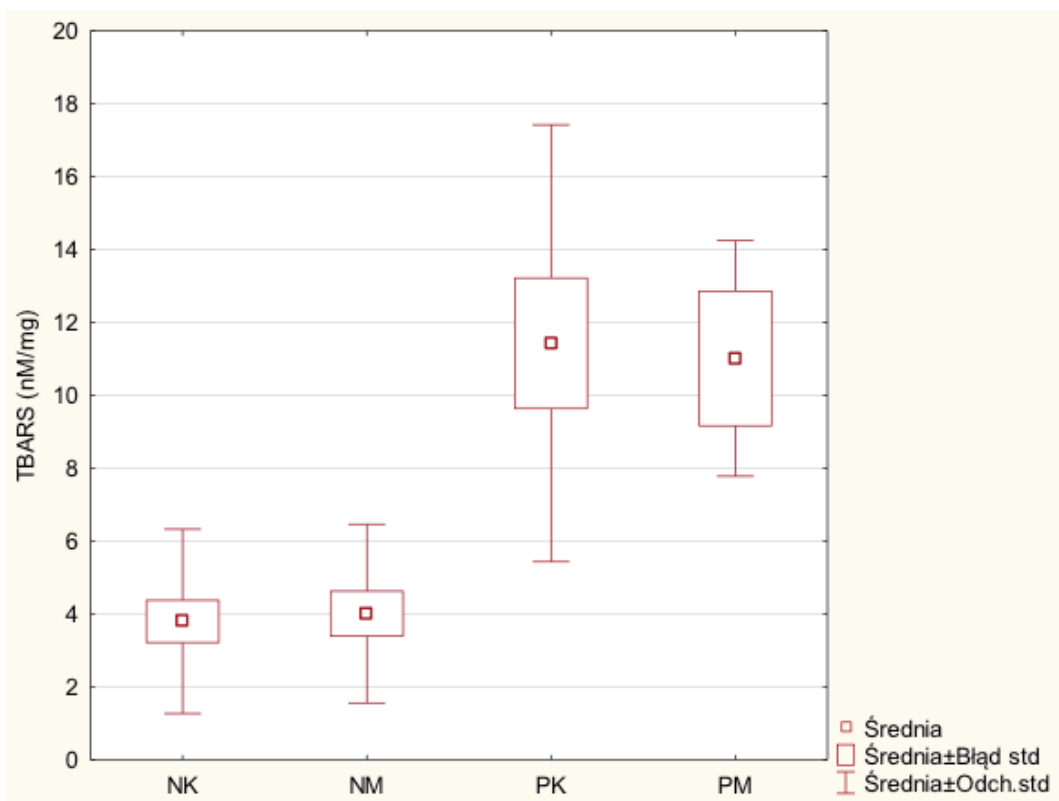
Rycina 78. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej



Rycina 79. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej



Rycina 80. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej



Rycina 81. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej

4.5.2.1.3. Zła higiena

Średnie stężenia białka, TEAC, AOPP oraz TBARS u pacjentów z najgorszą higieną jamy ustnej przedstawiono w tabeli 51.

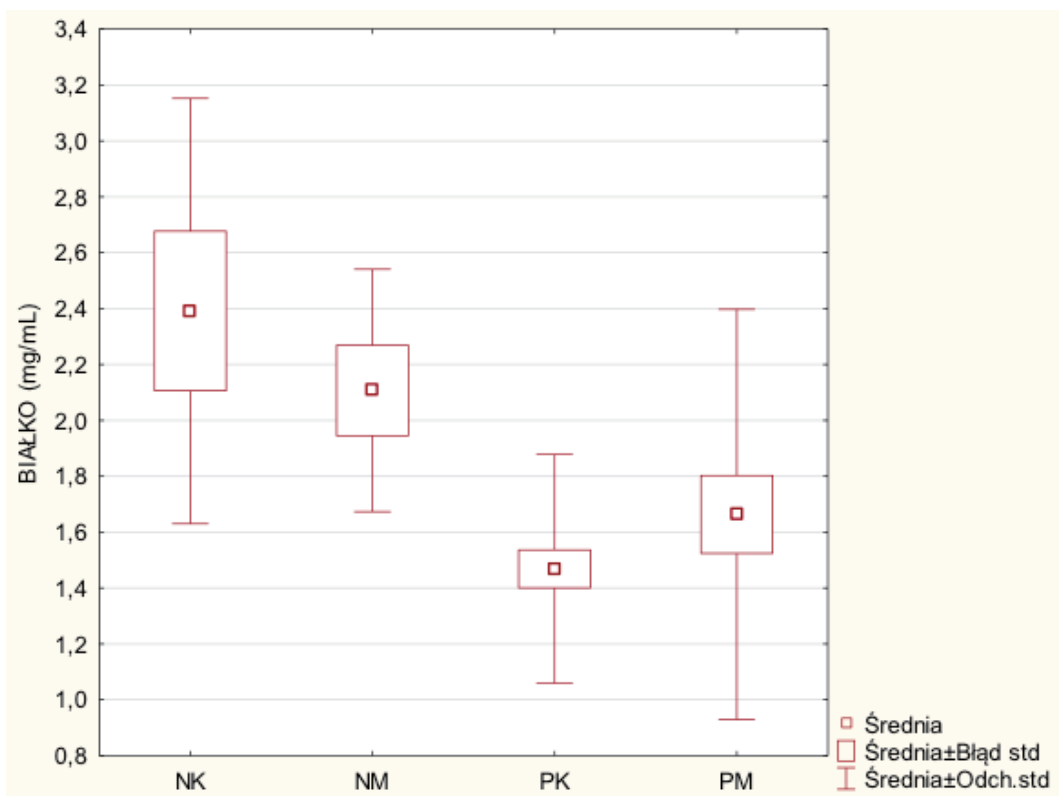
Analiza statystyczna wykazała, iż w grupie pacjentów ze złą higieną jamą ustnej, wystąpiła statystycznie istotna różnica we wszystkich badanych parametrach stresu oksydacyjnego. Pomiedzy grupą palących i niepalących kobiet różnica ta dotyczyła białka, AOPP, TEAC oraz TBARS, natomiast w przypadku palących i niepalących mężczyzn wyłącznie AOPP i TBARS (tabela 52, ryciny 82–85).

Tabela 51. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności złej higieny jamy ustnej (P1I)

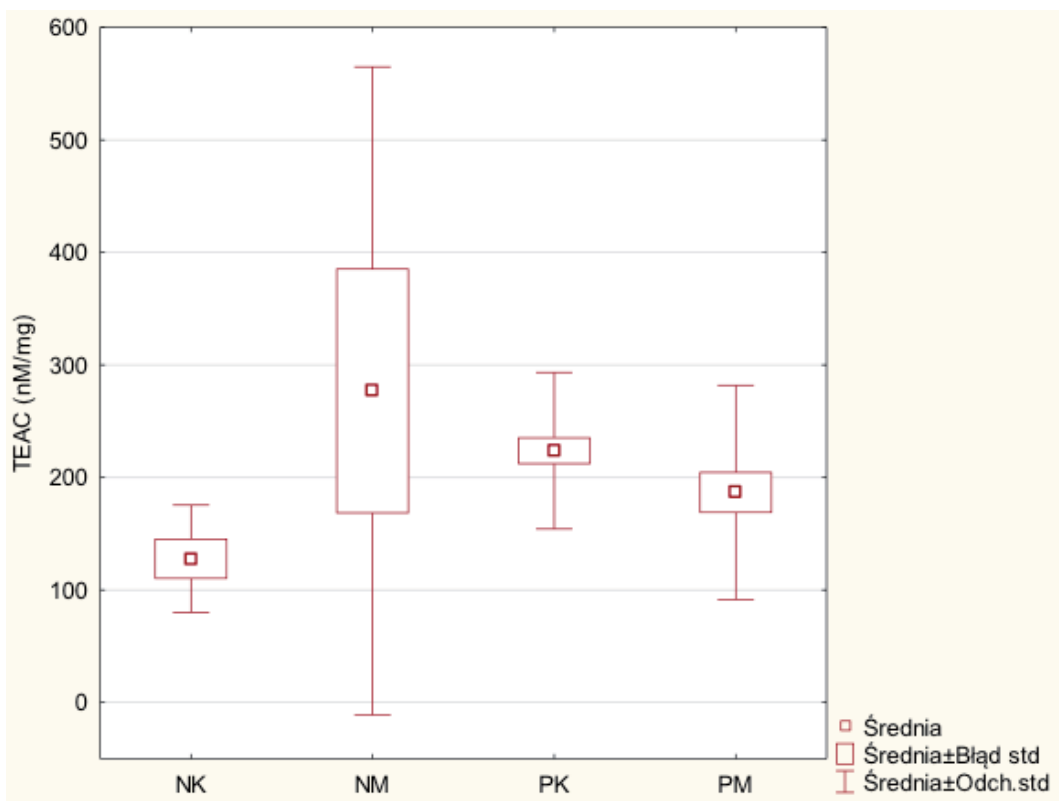
Grupa	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
NK	7	2,39	2,38	1,36	3,53	1,58	2,95	0,76
NM	7	2,11	2,05	1,52	2,88	1,85	2,36	0,43
PK	34	1,47	1,41	0,86	2,62	1,14	1,78	0,41
PM	27	1,66	1,64	0,38	3,90	1,23	2,12	0,73
TEAC nM/mg								
NK	7	127,75	116,27	81,15	222,11	85,18	148,22	47,65
NM	7	276,88	168,30	115,83	919,67	120,87	269,07	288,07
PK	34	223,74	229,91	60,83	324,04	180,45	268,23	69,55
PM	27	186,72	219,18	32,64	317,40	92,47	268,16	95,16
AOPP nM/mg								
NK	7	3,38	0,97	0,08	9,60	0,15	6,65	3,95
NM	7	4,70	4,32	0,50	9,59	3,07	6,17	2,79
PK	34	22,56	21,83	3,39	41,52	16,36	28,89	10,38
PM	27	24,14	21,05	9,35	54,77	13,93	29,37	13,15
TBARS nM/mg								
NK	7	2,28	2,33	0,15	4,23	0,64	3,39	1,50
NM	6	2,328096	2,27	0,20	4,11	1,40	3,72	1,45
PK	34	9,279236	7,43	2,32	27,39	6,13	9,83	6,15
PM	27	10,53611	8,78	3,64	29,39	7,40	14,23	5,29

Tabela 52. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów ze złą higieną jamy ustnej (P1I)

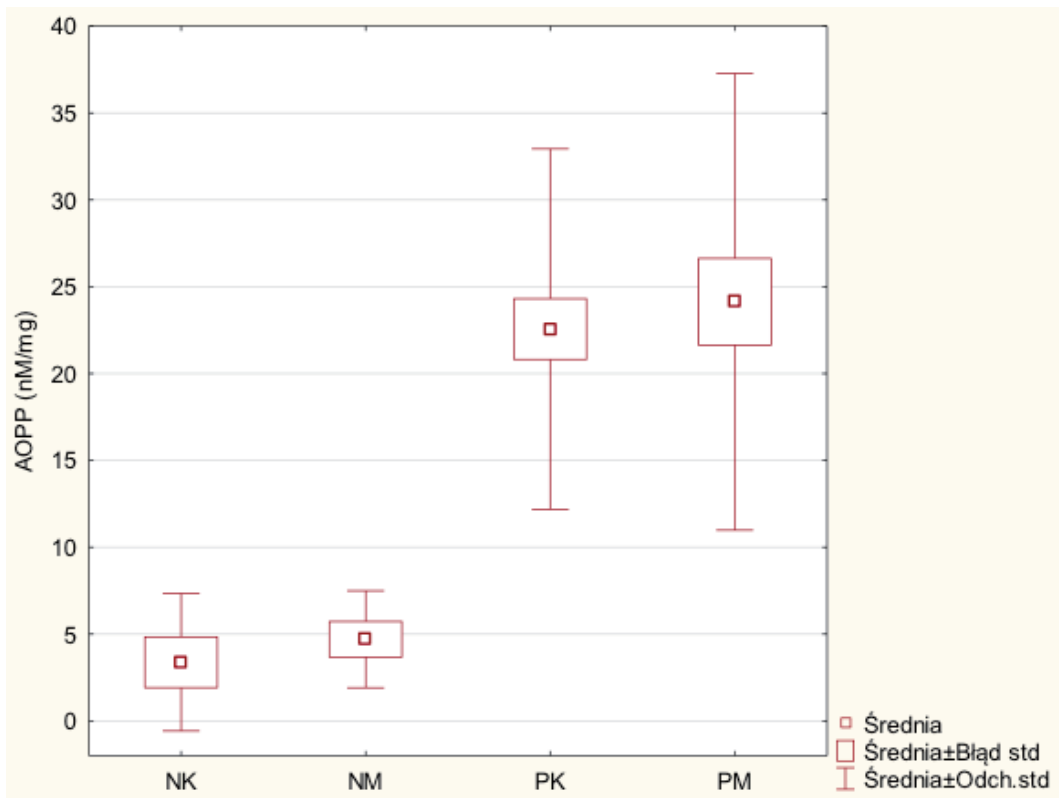
Porównywane grupy	Poziom istotności			
	BIAŁKO mg/mL	TEAC nM/mg	AOPP nM/mg	TBARS nM/mg
NK-NM	0,841467	0,827176	1,000000	1,000000
NK-PK	0,004002	0,036397	0,000282	0,001762
NK-PM	0,041503	0,391924	0,000390	0,000056
NM-PK	0,082725	1,000000	0,000625	0,004958
NM-PM	0,366600	1,000000	0,000839	0,000230
PK-PM	0,643089	0,994550	1,000000	0,858025



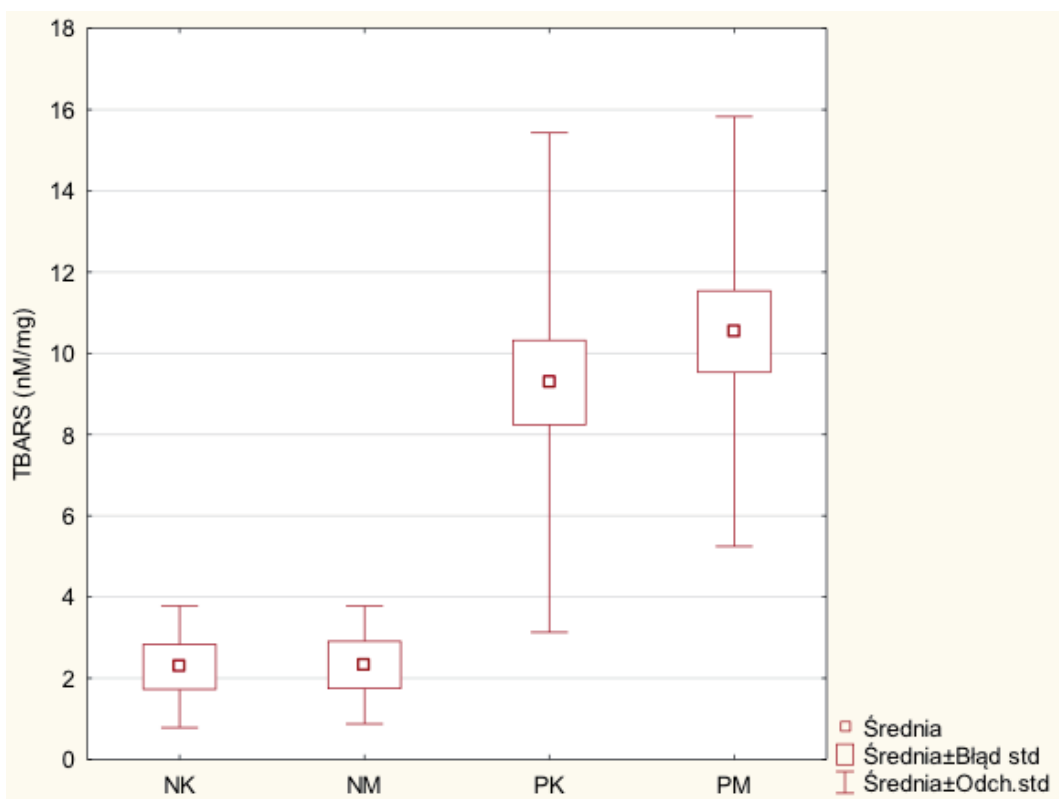
Rycina 82. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej



Rycina 83. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej



Rycina 84. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej



Rycina 85. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS w ślinie nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej

4.5.2.2. W zależności od wskaźnika API

4.5.2.2.1. Dobra higiena jamy ustnej

Podjęto próbę porównania parametrów stresu oksydacyjnego u pacjentów z dobrą higieną według wskaźnika API. Ze względu na bardzo małe liczebności w poszczególnych podgrupach (n), zwłaszcza palących kobiet, palących mężczyzn oraz niepalących kobiet, nie przeprowadzono analizy statystycznej.

Przedstawiono natomiast statystykę opisową poszczególnych parametrów stresu oksydacyjnego w ślinie dla grup badanych (tabela 53).

Tabela 53. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności dobrej higieny jamy ustnej (API)

Grupa	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
NK	11	2,65	2,73	1,15	4,04	1,79	3,65	1,00
NM	5	1,61	1,41	1,26	2,35	1,28	1,74	0,46
PK	2	2,65	2,65	1,83	3,47	1,83	3,47	1,16
PM	2	1,99	1,99	1,56	2,42	1,56	2,42	0,61
TEAC nM/mg								
NK	11	134,39	115,02	63,44	261,97	82,05	197,54	66,27
NM	5	227,80	248,90	171,39	266,07	187,45	265,20	45,05
PK	2	108,06	108,06	107,35	108,77	107,35	108,77	1,00
PM	2	170,81	170,81	122,66	218,96	122,66	218,96	68,09
AOPP nM/mg								
NK	10	10,21	8,24	2,66	19,60	6,73	13,67	5,37
NM	5	19,47	14,34	13,17	28,38	14,04	27,41	7,71
PK	2	11,69	11,69	11,37	12,02	11,37	12,02	0,47
PM	2	14,12	14,12	7,03	21,21	7,03	21,21	10,02
TBARS nM/mg								
NK	10	3,39	3,81	0,87	5,22	1,89	4,75	1,59
NM	5	3,42	2,93	2,18	4,89	2,24	4,84	1,35
PK	1	6,79	6,79	6,79	6,79	6,79	6,79	
PM	2	4,02	4,02	1,06	6,98	1,06	6,98	4,18

4.5.2.2.2. Średnia higieny jamy ustnej

Parametry stanu pro- i antyoksydacyjnego pacjentów ze średnią higieną jamy ustnej przedstawia tabela 54.

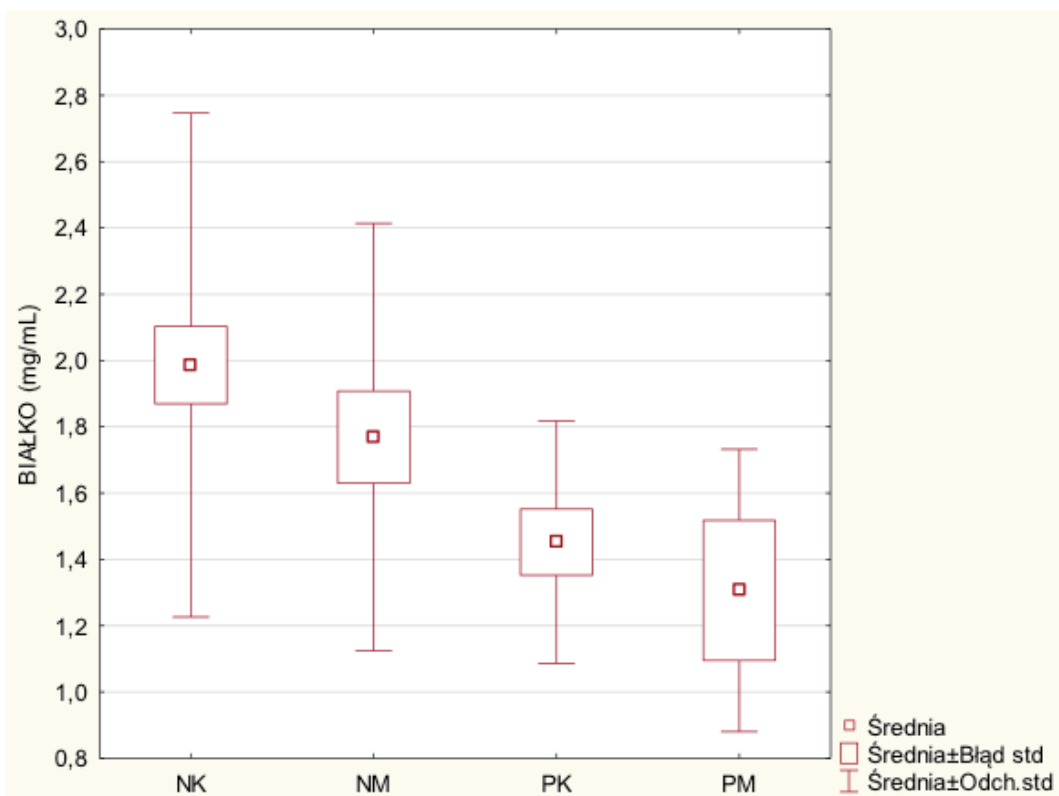
Tabela 54. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności średniej higieny jamy ustnej (API)

Grupa	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	SD
BIAŁKO mg/mL								
NK	41	1,99	1,83	0,46	3,86	1,46	2,55	0,76
NM	21	1,77	1,58	0,98	3,52	1,30	1,86	0,65
PK	13	1,45	1,42	0,69	2,20	1,32	1,64	0,37
PM	4	1,31	1,45	0,68	1,63	1,04	1,58	0,43
TEAC nM/mg								
NK	41	181,14	168,79	58,59	619,42	127,17	204,70	93,37
NM	21	227,45	213,92	94,80	369,66	189,64	266,65	70,21
PK	13	240,34	243,96	43,23	497,72	216,54	258,92	102,17
PM	4	236,18	217,47	195,38	314,40	197,62	274,75	55,09
AOPP nM/mg								
NK	40	7,81	7,66	0,03	21,62	3,22	12,02	5,47
NM	20	10,05	10,09	0,15	22,39	2,70	15,89	7,42
PK	13	19,43	19,14	6,72	25,45	17,41	24,67	5,28
PM	4	21,07	17,95	13,53	34,84	14,29	27,85	9,71
TBARS nM/mg								
NK	39	3,72	3,35	0,50	10,94	2,26	4,82	2,25
NM	21	3,74	3,44	0,23	10,59	2,18	4,91	2,47
PK	13	11,12	9,45	5,72	26,25	6,59	12,78	5,84
PM	4	10,26	9,68	7,61	14,04	7,80	12,71	3,04

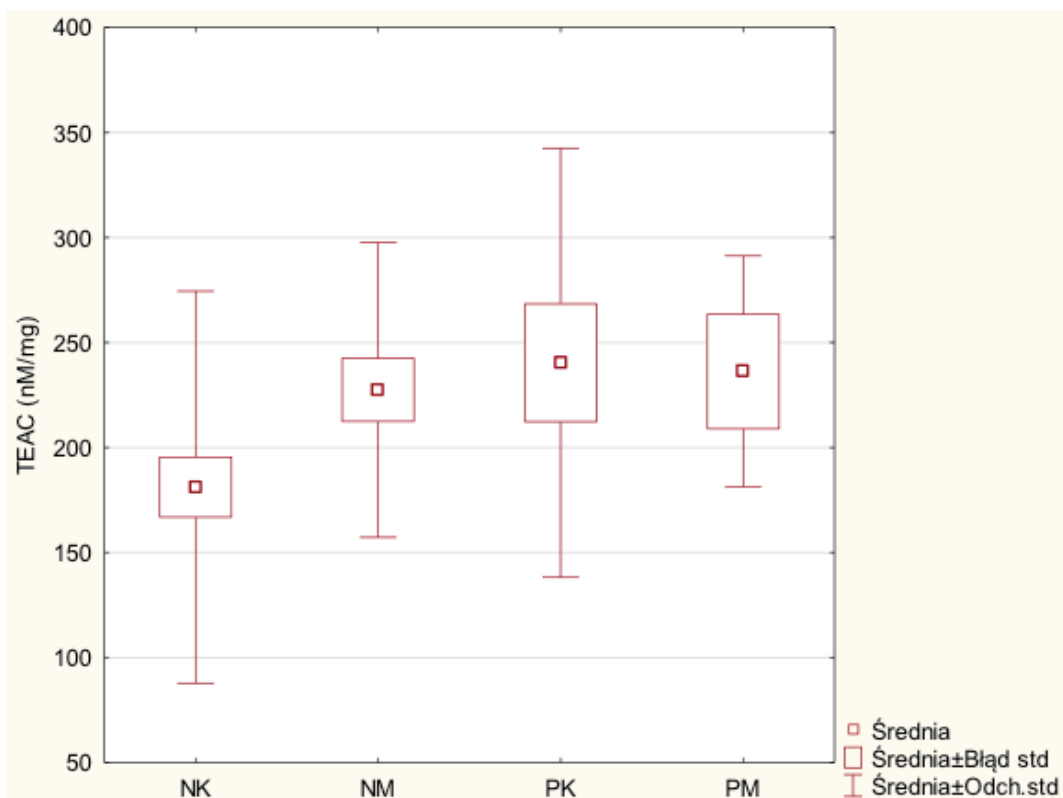
Analiza statystyczna wykazała, iż pomiędzy palącymi, a niepalącymi kobietami stwierdzono statystycznie istotną różnicę pomiędzy parametrami TEAC, AOPP oraz TBARS. Pomędzy palaczami, a niepalaczmi płci męskiej różnica ta wystąpiła wyłącznie pomiędzy AOPP i TBARS. Co ważne, w przypadku średniego stężenia białka całkowitego w ślinie, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy żadnymi z grup (tabela 55, ryciny 86–89).

Tabela 55. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów z średnią higieną jamy ustnej (API)

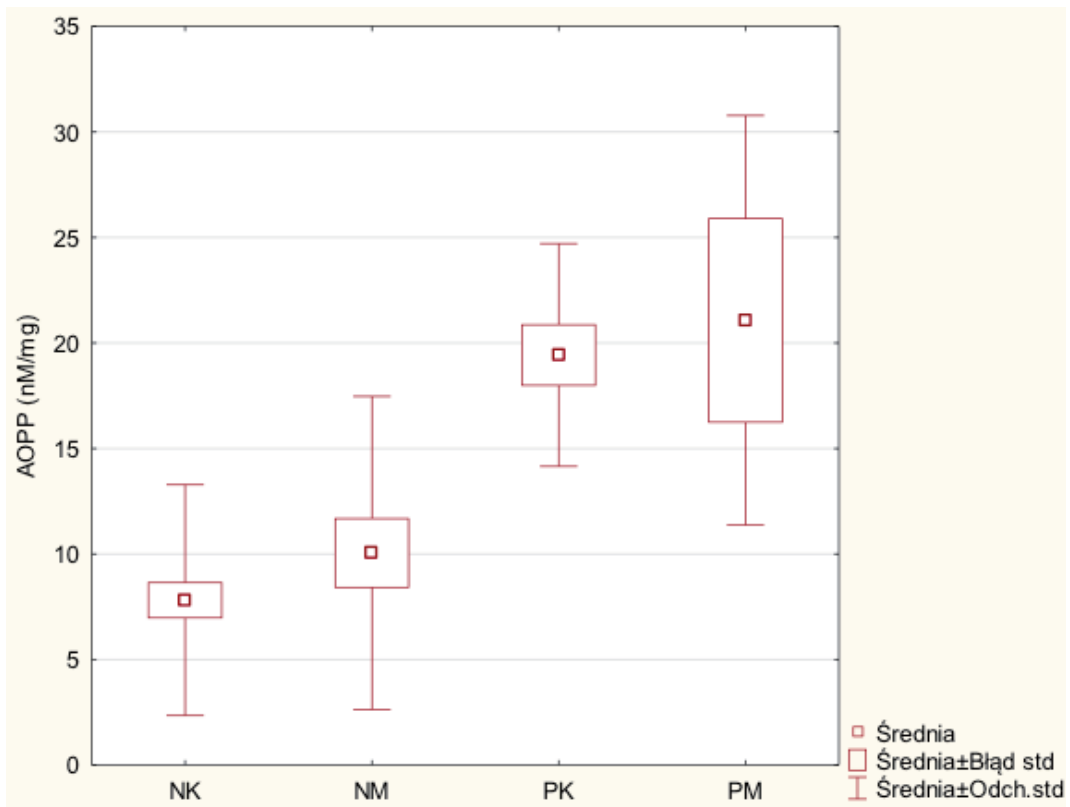
Porównywane grupy	Poziom istotności			
	BIAŁKO mg/mL	TEAC nM/mg	AOPP nM/mg	TBARS nM/mg
NK-NM	1,000000	0,024374	0,632892	1,000000
NK-PK	0,101708	0,028410	0,000003	0,000007
NK-PM	0,516465	0,469331	0,001843	0,010374
NM-PK	1,000000	1,000000	0,001081	0,000108
NM-PM	1,000000	1,000000	0,020121	0,019886
PK-PM	1,000000	1,000000	0,975446	1,000000



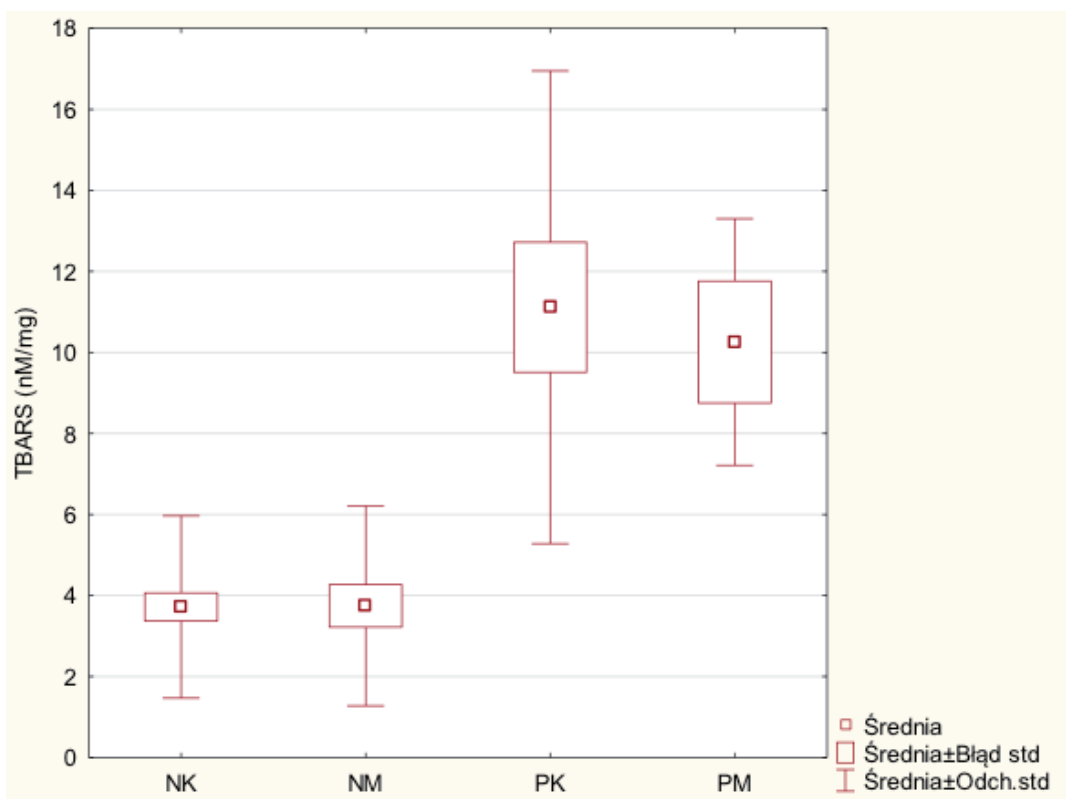
Rycina 86. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej



Rycina 87. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej



Rycina 88. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej



Rycina 89. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej

4.5.2.2.3. Zła higiena

Stan parametrów równowagi redoks w przypadkach pacjentów z najgorszą higieną jamy ustnej został zaprezentowany w tabeli 56.

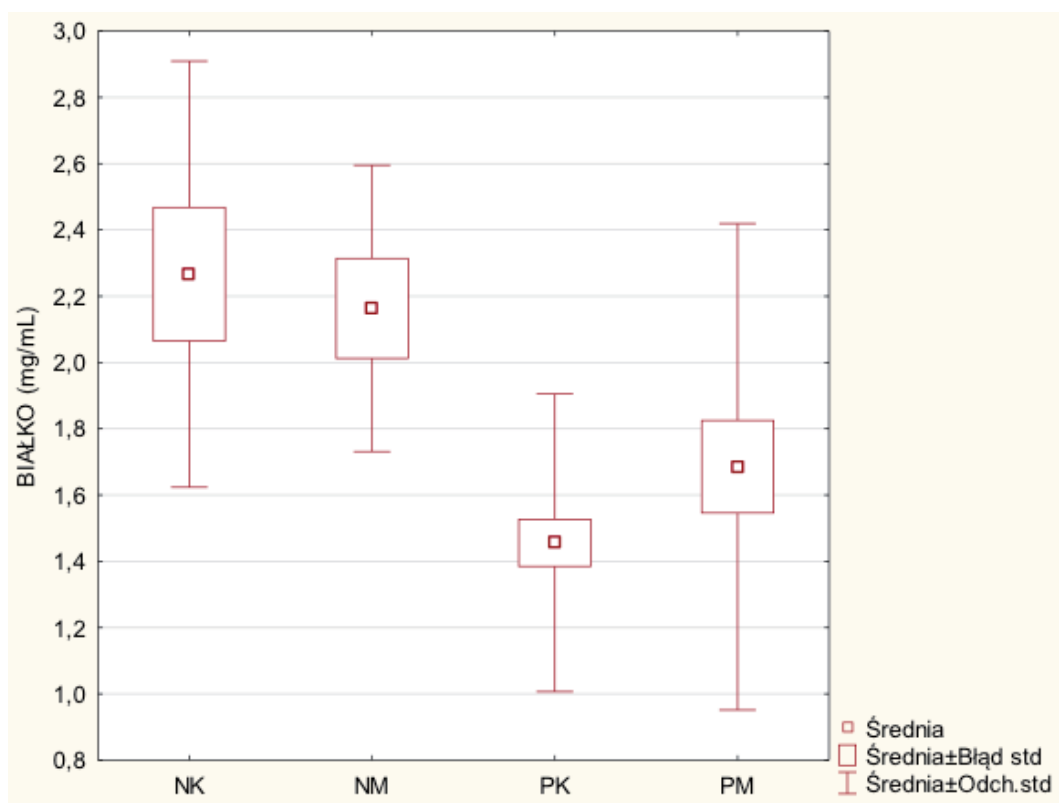
Porównując statystycznie parametry stresu oksydacyjnego pomiędzy badanymi grupami, ze złą higieną jamy ustnej, zaobserwowano statystycznie istotne różnice w stężeniu białka, AOPP oraz TBARS. Różnice wystąpiły przede wszystkim pomiędzy niepalącymi, a palącymi kobietami oraz pomiędzy niepalącymi, a palącymi mężczyznami. W odniesieniu do stężenia TEAC, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy (tabela 57, ryciny 90–93).

Tabela 56. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności złej higieny jamy ustnej (API)

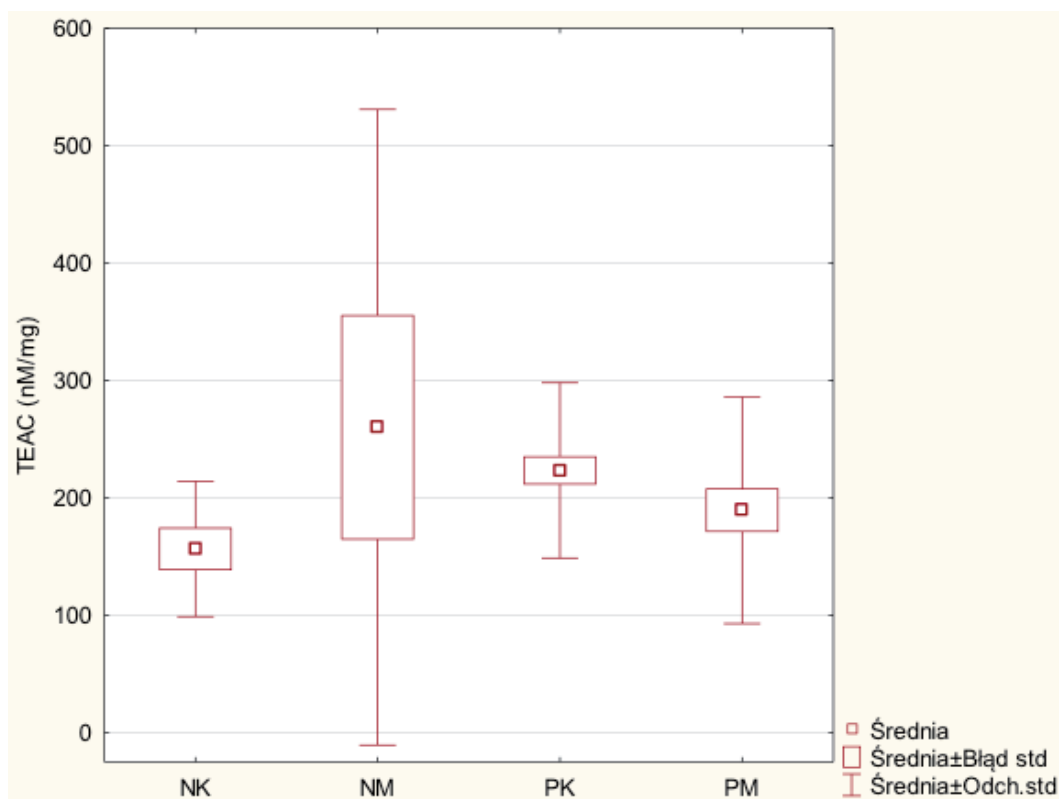
Grupa	n	Średnia	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył	SD
BIAŁKO mg/mL								
NK	10	2,27	2,19	1,58	3,53	1,76	2,71	0,64
NM	8	2,16	2,12	1,52	2,88	1,87	2,46	0,43
PK	38	1,46	1,41	0,49	2,62	1,14	1,80	0,45
PM	27	1,69	1,68	0,38	3,90	1,23	2,12	0,73
TEAC nM/mg								
NK	10	156,52	157,96	81,15	246,34	114,12	210,44	57,69
NM	8	260,18	161,07	115,83	919,67	132,08	229,82	270,85
PK	38	223,41	236,25	40,45	324,04	180,45	277,07	74,70
PM	27	189,47	230,63	32,64	317,40	92,47	273,26	96,62
AOPP nM/mg								
NK	9	6,26	2,53	0,08	22,75	0,18	6,65	8,24
NM	8	4,94	4,69	0,50	9,59	3,64	6,38	2,67
PK	38	24,43	21,91	3,39	74,88	16,36	29,78	13,23
PM	27	23,99	21,05	9,35	54,77	13,93	29,37	13,21
TBARS nM/mg								
NK	9	2,00	3,35	1,91	0,15	4,85	0,38	3,32
NM	7	2,01	3,44	2,10	0,08	4,11	0,20	3,72
PK	38	9,15	9,45	7,43	2,32	27,39	6,13	9,83
PM	27	10,51	9,68	8,78	3,64	29,39	7,19	14,23

Tabela 57. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów ze złą higieną jamy ustnej (API)

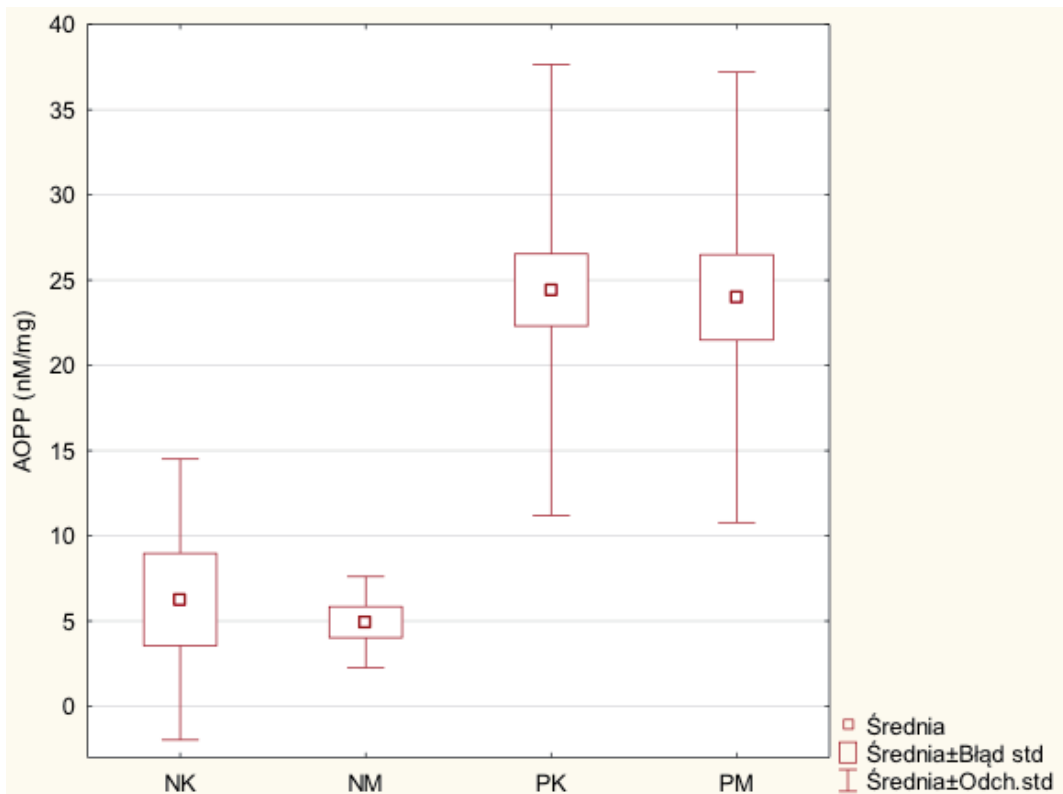
Porównywane grupy	Poziom istotności			
	BIAŁKO mg/mL	TEAC nM/mg	AOPP nM/mg	TBARS nM/mg
NK-NM	0,986351	1,000000	1,000000	1,000000
NK-PK	0,002589	0,111357	0,000585	0,000338
NK-PM	0,069830	0,919265	0,002557	0,000010
NM-PK	0,025026	1,000000	0,000184	0,001218
NM-PM	0,249126	1,000000	0,000841	0,000055
PK-PM	0,483069	1,000000	1,000000	0,960485



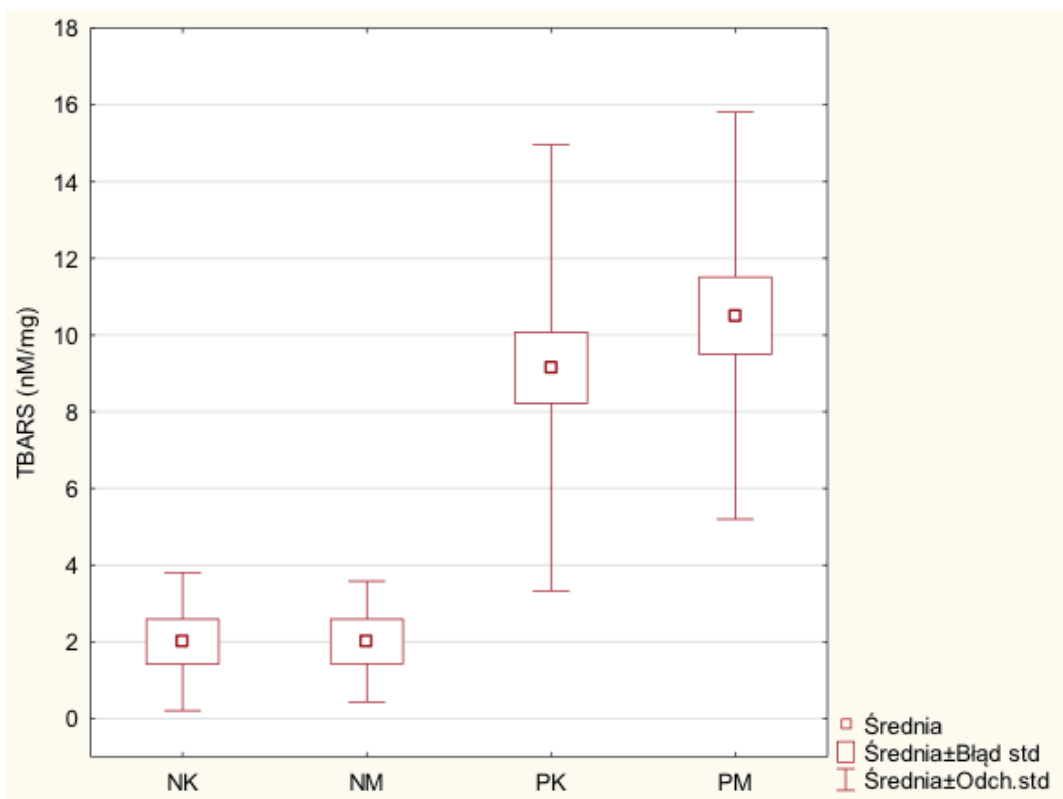
Rycina 90. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej



Rycina 91. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej



Rycina 92. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej



Rycina 93. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej

4.6. Korelacja pomiędzy kotyniną a parametrami stresu oksydacyjnego

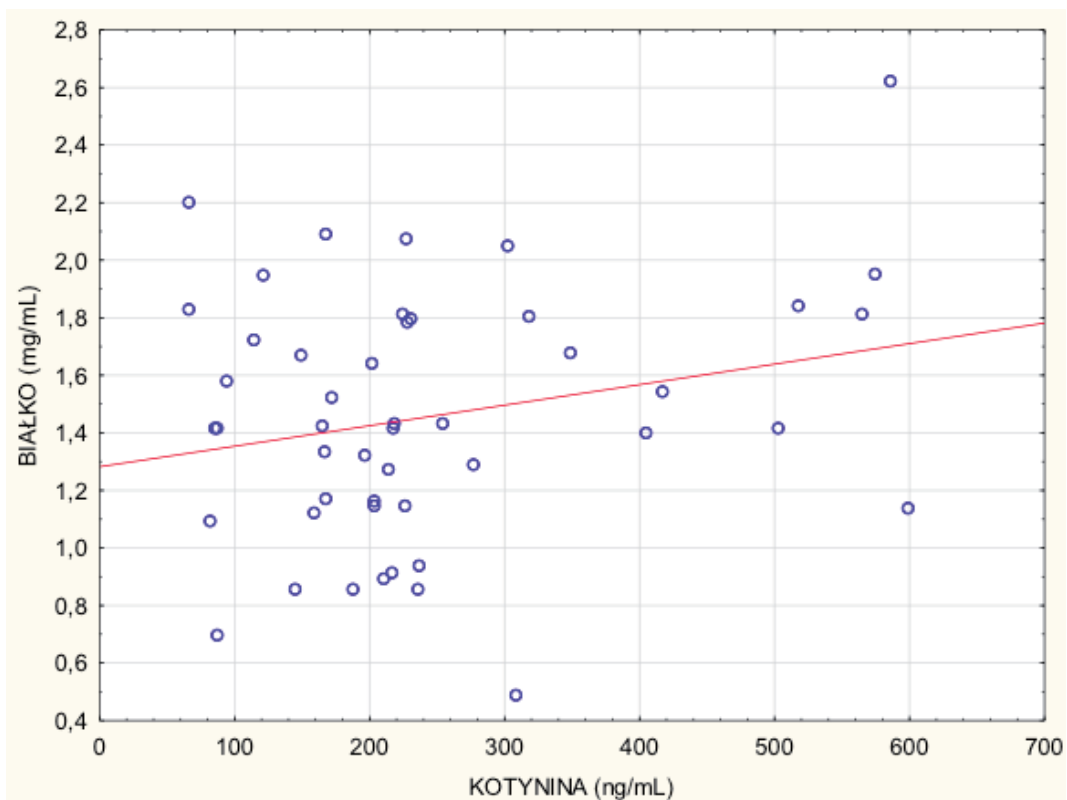
W przeprowadzonych badaniach nie odnotowano korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego w ślinie pacjentów palących u obu płci, a stężeniem kotyniny (tabele 58 i 59, ryciny 94–97).

Tabela 58. Korelacja pomiędzy stężeniami parametrów stresu oksydacyjnego w ślinie w stosunku do stężenia kotyniny u kobiet palących

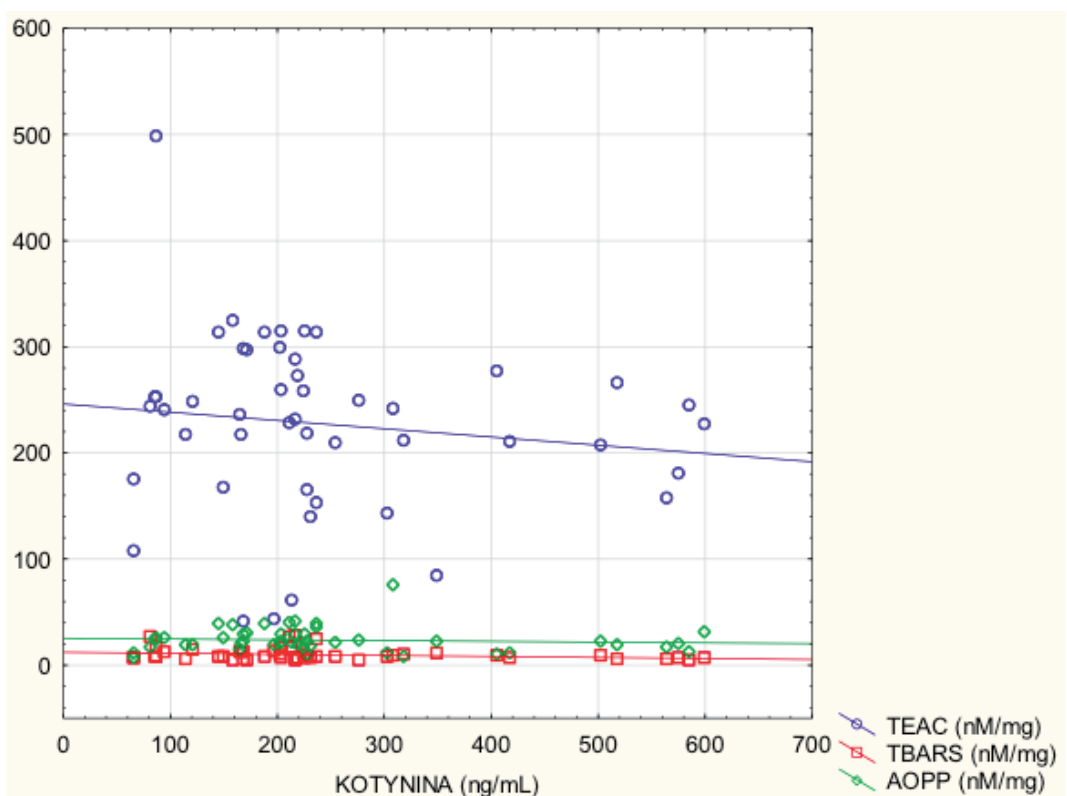
Badany parametr	N	p	rS-rang Spearmana
BIAŁKO (mg/mL)	48	0,376772	0,130467
TEAC (nM/mg)	48	0,202281	-0,187346
TBARS (nM/mg)	48	0,144142	-0,214001
AOPP (nM/mg)	48	0,488859	-0,102334

Tabela 59. Korelacja pomiędzy stężeniami parametrów stresu oksydacyjnego w ślinie w stosunku do stężenia kotyniny u kobiet palących

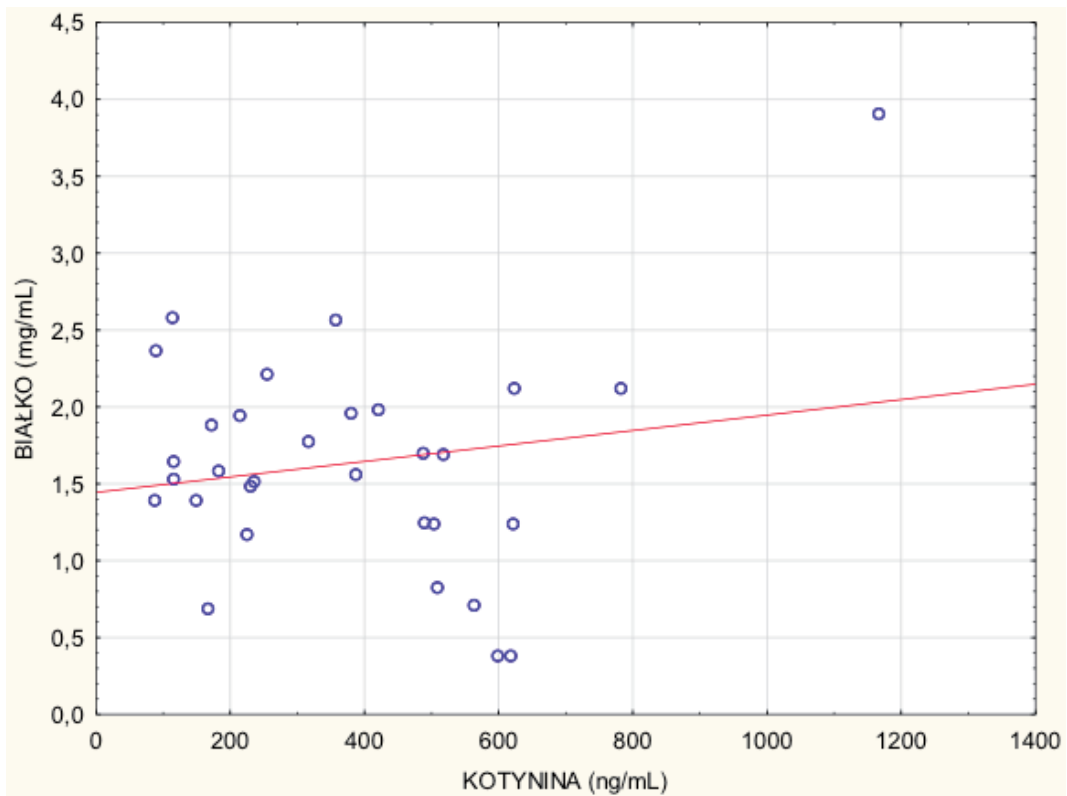
Badany parametr	N	p	rS-rang Spearmana
BIAŁKO (mg/mL)	31	0,590871	-0,100434
TEAC (nM/mg)	31	0,412942	0,152450
TBARS (nM/mg)	31	0,494469	0,127445
AOPP (nM/mg)	31	0,091721	0,308127



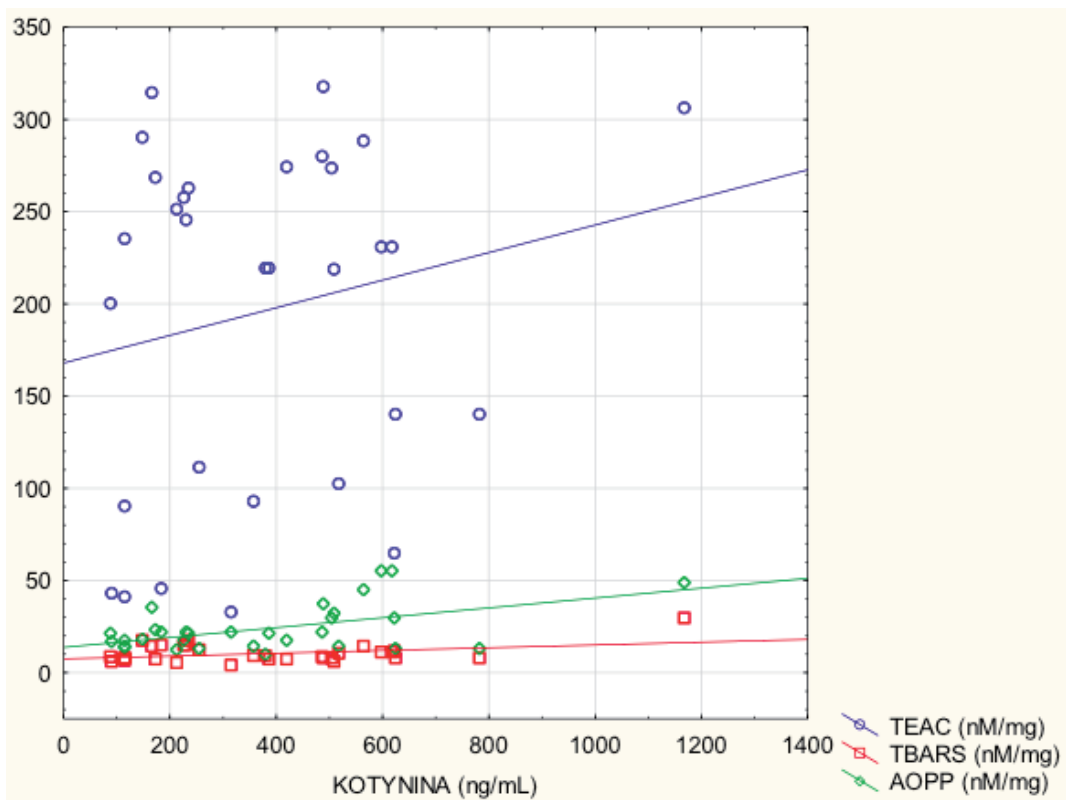
Rycina 94. Graficzne przedstawienie braku korelacji pomiędzy białkiem mg/ml, a kotyniną ng/mL wśród kobiet palących



Rycina 95. Graficzne przedstawienie braku korelacji pomiędzy TEAC nM/mg, TBARS nM/mg, AOPP nM/mg, a kotyniną ng/mL wśród kobiet palących



Rycina 96. Graficzne przedstawienie braku korelacji pomiędzy białkiem mg/ml, a kotyniną ng/mL wśród mężczyzn palących



Rycina 97. Graficzne przedstawienie braku korelacji pomiędzy TEAC nM/mg, TBARS nM/mg, AOPP nM/mg, a kotyniną ng/mL wśród mężczyzn palących

5. Dyskusja

Palenie tytoniu stanowi ogólnospołeczny problem, nie tylko w Polsce, ale w wielu innych krajach Europy i Świata. Nikotynizm, to choroba przewlekła, niestety często nawracająca, która stanowi najbardziej rozpowszechnione uzależnienie na świecie. Według WHO wymagana jest intensywna i złożona terapia lecznicza, aby całkowicie wyeliminować nałóg palenia tytoniu z życia codziennego. Wiąże się to przede wszystkim z faktem, iż palacz to często osoba pobudzona, z dobrym samopoczuciem, z mniejszym uczuciem głodu i zmęczenia, z lepszą zdolnością zapamiętywania oraz z obniżonym poziomem agresywności. Wyżej wymieniony, „błogi”, stan utrzymuje się wyłącznie przez pierwszy okres palenia tytoniu. Z czasem następują znaczne zmiany w układzie enzymatycznym, związane z uzależnieniem od nikotyny i dochodzi do skrócenia okresu dobrego samopoczucie pomiędzy wypalaniem papierosami. Stąd palacze coraz częściej i więcej sięgają po papierosy, a zaprzestanie palenia staje się w ich mniemaniu niemożliwe.

Statystyki krajowe przeprowadzone przez GATS (Global Adult Tobacco Survey) z ostatnich lat, które wykonane zostały na podstawie reprezentacyjnej próby populacji Polaków powyżej 15. roku życia, wykazały, iż dziennie w kraju pali ok 9,8 mln osób. Stanowi to około 30,3% osób dorosłych. Największą popularnością wśród Polaków papierosy cieszą się w grupie osób w średnim wieku, czyli pomiędzy 35.–50. rokiem życia — 40%. Odsetek palących mężczyzn wzrasta wraz z wiekiem, a największy procent mężczyzn palących znajduje się wśród 40-latków — 40%. Wśród kobiet największy odsetek regularnie palących występuje u 30-latek — 31%. Stąd w badaniach własnych jako grupę badawczą wybrano najbardziej reprezentatywną grupę palaczy obu płci w wieku pomiędzy 35. a 45. rokiem życia.

Na podstawie badania własnego zaobserwowano statystycznie istotną różnicę pomiędzy wiekiem palących kobiet i palących mężczyzn, a niepalącymi. Średnia wieku niepalących kobiet jak i mężczyzn była istotnie niższa niż u palaczy. Wynosiła odpowiednio dla kobiet $p = 0,0001$, oraz dla mężczyzn $p = 0,006$. Podobne zależności w swoich pracach odnotowali autorzy Zatoński W. et al. oraz Kuźmicka M. et al. Istotnym

czynnikiem dotyczącym nawyku palenia papierosów jest status socjoekonomiczny pacjentów. W pracy analizowano miejsce zamieszkania, rodzaj wykonywanej pracy oraz wykształcenie. Podczas przeglądu literatury dotyczącej statusu palenia społeczeństwa, a miejsca zamieszkania pacjentów zaobserwowano, iż tendencja nałogu palenia tytoni zmienia się i stopniowo wynosi się ze środowisk wiejskich, w kierunku średnich i większych miast. W badaniach własnym zarówno palący kobiety jak i mężczyźni to przede wszystkim mieszkańcy dużych miast powyżej 100 tysięcy mieszkańców. Podobne obserwacje wystąpiły w pracach autorów Roamlau R et al. oraz Mańczuk M. et al. Interesująco przedstawia się analiza wykonywanej pracy przez pacjentów. Zarówno kobiety palące jak i niepalące wykonywały pracę umysłową. Inaczej przedstawia się rozkład u mężczyzn który jest niejednorodny, aczkolwiek większości palący wykonywali pracę umysłową. Europejskie badania epidemiologiczne nie definiują ściśle połączenia nawyku palenia z wykonywaną pracą. Wydaje się, że dominuje tu czynnik geograficzny oraz zakorzenione tradycje w danym społeczeństwie. Wnioskiem, który często przytaczany jest w artykułach naukowych dotyczącym pracy, a nałogiem palenia jest fakt, iż osoby szybko rozpoczynający pracę zarobkową, zwłaszcza nastoletni mężczyźni, częściej sięgają po papierosy, niż ci którzy kontynuują naukę [Ramchand R. et al., 2007]. Analizie poddano również dane dotyczące wykształcenia Pacjentów w odniesieniu do palenia papierosów. Wyniki uzyskane w pracy, wyraźnie podkreślają brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy paleniem, a wykształceniem u obu płci. Odmienne wyniki uzyskali Kaleta D. et al. oraz Szczęch B et al., autorzy prac, którzy zaobserwowali, iż osoby z niskim poziomem wykształcenia istotnie częściej i regularniej stosowali wyroby tytoniowe, niż osoby z wykształceniem wyższym. Postawili wnioski, iż różnice te mogą wynikać między innymi z mniejszej świadomości szkodliwości palenia oraz z gorszego dostępu do środków farmakologicznych stosowanych do leczenia uzależnień.

Popularną diagnostycznie wydzieliną, coraz częściej wykorzystywaną w badaniach naukowych i klinicznych jest ślina. Dostępność materiału biologicznego oraz jego powtarzalność powoduje, że jest to metoda idealna do prowadzenia screeningu oraz monitorowania wielu chorób. Materiał ten może również stanowić idealne źródło dla obiektywnej oceny „ciężkości” nałogu palenia u chorego. Określenie stężenia kotyniny w ślinie pacjentów jest idealnym parametrem obiektywizującym wyżej wymieniony nałóg. W badanym materiale oznaczano średnie stężenie kotyniny w ślinie pacjentów palących. U palących kobiet jest ono statystycznie istotnie niższe niż u palących mężczyzn. Podobne wyniki zanotował Polańska K et al., Kaleta D. et al. oraz Kuźmicka P. et al.

W zależności od intensywności palenia można zaobserwować szereg zmian dotyczących całego organizmu człowieka. Kancerogeny zawarte w dymie tytoniowym nie pozostają obojętne dla błony śluzowej jamy ustnej. Przy dodatkowej obecności alkoholu, substancje toksyczne, rozpuszczają się w nim i wnikają w błonę śluzową manifestując się zmianami śluzówkowymi często o charakterze przednowotworowym lub nowotworowym. Stąd oceniając stan ogólny jamy ustnej palaczy, szczególną uwagę należało zwrócić na występowanie zmian w obrębie błony śluzowej. Jest ona jak najlepszy barometr odzwierciedlający zarówno nawyki higieniczne pacjenta jak i nałogi takie jak palenie papierosów czy spożywanie alkoholu. W badanym materiale zanotowałam następujące patologie błony śluzowej: przebarwienie melaninowe, leukoplakia, erytroleukoplakia, stomatitis nicotinic. Najczęściej chorobę raka jamy ustnej poprzedzają leukoplakia i erytroplakia. W badanym materiale wystąpiły one łącznie u 17 palaczy. Podobnych obserwacji dokonali Malara P. et al., oraz Walter A. et al., czy Majewski J. et al.

U pacjentów nałogowo palących tytoń znacznie pogarsza się higiena jamy ustnej. Palenie papierosów utrudnia utrzymanie prawidłowej higieny jamy ustnej poprzez gromadzenie się biofilmu bakteryjnego, osadów i przebarwień. W wyniku czego często dochodzi do maskowania podstawowych wykładników stanu zapalnego dziąseł jakim są zaczerwienienie, obrzęk, krwawienie. Co w dalszych etapach może skutkować rozwojem choroby przyzębia.

W pracy oceniano pięć sposobów, które zapewniają optymalną higienę jamy ustnej. Należą do nich szczotkowanie zębów, stosowanie nici dentystycznej, szczoteczki międzyzębowej, irygacje wodne oraz płukanki stomatologiczne. Najczęściej, jako podstawową metodę higienizacyjną, pacjenci stosowali szczotkowanie zębów. Jedynie 38 badanych szczotkowało zęby częściej niż dwa razy dziennie. Dodatkowo nie wykazano różnicy statystycznej pomiędzy paleniem, a częstością szczotkowania zębów. Potwierdzają to badania Rudziński R. et al.

Spośród pozostałych badanych przyborów higienizacyjnych najczęściej stosowaną metodą było nitkowanie przestrzeni międzyzębowych. Zaobserwowano, iż stosowanie przez badanych pacjentów nici dentystycznej jest statystycznie wyższe u kobiet niepalących niż palących. Niewielka liczba osób stosująca pozostałe przybory higienizacyjne nie pozwoliła na postawienie istotnych wniosków. Celem obiektywizacji higieny jamy ustnej w pracy przedstawiono wyniki dwóch wskaźników P1I oraz API, które oceniają odpowiednio grubość płytki nazębnej oraz jej obecność w przestrzeniach międzyzębowych. W badaniach własnych średnia wielkość wskaźnika P1I u palaczy, zarówno kobiet

i mężczyzn była dość zbliżona i wynosiła pomiędzy 2,14 a 2,39, natomiast u osób niepalących — 0,88–1,09. Analiza statystyczna wykazała istotną różnicę pomiędzy palaczami, a pacjentami niepalącymi u oby płci $p < 0,05$. Na podstawie wskaźnika PII zakwalifikowano pacjentów do trzech grup w zależności od higieny jamy ustnej. W grupie ze złą higieną jamy ustnej znalazły się 84 osoby z czego to osoby palące wynosiła, aż 70. Gorszy stan higieny jamy ustnej u osób intensywnie palących tytoń potwierdził Witula et al. Interpretowany przez nich wynik PII u nałogowych palaczy wyniósł średnio 2,00, natomiast u niepalących 1,72. Sreedevi et al. także przedstawili w swojej publikacji analogiczne wyniki, aczkolwiek średnie wartości dla wskaźnika PII dla palaczy wynosiły 1,3, a dla osób niepalących 1,04. W badaniu własnym w sposób analogiczny przedstawiono i omówiono wyniki dla wskaźnika API. Średnia wartość dla wskaźnika API wnosila 55% dla osób niepalących, natomiast 83% dla palaczy. Dodatkowo statystycznie istotną różnicę odnotowano pomiędzy mężczyznami i kobietami palącymi i niepalącymi. Klasyfikując badanych według wskaźnika API do grupy pacjentów ze złą higieną jamy ustnej zaliczono 93 pacjentów, z czego 75 to nałogowi palacze. Podobne wyniki w badaniach naukowych uzyskali Kowalski et al. oraz Rudziński R. et al. którzy dowiedli w swoich publikacjach wyższą wartość wskaźnika płytki API w grupie osób palących tytoń, w porównaniu z osobami niepalącymi. W pracy Kowalskiego et al. wartości te wynosiły odpowiednio 68–54%, natomiast u Rudzińskiego R. et al. — 84–67%.

Parametry stresu oksydacyjnego coraz częściej znajdują zastosowanie we współczesnej medycynie. Często pozwalają one obiektywnie postawić diagnozę oraz przewidzieć rozwój choroby. Stanowią one również pewnego rodzaju ostrzeżenia dla organizmu i mogą być traktowane jako czynniki alarmowe. Optymalne parametry stresu oksydacyjnego powinny być stabilne, łatwe w oznaczeniu, odzwierciedlać specyficzne szlaki utleniania i korelować z ciężkością choroby [Dalle-Donne et al., 2006]. Biorąc pod uwagę, że wolne rodniki są wysoce reaktywne i mają krótki okres półtrwania, produkty powstałe w wyniku reakcji redoks z makrocząsteczkami komórkowymi są preferencyjnie stosowane jako biomarkery uszkodzeń oksydacyjnych [Palmieri et al., 2007]. Podstawowymi parametrami stresu oksydacyjnego są białka, lipidy oraz produkty oksydacyjnego DNA oraz jego fragmentów. Niemniej jednak, według autorów, zastosowanie panelu biomarkerów zamiast pojedynczego parametru, zapewnia więcej informacji, zmniejsza fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne wyniki i umożliwia lepsze zrozumienie podstawowych patomechanizmów choroby. W badaniu własnym poddano analizie cztery pod-

stawowe parametry stresu oksydacyjnego: białko, peroksydacja lipidów, zdolności antyoksydacyjna ekwiwalentów troloksu oraz produkty utleniania białek.

Białka odpowiedzialne za większość procesów funkcjonalnych w komórce ludzkiej [Dalle-Donne et al., 2003]. Utlenianie białek może zachodzić na poziomie pojedynczych reszt aminokwasowych, może prowadzić do fragmentacji łańcuchów polipeptydowych lub do kowalencyjnego sieciowania dwóch aminokwasów tego samego lub dwóch różnych białek [Shacter, 2000]. Szeroko rozpowszechnione metody oceny utleniania białek to pomiar grup karbonylowych za pomocą swoistych przeciwciał w teście ELISA lub Western blot oraz za pomocą testu spektrofotometrycznego opartego na derywatywacji dinitrofenylohydrazyny [Dalle-Donne et al., 2003; Cabiscol et al., 2014]. Zaawansowane produkty utleniania białek (AOPP) stanowią wrażliwy biomarker, zwłaszcza ze względu na aktywację neutrofilii i aktywność enzymatyczną mieloperoksydazy. Dawniej uważano, że AOPP jest nową toksyną mocznicową, odzwierciedlającą stan silnie utlenionego białka, ale stwierdzono, że utleniony fibrynogen jest główną cząsteczką odpowiedzialną za wzrost stężenia AOPP [Selmeci, 2011]. Należy to uwzględnić przy interpretacji wyników. W badaniu własnym średnie stężenia białka dla kobiet palących wyniosły 1,50 mg/mL, mężczyzn palących 1,66 mg/mL. W przypadku osób niepalących zarówno kobiet jak i mężczyzn stężenia te były wyższe i mieściły się w granicach 1,84–2,15 mg/L. Zano-towano statystycznie istotną różnicę w wysokości stężeń białek u niepalących i palących kobiet, co ciekawe nie odnotowano wyżej wymienionej różnicy u mężczyzn. W badaniach przeprowadzonych przez autorów Thothowa et al. wyniki prezentowały się w bardzo podobnych rzędach wielkości, aczkolwiek statystycznie istotna różnica wystąpiła u obu płci. W badaniu własnym analizowano również AOPP. W tym przypadku zarówno u kobiet jak i u mężczyzn zaobserwowano statystycznie istotną różnicę w stężeniu AOPP w ślinie u osób niepalących, a palaczy. Co podkreśla, iż AOPP stanowi wysoce czułe badanie określające stan pro- i antyoksydacyjny organizmu. Podobne obserwacje wystąpiły w badaniach Sculley et al.

W przypadku peroksydacji lipidów najbardziej badany markerem jest aldehyd malonowy (MDA). MDA jest produkowany z kwasów tłuszczowych z dwoma lub więcej podwójnymi wiązaniami przerywanymi metylenem [Ayala et al., 2014]. Standardową metodą stosowaną do wykrywania MDA jest test spektrofotometryczny opracowany przez Yagi, który opiera się na reakcji z kwasem tiobarbiturowym w środowisku kwaśnym. Jest on również określany jako test substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). W badaniu własnym parametr ten został oznaczony i stanowi kolejny, zaraz

po AOPP parametr, w którym wystąpiła statystycznie istotna różnica stężeń pomiędzy kobietami palącymi i niepalącymi oraz mężczyznami palącymi i niepalącymi. Podobne wyniki uzyskano w pracy.

Ostatnim badanym parametrem była zdolności antyoksydacyjna ekwiwalentów troloksu — TEAC. We wszystkich badanych grupach średnia wartość wskaźnika była bardzo zbliżona. Stąd analiza statystyczna uwidoczniała jedynie istotną zależność w przypadku palących i niepalących kobiet. Parametr ten został oznaczony jako parametr dodatkowy, w literaturze nie odnaleziono publikacji przedstawiające zbliżone badania, stąd nasuwa się wniosek, że tak powinien być przedstawiany podczas analizy wyników.

W pracy podjęto próbę porównania parametrów stresu oksydacyjnego, a stanu higieny jamy ustnej w zależności od badanego wskaźnika. W analizowanym materiale nie znaleziono statystycznie istotnych różnic we wszystkich ocenianych parametrach stresu oksydacyjnego tylko w wybranych. Najczęściej i najbardziej wyraźnie statystycznie istotną różnicę manifestowały parametry stresu oksydacyjnego takie jak AOPP oraz TBARS. Zarówno w przypadku złej higieny według wskaźnika PII i API wystąpiła statystycznie istotna różnica pomiędzy nałogowymi palaczami, a osobami niepalącymi u obu płci.

Ocena stężenia kotyniny w korelacji z parametrami stresu oksydacyjnego jest bardzo interesująca, ponieważ nie znaleziono statystycznie istotnej zależności pomiędzy jej zawartością, a poziomem parametrów stresu oksydacyjnego. Wydaje się że zwiększenie liczebności grupy badanej pozwoliłoby wzmocnić i uwidocznić wyżej wymienioną korelację, ponieważ podczas indywidualnej analizy parametrów u osób palących, taka wystąpiła.

6. Wnioski

Przeprowadzone badania kliniczne oraz laboratoryjne pozwalają na wysunięcie poniższych wniosków:

1. Pacjenci palący cechują się gorszym stanem zdrowia jamy ustnej, co pociąga za sobą konieczność częstszych wizyt kontrolnych stomatologicznych i szersze prowadzenie działań profilaktyczno-leczniczych.
2. Stan higieny jamy ustnej osób palących, w porównaniu z niepalącymi, wskazuje na konieczność wdrożenia intensywnej edukacji prozdrowotnej.
3. Oznaczone parametry stresu oksydacyjnego, zwłaszcza AOPP oraz TBARS, były znacznie podwyższone w grupie badanej u osób z gorszym stanem błony śluzowej oraz higieny jamy ustnej. Parametry te mogą być przydatne w ocenie narażenia na wystąpienie patologii błony śluzowej jamy ustnej palaczy.
4. Badanie stężeń kotyniny i parametrów stresu oksydacyjnego nie wykazały korelacji.

7. Streszczenie

Współczesna medycyna zwraca szczególną uwagę na znaczącą rolę reaktywnych form tlenu w funkcjonowaniu organizmu ludzkiego. Wolne rodniki oraz inne reaktywne cząstki zdolne są do niszczenia wielu struktur komórkowych. Można przypuszczać, iż występowanie wykładników stanu pro- i antyoksydacyjnego jest zdecydowanie wzmożone w przypadku zaniedbań higienicznych oraz przy współistniejącym nałogu palenia tytoniu. Pomimo prowadzonych licznych akcji uświadamiających społeczeństwo, tytoń w formie palonej, czy do żucia, jest nadal najczęstszą formą uzależnień. Palenie tytoniu jest nałogiem sprzyjającym powstawaniu szeregu chorób jamy ustnej, dróg oddechowych i wielu innych. Dodatkowo odgrywać może znaczącą rolę w utrzymaniu właściwej higieny jamy ustnej.

Celem powyższej pracy jest ocena stanu zdrowia i higieny jamy ustnej palaczy oraz wpływu palenia tytoniu na zmiany stężeń wybranych parametrów stresu oksydacyjnego.

Badaniem objęto 199 osób, obu płci, które mieściły się w przedziale wiekowym 35–45 lat, a zgłosiły się celem leczenia do Kliniki Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Badanych podzielono na 4 grupy: kobiety palące ($n = 62$) i mężczyźni palący ($n = 37$) oraz kobiety niepalące ($n = 62$) i mężczyźni niepalący ($n = 37$). Podczas wizyty osoba badana wypełniła autorsko opracowaną ankietę, w której pytania dotyczyły statusu socjoekonomicznego, nawyków higienizacyjnych oraz stylu życia. Kolejno z pacjentem został przeprowadzony szczegółowy wywiad lekarski, badanie stomatologiczne zewnątrz i wewnątrzustne, podczas którego oznaczono wskaźniki higieny jamy ustnej takie jak: Plaque Index (PII) oraz Approximal Plaque Index (API) oraz pobrano materiał badawczy w postaci śliny mieszanej spoczynkowej przy użyciu probówek Sarstedt Salivette (około 2–3 ml śliny). Następnie, pobraną od pacjentów ślinę, transportowano do Laboratorium Badań Środowiskowych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, odwirowywano i mrożono. Po uzyskaniu odpowiedniej ilości prób wykonywano badania analityczno-biochemiczne oznaczając parametry stresu oksydacyjnego takie jak: stężenie białka, peroksydację li-

pidów (TBARS), ekwiwalenty troloksu (TEAC), produkty utleniania białek (AOPP) oraz toksykologiczne oznaczając kotyninę.

Zauważalny w badaniach oraz potwierdzony analizą statystyczną jest fakt, iż średnia wieku osób palących jest wyższa, czyli są to osoby starsze, w stosunku do osób nieobjętych nałogiem palenia. Zależność ta wystąpiła u obu płci. Dane uzyskane z kwestionariusza ankiety umożliwiły scharakteryzowanie grupy palaczy pod względem intensywności dziennego palenia tytoniu. W przypadku płci żeńskiej najczęściej deklarowaną odpowiedzią było wypalanie od 6–10 papierosów dziennie, co stanowi około pół paczki papierosów w ciągu doby. Palący mężczyźni przyznawali się do podwójnie zwiększonego dziennego wypalania wyrobów tytoniowych. Tendencja ta została również odnotowana w przypadku średniego stężenia kotyniny w ślinie palaczy, która dla kobiet wyniosła 233,87 ng/mL, a dla mężczyzn 403,68 ng/mL. Na podstawie analizy statystycznej wykazano, iż poziom kotyniny u kobiet palących jest statystycznie istotnie niższy, niż u mężczyzn palących.

Podczas badania klinicznego stanu błony jamy ustnej najczęściej obserwowaną zmianą u palaczy było przebarwienie melaninowe (34%), następnie leukoplakia (18%), stomatitis nicotinic (4%) oraz erytroleukoplakia (1%).

Podstawą oceny zróżnicowania stanu higieny jamy ustnej było przeanalizowanie i opracowanie zadeklarowanych przez Pacjentów odpowiedzi w ankiecie dotyczące częstotliwości szczotkowania zębów oraz korzystania z dodatkowych instrumentów higienizacyjnych, takich jak: irygator wodny, szczoteczka międzyzębowa, nić dentystyczna oraz płukanka stomatologiczna. Do regularnego szczotkowania zębów, przy pomocy szczoteczki do zębów i pasty, dwa lub więcej razy dziennie, przyznało się 55 kobiet niepalących oraz 54 kobiety palące i 29 mężczyzn niepalących oraz 29 mężczyzn palących. Rzadsze szczotkowanie jamy ustnej, czyli raz lub wcale, deklarowała zdecydowana mniejszość pacjentów ze wszystkich grup. W przypadku stosowania dodatkowych przyborów do higienizacji dominowała płukanka stomatologiczna oraz nić dentystyczna. Natomiast podczas analiz statystycznych, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy ich stosowaniem, a paleniem tytoniu.

Celem obiektywizacji oceny higieny jamy ustnej wyliczono dwa wskaźniki płytki nazębnej PII oraz API. Wartości średnie wskaźnika PII obliczone dla wszystkich grup wahały się w granicach 0,88, a 2,39, a API pomiędzy 53–85%. Uzyskane wyniki umożliwiły pogrupowanie pacjentów do 3 podgrup z dobrą, średnią oraz złą higieną jamy ustnej, w zależności od oznaczonego wskaźnika. Zdecydowana większość palaczy, znalazła

się w grupie ze złą higieną jamy ustnej i wyniosła odpowiednio dla PII 65% kobiet i 81% mężczyzn, a API 73% kobiet i 81% mężczyzn.

Analiza analityczno-biochemiczna parametrów stresu oksydacyjnego wykazała, iż średnie stężenia wyniosły: białko: palące kobiety 1,50 mg/mL, palący mężczyźni 1,66 mg/mL; TBARS: palące kobiety 9,59 nM/mg, palący mężczyźni 10,08 nM/mg; TEAC: palące kobiety 223,21 nM/mg, palący mężczyźni 194,00 nM/mg; AOPP palące kobiety 22,72 nM/mg, palący mężczyźni 23,04 nM/mg. Na podstawie analizy statystycznej wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy osobami niepalącymi, a palącymi u obu płci w przypadku białka, TBARS, AOPP. Podczas analizy TEAC różnic nie stwierdzono.

W pracy podjęto próbę porównania parametrów stresu oksydacyjnego, a stanu higieny jamy ustnej w zależności od badanego wskaźnika. W analizowanym materiale nie znaleziono statystycznie istotnych różnic we wszystkich ocenianych parametrach, a tylko w wybranych. Najczęściej i najbardziej wyraźne manifestowały statystycznie istotną różnicę parametry stresu oksydacyjnego takie AOPP oraz TBARS w przypadku złej higieny jamy ustnej według obu wskaźników.

Ocena stężenia kotyniny w korelacji z parametrami stresu oksydacyjnego jest bardzo interesująca, ponieważ nie znaleziono statystycznie istotnej zależności pomiędzy jej zawartością, a poziomem parametrów stresu oksydacyjnego.

Przeprowadzone badania kliniczne oraz laboratoryjne pozwalają na wysunięcie wniosków, iż pacjenci palący charakteryzują się gorszym stanem zdrowia oraz higieną jamy ustnej. Zaobserwowano, iż parametry stresu oksydacyjnego, zwłaszcza AOPP oraz TBARS, były znacznie podwyższone w grupie badanej przy współistniejącej nieprawidłowej higienie oraz złym stanem błony śluzowej jamy ustnej. Parametry te mogą być przydatne w ocenie narażenia na wystąpienie patologii błony śluzowej jamy ustnej u palaczy. Badanie stężeń kotyniny i parametrów stresu oksydacyjnego nie wykazały korelacji. Zakłada się, iż korelacja może zostać zaobserwowana w przypadku wykonania podobnych badań na zwiększonej populacji.

8. Summary

Modern medicine pays special attention to the role of reactive oxygen species in the functioning of the human body. Free radicals and other reactive particles are capable of damaging various cellular structures. An assumption can be made, that the presence of pro- and antioxidative state indicators is increased in cases of poor hygiene or in case of a coexisting tobacco addiction. Despite many social awareness-raising campaigns, tobacco — both smoked and chewed, is still the most common form of addiction. Smoking tobacco is a habit that can cause a number of diseases of the oral cavity, respiratory tract and many others. Additionally it may play a significant role in maintaining proper oral hygiene.

The aim of this work is the assessment of the state of health and oral cavity hygiene of smokers and the influence of smoking tobacco on the levels of selected oxidative stress parameters.

The study included 199 persons of both sexes, aged 35–45 years, who came to be treated at the Department of Dental Surgery of the Poznan University of Medical Sciences. The study subjects were divided into 4 groups: female smokers ($n = 62$) and male smokers ($n = 37$) as well as female non-smokers ($n = 62$) and male non-smokers ($n = 37$). During the appointment, each study subject was given a proprietary questionnaire which included questions about his or her socioeconomic status, hygiene habit and lifestyle. Subsequently the patient's detailed history was taken and an extra and intraoral examination was carried out, during which oral cavity hygiene indicators such as Plaque Index (PII) and Approximal Plaque Index (API) were determined. Lastly, a resting mixed saliva sample was taken from each patient using Sarsted Salivette collection tubes (approx. 2–3 ml of saliva) and transported to the Environmental Studies Lab of the Poznan University of Medical Sciences where it was centrifuged and frozen. After obtaining an appropriate amount of samples, analytical and biochemical tests were carried out to determine the parameters of oxidative stress such as: protein concentration, lipid peroxidation (TBARS), Trolox Equivalents (TEAC), advanced oxidation protein products (AOPP) and toxicological cotinine assay.

A fact that has been noticeable in studies and confirmed by statistical analysis is that the average age of smokers is higher i.e. these people are older when compared to non-smokers. This correlation occurred in both sexes. The data obtained from the questionnaire made it possible to characterize the groups of smokers according to intensity of daily tobacco smoking. In case of the female subjects, the most commonly given answer was 6–10 cigarettes smoked per day, which constitutes about half a pack of cigarettes per 24h. The male smokers admitted to smoking double the abovementioned amount of tobacco products a day. This trend was also recorded in the results of average cotinine level in the smokers saliva, which for women was 233.87 ng/mL and for men 403.68 mg/mL. Based on a statistical analysis it has been proven that the cotinine level in female smokers is statistically significantly lower than in male smokers.

During a clinical examination of the state of the oral mucosa, the most commonly observed lesion in smokers was melanin discoloration (34%), followed by leukoplakia (18%), stomatitis nicotinic (4%) and erythroleukoplakia (1%).

The basis for the assessment of the differentiation in the condition of oral cavity hygiene was the analysis and elaboration of the answers given by the patients in the questionnaire concerning the frequency of tooth brushing and the use of additional cleaning instruments, such as oral irrigators, interdental brushes, dental floss and mouthwash.

55 non-smoking women, 54 smoking women, 29 non-smoking men and 29 smoking men admitted to regularly brushing their teeth with a toothbrush and toothpaste twice or more a day. A significant minority of patients from all groups declared less frequent oral cavity brushing, i.e. once or not at all. Use of mouthwash and dental floss dominated among cleaning instruments. However, statistical analysis did not reveal statistically significant differences between their use and smoking tobacco.

In order to objectivize the oral cavity assessment, two plaque indices — PII and API — were calculated. The average value of the PII index calculated for all groups oscillated between 0.88 and 2.39, and the API between 53% and 85%. The results obtained made it possible to divide patients into three subgroups with good, medium and poor oral hygiene, depending on the index. The vast majority of smokers found themselves in the group with poor oral hygiene, amounting to 65% of women and 81% of men for PII and 73% of women and 81% of men for API.

Analytical and biochemical analysis of oxidative stress parameters showed that the average levels were: Proteins: female smokers 1.50 mg/mL, male smokers 1.66 mg/mL; TBARS: female smokers 9.59 nM/mg, male smokers 10.08 nM/mg; TEAC: female smo-

kers 223.21 nM/mg, male smokers 194.00 nM/mg; AOPP female smokers 22.72 nM/mg, male smokers 23.04 nM/mg. Statistical analysis showed statistically significant differences between non-smokers and smokers of both sexes in the case of protein, TBARS, AOPP. No difference was observed during TEAC analysis.

The work presents an attempt to compare the parameters of oxidative stress and the state of oral hygiene depending on the index studied. In the analyzed material no statistically significant differences were found in all evaluated parameters, but only in selected ones. In the case of poor oral hygiene, the most frequently and clearly visible differences in oxidative stress parameters, such as AOPP and TBARS, were observed according to both indicators.

The evaluation of cotinine levels in correlation with oxidative stress parameters is very interesting, as no statistically significant correlation between its content and the level of oxidative stress parameters was found.

Clinical and laboratory studies allow to draw the conclusion that patients who are smokers are characterized by worse state of health and oral hygiene. It was observed that the parameters of oxidative stress, especially AOPP and TBARS, were significantly increased in the study group with abnormal hygiene and poor condition of the oral cavity mucosa. These parameters may be useful in assessing exposure to oral mucosa pathology in smokers. The study of cotinine levels and oxidative stress parameters did not show any correlation. It is expected that such a correlation can be observed when similar studies are performed in a larger population.

9. Piśmiennictwo

1. Abusleme L., Dupuy AK., Dutzan N., Silva N., Burleson JA., et al.: The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013; 7: 1016–1025.
2. Adami GR., Adami AJ.: Looking in the Mouth for Noninvasive Gene Expression-Based Methods to Detect Oral, Oropharyngeal, and Systemic Cancer. *International Scholarly Research Network*, 2012; Article ID 931301: 1–6.
3. Agnihotri R., Gaur S.: Implications of tobacco smoking on the oral health of older adults. *Geriatr Gerontol Int.* 2014; 14: 526–540.
4. Ah MK., Johnson GK., Kaldahl WB., Patil KD.: The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 91–97.
5. Al-Delaimy WK., Crane J., Woodward A.: Is the hair nicotine level a more accurate biomarker of environmental tobacco smoke exposure than urine cotinine. *Journal of Epidemiology and Community Health.* 2002; 56: 66–71.
6. Alvarez Gómez GJ., Alvarez Martínez E., Jiménez Gómez R., Mosquera Silva Y., Gaviria Núñez AM., et al.: Reverse smokers's and changes in oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008; 13: 1–8.
7. Ayala A., Munoz MF., Arguelles S.: Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4- hydroxy-2- nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014: Article ID 360438.
8. Balharry D., Sexton K., Berube KA., et al.: An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: Nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology.* 2008; 244: 66–67.
9. Bánóczy J., Gintner Z., Dombi C.: Tobacco use and oral leukoplakia. *J Dent Educ.* 2001; 65: 322–327.
10. Baranowska K., Rodziewicz A.: Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych. *Kosmos.* 2008; 57: 29–38.
11. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu — wolne rodniki w przyrodzie.* PWN. Warszawa, 2003.
12. Baskol M., Baskol G., Koc D., Ozbakir O., Yucesoy M.: Advanced Oxidation Protein Products. A Novel Marker of Oxidative Stress in Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Gastroenterology.* 2008; 42: 687–691.
13. Baum BJ., Dai Y., Hiramatsu Y., et al.: Signaling mechanisms that regulate saliva formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993; 4: 379–384.

14. Behura SS., Masthan MK., Narayanasamy AB.: Oral mucosal lesions associated with smokers and chewers — a case-control study in Chennai population. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9: 17–22.
15. Benowitz NL., Jacob III P., Fong I., Gupta S.: Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1994; 268: 296–303.
16. Benowitz NL., Pomerleau OF., Pomerleau CS., Jacob III P.: Nicotine metabolite ratio as a predictor of cigarette consumption. *Nicotine and Tobacco Research.* 2003; 5: 621–624.
17. Berkowitz RJ.: Mutans streptococci: acquisition and transmission. *Pediatr. Dent.* 2006; 28: 106–109.
18. Bharath TS., Kumar NG., Nagaraja A., Saraswathi TR., Babu GS., et al.: Palatal changes of reverse smokers in a rural coastal Andhra population with review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2015; 19: 182–187.
19. Bienenstock J., Befus AK., McDermott M.: Mucosal immunity. *Monogr. Allergy.* 1980; 16: 1–18.
20. Bigda J., Dobrzańska-Paprocka Z.: Przeciwciała przeciwko białku p53 (Ab anty-p53). *Współczesna Onkologia* 2003; 7: 460–465.
21. Brownson RC., Eriksen MP., Davis RM., Warner KE.: Environmental tobacco smoke: health effects and policies to reduce exposure. *Annu Rev Public Health.* 1997; 18: 163–85.
22. Cabiscol E., Tamarit J., Ros J.: Protein carbonylation: proteomics, specificity and relevance to aging. *Mass Spectrom.* 2014; 33: 21–48.
23. Cafiero C., Matarasso S.: Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: ‘the 5Ps age’ has already started. *EPMA Journal.* 2013; 4: 1–29.
24. Cashman JR., Zhang J.: Interindividual differences of human flavincontaining monooxygenase 3: genetic polymorphisms and functional variation. *Drug Metabolism and Disposition.* 2002; 30: 1043–1052.
25. Castle D.: Cell biology of salivary protein secretion. W: Dobrosielski-Vergona K (red.). *Biology of the salivary glands.* Boca Raton, FL, CRC Press Inc. 1993; 81–104.
26. Celec P., Hodosya J., Celecová V., Vodrážka J., Červenka T., et al: Salivary thiobarbituric acid reacting substances and malondialdehyde — Their relationship to reported smoking and to parodontal status described by the papillary bleeding index. *Disease Markers.* 2005; 21: 133–137.
27. Chandra P., Govinadraju P.: Prevalence of oral mucosal lesions among tobacco users. *Oral Health Prev. Dent.* 2012; 10: 149–153.
28. Cone EJ., Clarke J., Tsanaclis L.: Prevalence and disposition of drugs of abuse and opioid treatment drugs in oral fluid. *J. Anal. Toxicol.* 2007; 8: 424 — 433.
29. Cross CE., Halliwell B., Borish ET., Pryor WA., Ames BN., et al.: Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, 1987, 107, 527–545.
30. Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antimikrobiologiczne. *Biotechnologia.* 2007; 1: 40–52.

31. Dalle-Donne I, Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003; 329: 23–38.
32. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., et al: Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52; 601–623.
33. Dannewitz B., Zeidler A., Hüsing J., Saure D., Pfefferle T. et al: Loss of molars in periodontally treated patients: results 10 years and more after active periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2016; 43: 53–62.
34. De Almeida Pdel V., Grégio AM., Machado MA., de Lima AA., Azevedo Lr.: Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2008; 9: 72–80.
35. Dempsey D., Tutka P., Jacob III P., Allen F., Schoedel K., et al.: Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2004; 76: 64–72.
36. Dowd F. J.: Saliva and dental caries. *Dent. Clin. North AM*. 1999; 43: 579–97.
37. Edgar WM.: Saliva its secretion, composition and functions. *Br. Dent. J.* 1992; 72: 305–312.
38. Edman K., Öhrn K., Nordström B., Holmlund A., Hell-berg D.: 2015 Trends over 30 years in the prevalence and severity of alveolar bone loss and the influence of smoking and socio-economic factors — based on epidemiological surveys in Sweden 1983–2013. *J Dent Hyg*. 2015; 13: 283–291.
39. Eick S., Glockmann E., Brandl B., Pfister W.: Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J. Oral Rehabil*. 2004; 31: 278–285.
40. Eick S., Radakovic S., Pfister W., Nietzsche S., Sculean A.: Efficacy of taurolidine against periodontopathic species — an in vitro study. *Clin. Oral Investig*. 2012; 16: 735–744.
41. El-Medany OM., El-Din A., Wahab KS., Abu Shady EA., et al: Chronic liver disease and hepatitis C virus in Egyptian patients. *Hepatogastroenterology*. 1992; 46: 1895–1903.
42. Erel O.: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004; 35: 277–285.
43. Fejerskov O., Kidd E.: Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne. Wydanie I polskie pod red. Urszuli Kaczmarek. Urban & Partner. Wrocław, 2006.
44. Florek E., Adamek AM., Adamek R., Anholcer A: Ocena wpływu biernego narażenia kobiet na dym tytoniowy w czasie ciąży na masę urodzeniową i parametry życiowe noworodka. *Gin. Prakt.* 2003; 11: 24–27.
45. Florek E., Marszałek A.: An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Human Exp Toxicol*. 1999; 18: 272–278.
46. Florek E., Piekoszewski W., Kulza M., Szindzikaszwili T., Gomółka E., et al.: Interaction between Tobacco smoke and alcohol in animal models. *Pharmacological Reports*, 2008; 60: 985–990.
47. Florek E.: Analiza naukowych dowodów wpływu wymuszonego „biernego palenia” na zdrowie. Instytut Onkologii. Warszawa, 2000.

48. Florek E.: Zdrowotne skutki narażenia kobiet na dym tytoniowy w środowisku. Katedra i Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna. Poznań, 2000: 11–14.
49. Fontes PC., Corrêa GH., Issa JC., Brandão AA., Almeida JD.: Comparison of exfoliative pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and non-smokers. *Head and Neck Pathol.* 2008; 2: 157–162.
50. Freitas MD., Blanco-Carrión A., Gándara-Vila P., Antúnez-López J., García-García A., et al.: Clinicopathologic aspects of oral leukoplakia in smokers and nonsmokers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 199–203.
51. Friedman MG.: Radioimmunoassay for the detection of virus-specific IgA antibodies in saliva. *J Immunol. Meth.* 1982; 54: 203–211.
52. Glantz SA., Palmrey WW.: Passive smoking and heart disease. *Epidemiology, physiology and biochemistry. Circulation.* 1991; 83: 1–12.
53. Greabu M., Battino M., Mohora M., Totan A., Didilescu A., et al.: Saliva — a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *Journal of Medicine and Life*, 2009, 2, 124–132.
54. Gupta PC.: Control of tobacco-related cancers and other diseases: proceedings of an International Symposium, January 15–19. ISBN 01–95629–61–2. Bombay, 1990.
55. Gurvits GE., Tan A.: Black hairy tongue syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 10845–10850.
56. Guzik Ł., Kamysz E.: Kserostomia- więcej niż suchość w jamie ustnej. *Farm Pol.* 2009; 65; 6: 411–414.
57. Haeckel.: Saliva, an alternative specimen in clinical laboratory. *JIFCC.* 1990; 2: 208–217.
58. Halliwell B., Gutteridge JMC.: *Free Radicals In Biology and Medicine.* 2nd Edition Clarendon Press Oxford, 1989.
59. He XS., Shi WY.: Oral microbiology: past, present and future. *Int. J. Oral Sci.* 2009; 1: 47–58.
60. Heikkinen AM., Meurman JH., Sorsa T.: Tobacco, snuff and oral health. *Duodecim.* 2015; 131: 1975–1980.
61. Hoffmann D., Wynder E.: Aktives und passives Rauchen. *Lehrbuch der Toxikologie.* 1994: 589–605.
62. Homman N: Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 663–668.
63. Hukkanen J., Jacob III P., Benowitz NL.: Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacological Review.* 2005; 57: 79–115.
64. Humphrey SP., Williamson RT.: A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* 2001; 85: 162–169.
65. Husain K., Scott BR., Reddy SK., Somani SM.: Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol.* 2001; 25: 89–97.
66. Jańczuk Z.: *Stomatologia zachowawcza — Zarys kliniczny. Podręcznik dla studentów stomatologii.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa, 2007.

67. Jauniaux E., Gulbis B., Acharya G., Thiry P., Rodeck Ch.: Maternal Tobacco Exposure and Cotinine Levels in Fetal Fluid in the First Half of Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 1999; 93: 25–29.
68. Jaworski A., Serwecińska L., Stączek P.: Quorum sensing — komunikowanie się komórek w populacjach bakterii przy udziale chemicznych cząstek sygnałowych. *Postępy Biol. Kom.* 2005; 32: 231–256.
69. Jussieu A.L.: Mapacho (*Nicotiana tobaccum*) Solanaceae. Analysis, preparation and use of *Nicotiana tobaccum* from historical. *Ethno & Economic Botany*. 2001; 2: 14–18.
70. Kaczmarek U., Malepszy A., Konopka T., Nowak- Malinowska H., Kozłowski Z.: Wpływ palenia tytoniu na stan przyzębia. *Mag Stomatol.* 1995; 11: 27–31.
71. Kaleta D., Makowiec-Dabrowska T., Polańska K., Dziankowska-Zaborszczyk E., Drygas W.: Palenie tytoniu i inne negatywne zachowania wśród osób czynnych zawodowo. *Med. Pr.* 2009; 60; 1: 7–14.
72. Kaleta D., Polańska K., Jagier A.: Smoking predictors among economically active individuals. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*. 2007; 20; 4: 357–363.
73. Kaufman E., Lamster IB.: The diagnostic applications of saliva — a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002; 2: 197–212.
74. Kelly G.: The interaction of cigarette smoking and antioxidants. Part I: diet and carotenoids — Smoking & Carotenoids. *Alternative Medicine Review*, 2002.
75. Kintz P., Ludes B., Mangin P.: Evaluation of nicotine and cotinine in human hair. *Journal of Forensic Sciences*. 1992; 37: 72–76.
76. Kistula U., et al.: Longitudinal analysis of human salivary immunoglobulins, non-immune antimicrobial agents and microflora after tonsillectomy. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 1996, 80: 110–115.
77. Klimek J., Hellwig E.: Etiologia i diagnostyka próchnicy. W: Heidemann D (red) *Kariologia. Próchnica zębów. Leczenia, wypełnienia*. Urban & Partener. Wrocław, 2001: 3–42.
78. Kochańska B., Borowska-Afeltowicz E.: Stężenie fosforanów nieorganicznych w ślinie spożywkowej mieszanej, a podatność na próchnicę zębów. *Czas Stomat.* 1996; 49: 665–671.
79. Kolenbrander P.E., Andersen R.N., Blehert D.S., Eglan P.G., Foster J.S., Palmer R.J. Jr.: Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002; 66: 486–505.
80. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu — warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochr. Środ.* 2011; 33: 3–14.
81. Kowalski J., Górka R., Gregorek H., Madaliński K.: Wpływ wybranych czynników ryzyka na wybrane parametry kliniczne i immunologiczne osób z chorobą z przyzębia. *Stom. Współcz.* 1999; 5: 27–30.
82. Kulza M., Woźniak A., Seńczuk-Przybyłowska M., Czarnywojtek A., Kurhańska-Flisykowska A., et al: Oznaczanie kotyniny w ślinie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową. *Przegląd Lekarski*. 2012; 69: 837–840.

83. Kuźmicka P., Karakiewicz B., Rotter I.: Czym różni się palenie tytoniu u kobiet i u mężczyzn?- implikacje do profilaktyki. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2012; 93: 460–465.
84. Lange DE., Plagmann HC., Eenboom A., Promesberger A.: Klinische Bewertungsverfahren zur Objektivierung der Mundhygiene. *Dtsch. Zahnarztl.* 1977; 32: 44–47.
85. Lewiński A., Sewerynek E.: Zmiana liczby wolnych rodników. *Przew. Lek.* 2000; 9: 99–104.
86. Li Y.H., Hanna MN., Svensäter G., Ellen RP, Cvitkovitch DG.: Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 6875–6884.
87. Lima JS., Pinto Ddos S. Jr., Sousa SO., Corrêa L.: Oral leukoplakia manifests differently in smokers and non-smokers. *Braz Oral Res.* 2012; 26: 543–549.
88. Loeb MB., Riddell RH., James C., et al.: Evaluation of salivary antibodies to detect infection with *Helicobacter pylori*. *Can. J. Gastroenterol.* 1997; 11: 437– 440.
89. Lowry OH., Rosebrought NJ., Farr AL., Randall RJ.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265–275.
90. Luck W., Hansen R., Steldinger R., Nau H.: Nicotine and cotinine — Two pharmacologically active substances as parameters for the strain on fetuses and babies of mothers who smoke. *Journal of Perinatal Medicine.* 1982; 10: 107–108.
91. Maciąg W., Bachanek T.: Wpływ alkoholu i nikotyny na stan zdrowia jamy ustnej. *Mag Stomatol.* 2006; 11: 28–29.
92. Majewski J., Bernat K., Jarosz M.: Wpływ palenia tytoniu na błonę śluzową jamy ustnej ze szczególnym uwzględnieniem leukoplakii- na podstawie piśmiennictwa. *Aspekty Zdrowia i Choroby.* 2017; 2; 1: 19–25.
93. Malara P., Drugacz J., Wituła A., et al.: Wpływ palenia tytoniu na występowanie zmian przednowotworowych i nowotworów jamy ustnej- przegląd piśmiennictwa i doświadczenia własne. *Przegl. Lek.* 2005, 62, 1159.
94. Malara P., Drugacz J., Wituła A.: Palenie papierosów wśród pacjentów z nowotworami jamy ustnej i szczęk. *Przegl. Lek.* 2004, 61, 1040.
95. Mańczuk M., Zatoński W.: Palenie tytoniu w Polsce na tle krajów Unii Europejskiej. *Zdrowie Publiczne i Zarządzanie.* 2009; 7: 20–28.
96. Mandel ID., Wotman S.: The salivary secretions in health and disease. *Oral. Sci. Rev.* 1995; 8: 25–47.
97. Mandel ID.: Salivary diagnosis: more than a lick and a promise. *J. Am. Dent. Assoc.* 1993; 124: 85–87.
98. Mandel ID.: The diagnostic uses of saliva. *J. Oral Pathol. Med.* 1990; 19: 119–125.
99. Marsh PD.: Dental plaque as a biofilm and a microbial community — implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006; 6 (Suppl. 1): S14.
100. Marsh PD.: Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Res.* 1994; 8: 263–271.

101. Marszałek A.: Choroby tytoniowe — rola lekarza (patologa) w działaniach diagnostycznych i prewencyjnych. Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytet Mikołaja Kopernika. Bydgoszcz, 2007.
102. Martínez PM., Torres AR., Ortiz de Lejarazu R., et al.: Human immunodeficiency virus antibody testing by enzyme-linked fluorescent and western blot assays using serum, gingivalcrevicular transudate, and urine samples. 1999; 37; 4: 1100–1106.
103. Nagler RM.: Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis. *Oral Oncology*. 2009; 45: 1006–1010.
104. Nauntofte B., Tenovuo JO., Lagerlöf F.: Wydzielanie i skład śliny. W: Fejerskov O, Kidd E (red.), Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne. Urban & Partner. Wrocław, 2006: 7–28.
105. Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S., Feron G.: Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Archives of Oral Biology*. 2012; 57: 556–566.
106. Nielsen HM, Rassing MR: Nicotine permeability across the buccal TR146 cell culture model and porcine buccal mucosa in vitro: effect of pH and concentration. *Eur J Pharm Sci*. 2002; 16: 151–157.
107. Nieuw Amerongen AV., Veerman ECI., Vissink A.: Saliva: properties and functions. *Salivary Diagnostics*. red. Wong T. D., Wiley-Blackwell. 2008, 27–26.
108. Ochnio JJ., Scheifele DW., Ho M., Mitchell LA.: New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine- and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *J. Clin. Microbiol*. 1997; 35: 98– 101.
109. Odell EW., Sarra R., Foxworthy M., Chapple DS., Evans RW.: Bactericidal activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. *FEBS Lett*. 1996; 382: 175–178.
110. Palmieri B., Sblendorio V.: Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2007; 11: 309–342.
111. Palmieri B., Sblendorio V.: Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2007; 11: 383–399.
112. Paul-Stalmaszczyk M.: Rola śliny w procesie próchnicowym. W: Piątkowska D (red.), Zarys kariologii. Wyd. Medyczne. Warszawa, 2002: 83–92.
113. Peto R., Lopez AD., Boreham J., Thun M.: Mortality from smoking in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet*. 1992; 23: 1268–1278.
114. Piekoszewski W., Florek E.: Markery narażenia na dym tytoniowy. Katedra i Zakład Toksykologii Akademia Medyczna. Poznań, 2001; 1: 1–77.
115. Pol J., Buczkowska-Radlińska J., Bińczyk-Kuleta A., Trusewicz M.: Mucyny śliny ludzkiej — ich rola i znaczenie. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie*. 2007; 53: 87–91.
116. Probst R., Grevers G., Iro H.: *Basic Otorhinolaryngology: A Step-by-Step Learning Guide*. Stuttgart, 2006.

117. Rad M., Kakoie S., Niliye Brojeni F., Pourdamghan N.: Effect of long-term smoking on whole-mouth salivary flow rate and oral health. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2010; 4: 110–114.
118. Ramchand R., Ialongo N., Chilcoat H.: The effect of working for pay on adolescent Tobacco Use. *Am J Public Health*. 2007; 97: 2056–2062.
119. Ramlau R., Didkowska J., Wojciechowska U., Tarkowski W.: Tabacco smoking in Wilekopolka towards the end of 20th century. *Pneumonol Alergol Pol*. 2005; 73: 128–134.
120. Ramsay DS., Bedersky MI., Lewis M.: Effect of Prenatal Alcohol and Cigarette Exposure on Two-and-Six-Month-Old Infants' Adrenocortical Reactivity to Stress, *J Pediatr. Psychol*. 1996; 21: 833–840.
121. Reibel J.: Tobacco or oral health. *Bulletin of the World Health Organization* 2005; 83: 643–644.
122. Reichart PA.: Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin. Oral Investig*. 2001, 5, 207.
123. Roberts AP, Mullany P.: Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2010; 8: 1441–1450.
124. Rudziński R., Banach J.: Wpływ dymu tytoniowego na przebieg i stopień zaawansowania procesu zapalnego w tkankach przyzębia. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej. Szczecin*, 2011; 57: 88–95.
125. Rudziński R., Banach J.: Wpływ nawyku palenia tytoniu na stan przyzębia oraz toksyczne oddziaływanie nikotyny i jej metabolitów na tkanki przyzębia. *Czas Stomatol*. 2008; 61: 635–643.
126. Samochowiec J., Rogoziński D., Hajduk A., Skrzypińska A., Arentowicz G.: Diagnostyka, mechanizm uzależnienia i metody leczenia uzależnienia od nikotyny. *Katedra i Klinika Psychiatrii Pomorskiej Akademii Medycznej. Szczecin*, 2001.
127. Sculley DV., Langley-Evans SC.: Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin. Sci*. 2003; 105: 167–172.
128. Scully C.: HIV topic update: salivary testing for antibodies. *Oral Dis*. 1997; 3: 212–215.
129. Seaton MJ., Vesell ES., Luo H. et al.: Identification of radiolabeled metabolites of nicotine in rat bile. Synthesis of S(-)-nicotine N-glucuronide and direct separation of nicotine-derived conjugates using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1993; 621: 49–53.
130. Segal A., Wong DT.: Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *European Journal of Dental Education*. 2008; 12: 22–29.
131. Selmezi L.: Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radic*. 2011; 45: 1115–1123.
132. Seńczuk W.: Toksykologia współczesna. PZWL. Warszawa, 2005.

133. Shacter E.: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab.* 2000; 32: 307–326.
134. Shpitzer T., Hamzany Y., Bahar G., Feinmesser R., Savulescu D.: Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *British Journal of Cancer.* 2009; 101: 1194–1198.
135. Silness J., Loe H.: Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta. Odontol. Scand.* 1964; 22:121–35.
136. Smeets R., Henningsen A., Jung O., Heiland M., Hammacher C., et al.: Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis- a review. *Head Face Med.* 2014; 10: Article ID 34.
137. Snow JB., Wackym PA., Ballenger JJ.: *Ballenger's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery.* 17th. Shelton, Conn.; Hamilton, Ont.; London: People's Medical Pub. House/B C Decker; 2009.
138. Sreebny LM.: Salivary flow in health and disease. *Compend. Suppl.* 1989; 13: 461–469.
139. Sreedevi M., Ramesh A., Dwarakanath C.: Periodontal status in smokers and nonsmoker: a clinical, microbiological and histopathological study. *Inter J Dent.* 2012; article ID 571590.
140. Szczęch B., Dyzmann-Sroka A., Kubiak A., Trojanowski M., Malicki J.: Analiza świadomości zdrowotnych skutków palenia tytoniu wśród wybranych grup społecznych. *Probl Hig Epidemiol.* 2014; 95: 871–879.
141. Szewczyk EM., Dudkiewicz B., Lisiecki P., Różalska M., Sobiś- Glinkowska M., et al.: *Diagnostyka bakteriologiczna,* Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2007.
142. Tadeusiak W., et al: Możliwość zastąpienia surowicy śliną w monitorowaniu leczenia węglanem litowym. *Pol. Tyg. Lek.* 1992, 47: 1029–1030.
143. Thieme T., Yoshihara P., Piacentini S., et al.: Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 1076– 1079.
144. Van De Water T., Staecker H.: *Basic Science Review for Otolaryngology.* New York. Thieme, 2006.
145. Veerman ECI., Vissink A., Wong DT, Nieuw Amerongen AV.: Processing and storage of saliva samples. *Salivary Diagnostics.* red. Wong T. D., Wiley-Blackwell. 2008; 5: 69–76.
146. Viala A., Tabac-Tabagisme W.: *Éléments de toxicology.* Tec. Doc. Lavisier, Editions 2009.
147. von Weymarn L., Retzlaff C., Murphy S.: CYP2A6 and CYP2A13- catalyzed metabolism of the nicotine ion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 342: 307–315.
148. Walter A., Starzyńska A.: Diagnostyka stanów przedrakowych błony śluzowej jamy ustnej. *Forum Medycyny Rodzinnej.* 2016; 10: 19–24.
149. Warnakulasuriya S., Sutherland G., Scully C.: Tobacco, oral cancer and the treating of dependence. *Oral Oncol.* 2005; 41: 244–260.
150. Wituła A., Drugacz J., Malara P.: Wpływ palenia tytoniu na stan uzębienia i występowanie chorób przyzębia wśród pacjentów Kliniki Chirurgii Szczękowo-Twarzowej ŚAM w Katowicach. *Przeł Lek* 2005; 62; 10:1001–1003.

151. Wojcińska M., Gawron–Gzella A., Dudek M., Matławska I.: Gatunki z rodzaju *Nicotiana* L. — rośliny ozdobne, lecznicze czy trujące. *Kobieta i tytoń. Aktualne badania w Polsce*, 2002: 275 — 285.
152. Wojnicz D.: Wpływ stężeń podprogowych antybiotyków na zdolności adhezyjne bakterii. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2007; 16: 141–148.
153. World Health Organization: Stan zagrożenia epidemią palenia tytoniu w Polsce. www.euro.who.int/pubrequest. 2009.
154. Yildiz D.: Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol.* 2004; 43: 619–632.
155. Zatoński W., Przewoźniak K., Sulkowska U., Mańczak M., Gumkowski J.: Palenie tytoniu w populacji mężczyzn i kobiet w Polsce w latach 1974–2004. *Zdrowie Publiczne i Zarządzanie*. 2009; 7: 4–11.
156. Zatoński W., Tyczyński J.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 1992 roku. Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie. Warszawa, 1995.
157. Zieliński J.: Obciążenia wynikające z palenia tytoniu. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2008; 76: 170–173.

10. Spis tabel i rycin

10.1. Tabele

Tabela 1. Podział substancji toksycznych znajdujących się w dymie tytoniowym. Źródło: IARC Monographs vol. 83, 2004	21
Tabela 2. Właściwości fizyko-chemiczne strumienia dymu głównego i bocznego dla papierosów bez filtra. Źródło: Florek i Piekoszewski 2006	22
Tabela 3. Farmakokinetyczne parametry nikotyny. Źródło: Benowitz and Jacob, 1982; Benowitz, 1983.	27
Tabela 4. Kancerogeny znajdujące się w dymie tytoniowym. Źródło: Florek i Piekoszewski 2007	31
Tabela 5. Funkcje niektórych składników śliny. Źródło: Dowd, 1999; Jańczuk, 2007]	43
Tabela 6. Narzędzia badawcze potrzebne do oznaczenia stężenia białek w ślinie	54
Tabela 7. Narzędzia badawcze potrzebne do oznaczenia peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w ślinie	55
Tabela 8. Narzędzia badawcze potrzebne do wyznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekwiwalentów troloksu (TEAC) w ślinie	56
Tabela 9. Metoda przygotowania rozcieńczeń do wykonania krzywej wzorcowej TEAC	56
Tabela 10. Narzędzia badawcze potrzebne do wyznaczenia produktów utleniania białek AOPP w ślinie	57
Tabela 11. Metoda przygotowania rozcieńczeń do wykonania krzywej wzorcowej AOPP.	58
Tabela 12. Narzędzia badawcze potrzebne ekstrakcji kotyniny do fazy stałej (SPE)	59
Tabela 13. Narzędzia badawcze potrzebne do analizy ilościowej kotyniny w ślinie z wykorzystaniem metody HPLC.	60
Tabela 14. Liczbowy rozkład pacjentów w poszczególnych grupach	64
Tabela 15. Ilościowy rozkład wieku pacjentów w poszczególnych grupach	65
Tabela 16. Charakterystyka ilościowa poszczególnych grup pod względem zamieszkania	66
Tabela 17. Przedstawienie liczbowe rodzaju wykonywanej pracy przez badanych pacjentów	66
Tabela 18. Charakterystyka ilościowa wykształcenia pacjentów w poszczególnych grupach	68
Tabela 20. Wartości średnie dla kotyniny w ślinie u kobiet i mężczyzn palących	69
Tabela 19. Ilość papierosów wypalanych w ciągu doby	69
Tabela 21. Występowanie nieprawidłowości i chorób błony śluzowej u osób palących tytoń	70

Tabela 22. Dobowa częstotliwość szczotkowania zębów przez pacjentów	71
Tabela 23. Deklarowane stosowanie nici dentystycznej przez pacjentów	72
Tabela 24. Deklarowane stosowanie szczoteczki międzyzębowej przez pacjentów.	73
Tabela 25. Deklarowane stosowanie irygatora przez pacjentów.	74
Tabela 26. Deklarowane stosowanie płukanki stomatologicznej przez pacjentów	75
Tabela 27. Statystyka opisowa wskaźnika płytki nazębnej PII dla czterech badanych grup .	76
Tabela 28. Klasyfikacja pacjentów w zależności od jakości higieny jamy ustnej	79
Tabela 29. Statystyka opisowa wskaźnika płytki nazębnej API dla czterech badanych grup .	80
Tabela 30. Klasyfikacja pacjentów w zależności od jakości higieny jamy ustnej	83
Tabela 31. Statystyka opisowa parametru stresu oksydacyjnego (białka) dla czterech badanych grup.	84
Tabela 32. Analiza statystyczna porównania grup w odniesieniu do stężenia białka (test Manna-Whitneya)	84
Tabela 33. Statystyka opisowa parametru stresu oksydacyjnego (TBARS) dla czterech badanych grup.	85
Tabela 34. Analiza statystyczna porównania grup w odniesieniu do TBARS (test Man- na-Whitneya)	86
Tabela 35. Statystyka opisowa parametru stresu oksydacyjnego (TEAC) dla czterech badanych grup.	87
Tabela 36. Analiza statystyczna porównania grup w odniesieniu do TEAC (test Manna-Whitneya)	87
Tabela 37. Statystyka opisowa parametru stresu oksydacyjnego (AOPP) dla czterech badanych grup.	88
Tabela 38. Analiza statystyczna porównania grup w odniesieniu do AOPP (test Man- na-Whitneya)	88
Tabela 39. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla kobiet niepalących (PII).	89
Tabela 40. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla niepalących mężczyzn (PII)	92
Tabela 41. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla kobiet palących (PII)	94
Tabela 42. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla mężczyzn palących (PII)	97
Tabela 43. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla kobiet niepalących (API)	99
Tabela 44. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla mężczyzn niepalących (API).	102
Tabela 45. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla kobiet palących (API)	104

Tabela 46. Stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego względem higieny jamy ustnej dla mężczyzn palących (API)	107
Tabela 47. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności dobrej higieny jamy ustnej (PII)	110
Tabela 48. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów z dobrą higieną jamy ustnej (PII).	110
Tabela 49. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności średniej higieny jamy ustnej (PII)	113
Tabela 50. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów z średnią higieną jamy ustnej (PII)	113
Tabela 51. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności złej higieny jamy ustnej (PII)	116
Tabela 52. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów ze złą higieną jamy ustnej (PII)	116
Tabela 53. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności dobrej higieny jamy ustnej (API)	119
Tabela 54. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności średniej higieny jamy ustnej (API).	120
Tabela 55. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów z średnią higieną jamy ustnej (API).	120
Tabela 56. Statystyka opisowa parametrów stresu oksydacyjnego badanych grup w przypadku obecności złej higieny jamy ustnej (API).	123
Tabela 57. Analiza statystyczna porównania grup oraz parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów ze złą higieną jamy ustnej (API)	123
Tabela 58. Korelacja pomiędzy stężeniami parametrów stresu oksydacyjnego w ślinie w stosunku do stężenia kotyniny u kobiet palących	126
Tabela 59. Korelacja pomiędzy stężeniami parametrów stresu oksydacyjnego w ślinie w stosunku do stężenia kotyniny u kobiet palących	126

10.2. Ryciny

Rycina 1. Schematyczna budowa jamy ustnej. Źródło: http://www.anatomy.cba.pl	14
Rycina 2. Model czasoprzestrzenny tworzenia się płytki nazębnej. Źródło: Eick et al., 2012	16
Rycina 3. Alkaloidy zawarte w liściach nikotyny. Źródło: Benowitz et al., 2005	20
Rycina 4. Szlak metaboliczny nikotyny. Źródło: Hukkanen et al 2005	25
Rycina 5. Procentowy udział eliminacji metabolitów nikotyny w wydalaniu przyjętej dawki. Źródło: Florek et al 2008	26

Rycina 6. Schemat saliwonu, który wytwarza wydzielinę pierwotną, skład której zmienia się podczas przepływu przez układ cewek. W cewkach tworzy się ślina ostateczna, wydalana do jamy ustnej. Źródło: Cyprysiak et al., 2001	41
Rycina 7. Zewnątrz- i wewnątrzkomórkowa droga transferu składników osocza do przedziałów wydzielniczych np. śliny. Źródło: Cyprysiak et al., 2001	45
Rycina 8. Probówka do pobierania śliny typu Sarstedt Salivette. Źródło: https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/Englisch/156_Salivette_GB_0813.pdf	52
Rycina 9. Schemat pobierania materiału badawczego przy użyciu probówek typu Sarstedt Salivette. Źródło: https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/Englisch/156_Salivette_GB_0813.pdf	53
Rycina 10. Wykres wzorcowej — TEAC.	57
Rycina 11. Wykres krzywej wzorcowej — AOPP	58
Rycina 12. Krzywa kalibracyjna kotyniny.	61
Rycina 13. Chromatogram dla substancji wzorcowych: norefedryna (10 ug/mL) — czas retencji 3,010 min; kotynina (1 ug/mL) — czas retencji 4,916 min	62
Rycina 14. Chromatogram próbki śliny pochodzącej od pacjenta.	62
Rycina 15. Procentowa analiza poszczególnych grup pacjentów	64
Rycina 16. Wykres ramkowy przedstawiający średnią wieku dla poszczególnych grup	65
Rycina 17. Procentowe przedstawienie miejsca zamieszkania w zależności od statusu palenia oraz płci	67
Rycina 18. Przedstawienie procentowe rodzaju wykonywanej pracy zależne od statusu palenia	67
Rycina 19. Procentowe przedstawienie rodzaju wykształcenia pacjentów w grupach.	68
Rycina 20. Wykres ramkowy przedstawiające średnie stężenie kotyniny u kobiet i mężczyzn palących.	70
Rycina 21. Graficzne przedstawienie częstości szczotkowania zębów przez pacjentów w grupach.	72
Rycina 22. Graficzne przedstawienie stosowania nici dentystycznej przez pacjentów w grupach.	73
Rycina 23. Graficzne przedstawienie stosowania przez pacjentów szczoteczki międzyzębowej.	74
Rycina 24. Graficzne przedstawienie stosowania przez pacjentów irygacji wodnych	74
Rycina 25. Graficzne przedstawienie stosowania przez pacjentów płukanek stomatologicznych	75
Rycina 26. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie dla wskaźnika P1I	76
Rycina 27. Wykres ramkowy przedstawiający statystycznie istotną różnicę w wartości wskaźnika higieny P1I pomiędzy kobietami palącymi i niepalącymi	77
Rycina 28. Wykres ramkowy przedstawiający statystycznie istotną różnicę w wartości wskaźnika higieny P1I pomiędzy mężczyznami palącymi i niepalącymi	77

Rycina 29. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny PII pomiędzy palącymi mężczyznami i kobietami	78
Rycina 30. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny PII pomiędzy niepalącymi mężczyznami i kobietami	78
Rycina 31. Graficzne przedstawienie klasyfikacji pacjentów do podgrup w zależności od jakości higieny	79
Rycina 32. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie dla wskaźnika API	80
Rycina 33. Wykres ramkowy przedstawiający statystycznie istotną różnicę w wartości wskaźnika higieny API pomiędzy kobietami palącymi i niepalącymi	81
Rycina 34. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny API pomiędzy palącymi mężczyznami i kobietami	81
Rycina 35. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny API pomiędzy palącymi mężczyznami i kobietami	82
Rycina 36. Wykres ramkowy przedstawiający brak statystycznie istotnej różnicy w wartościach wskaźnika higieny API pomiędzy niepalącymi mężczyznami i kobietami	82
Rycina 37. Graficzne przedstawienie klasyfikacji pacjentów do podgrup w zależności od jakości higieny	83
Rycina 38. Wykres ramkowy przedstawiający średni rozkład stężenia białka w ślinie pacjentów	85
Rycina 39. Wykres ramkowy przedstawiający średni rozkład peroksydacji lipidów w ślinie pacjentów	86
Rycina 40. Wykres ramkowy przedstawiający średnią zdolność antyoksydacyjną troloksu w ślinie pacjentów.	87
Rycina 41. Wykres ramkowy przedstawiający średni rozkład produktów utleniania białek w ślinie pacjentów	88
Rycina 42. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie kobiet niepalących w podgrupach	90
Rycina 43. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach	90
Rycina 44. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOOP nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach	91
Rycina 45. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach	91
Rycina 46. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach	92
Rycina 47. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach	93
Rycina 48. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOOP nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach	93

Rycina 49. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach	94
Rycina 50. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie kobiet palących w podgrupach	95
Rycina 51. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach	95
Rycina 52. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOOP nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach	96
Rycina 53. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach	96
Rycina 54. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie mężczyzn palących w podgrupach	97
Rycina 55. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach	98
Rycina 56. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOOP nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach	98
Rycina 57. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach	99
Rycina 58. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie kobiet niepalących w podgrupach	100
Rycina 59. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg kobiet w ślinie niepalących w podgrupach	100
Rycina 60. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOOP nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach	101
Rycina 61. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie kobiet niepalących w podgrupach	101
Rycina 62. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach	102
Rycina 63. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach	103
Rycina 64. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOOP nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach	103
Rycina 65. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie mężczyzn niepalących w podgrupach	104
Rycina 66. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka mg/mL w ślinie kobiet palących w podgrupach	105
Rycina 67. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach	105

Rycina 68. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach 106
Rycina 69. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie kobiet palących w podgrupach 106
Rycina 70. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie białka nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach 107
Rycina 71. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TEAC nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach 108
Rycina 72. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie AOPP nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach 108
Rycina 73. Wykres ramkowy przedstawiający średnie stężenie TBARS nM/mg w ślinie mężczyzn palących w podgrupach 109
Rycina 74. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup z dobrą higieną jamy ustnej 111
Rycina 75. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup z dobrą higieną jamy ustnej 111
Rycina 76. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup z dobrą higieną jamy ustnej 112
Rycina 77. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS nM/mg w ślinie dla grup z dobrą higieną jamy ustnej. 112
Rycina 78. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej 114
Rycina 79. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej 114
Rycina 80. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej 115
Rycina 81. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej. 115
Rycina 82. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej 117
Rycina 83. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej 117
Rycina 84. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej 118
Rycina 85. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS w ślinie nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej. 118
Rycina 86. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej 121

Rycina 87. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej121
Rycina 88. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej122
Rycina 89. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS nM/mg w ślinie dla grup z średnią higieną jamy ustnej122
Rycina 90. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie białka mg/mL w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej124
Rycina 91. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TEAC nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej124
Rycina 92. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie AOPP nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej125
Rycina 93. Wykres ramkowy przedstawiający wartości średnie TBARS nM/mg w ślinie dla grup ze złą higieną jamy ustnej125
Rycina 94. Graficzne przedstawienie braku korelacji pomiędzy białkiem mg/ml, a kotyniną ng/mL wśród kobiet palących127
Rycina 95. Graficzne przedstawienie braku korelacji pomiędzy TEAC nM/mg, TBARS nM/mg, AOPP nM/mg, a kotyniną ng/mL wśród kobiet palących.127
Rycina 96. Graficzne przedstawienie braku korelacji pomiędzy białkiem mg/ml, a kotyniną ng/mL wśród mężczyzn palących128
Rycina 97. Graficzne przedstawienie braku korelacji pomiędzy TEAC nM/mg, TBARS nM/mg, AOPP nM/mg, a kotyniną ng/mL wśród mężczyzn palących128

11. Aneks

Kwestionariusz wywiadu dla grupy badanej i kontrolnej

Badanie podmiotowe

Kwestionariusz ankiety

(Uprzejmie proszę o dokładne zapoznanie się z pytaniami oraz wypełnienie ankiety.
Właściwą odpowiedź proszę zaznaczyć krzyżykiem "X")

1. Proszę podać płeć

Kobieta
Mężczyzna

2. Wiek

3. Miejsce zamieszkania

Wieś
Miasto do 50 tys. mieszkańców
Miasto 51-100 tys. mieszkańców
Miasto > 100 tys. mieszkańców

4. Jakiego posiada Pan/Pani wykształcenie

Podstawowe
Zawodowe
Średnie
Wyższe

5. Proszę zaznaczyć charakter wykonywanej pracy

Umysłowa
Fizyczna
Nie pracuje zawodowo

6. Jak często odwiedza Pan/Pani gabinet stomatologiczny

Jeden raz na 6 miesięcy
Raz w roku
Rzadziej niż raz w roku

7. Ile razy dziennie myje Pan/Pani zęby

Raz
Dwa
Trzy lub więcej

8. Jakej pasty do zębów Pani używa
.....
9. Czy stosuje Pan/Pani dodatkowo niżej wymienione środki higieny jamy ustnej
Nitkę dentystyczną
Szczoteczkę międzyzębową
Irygacje wodne (przy pomocy Waterpick)
Płukanki jamy ustnej
10. Czy wystąpiły u Pana/Pani któreś z niżej wymienionych objawów, jeśli tak to które

Krwawienie dziąseł w czasie szczotkowania
Samoistne krwawienie z dziąseł (podczas mówienia, jedzenia)
Nieprzyjemny zapach z ust
11. Czy pali Pan/Pani wyroby tytoniowe (papierosy, fajkę, cygara)

Tak
Nie
12. Ile papierosów dziennie Pan/Pani pali

1-5 papierosów
6-10 papierosów
11-15 papierosów
powyżej 16 papierosów
13. Jeżeli Pani/Pan nie pali tytoniu, to czy kiedykolwiek palił/paliła?

Tak
Nie
14. Czy korzysta Pani/Pan z elektronicznej formy papierosów (e-papierosy)?

Tak Jakiej mocy/
rodzaj.....
Nie

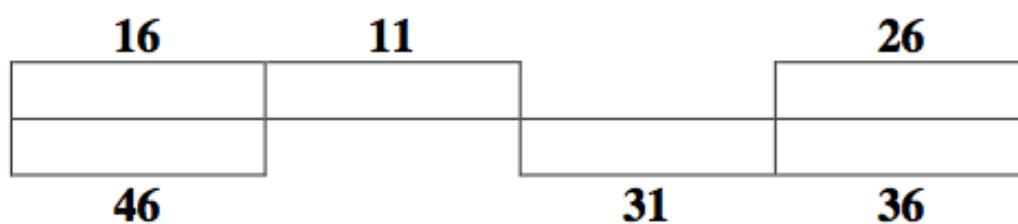
Badanie przedmiotowe

Karta badania dla grupy kontrolnej i badanej

1. Wskaźnik płytki bakteryjnej (Plaque-Index- PI) wg Silnessa i Lööga

Stopień	Ocena
0	brak płytki stwierdzony w wyniku oglądania i zgłębnikowania
1	cienka warstewka płytki bakteryjnej, niewidoczna gołym okiem, jednakże wykrywana przy przesuwaniu sondą wzdłuż powierzchni zębowej
2	miękki złóg nazębny widoczny w kieszonce dziąsłowej w postaci ciągłej linii, płytka nie wypełnia przestrzeni międzyzębowej
3	gruba warstwa płytki wypełniająca przestrzeń międzyzębową

Wartość wskaźnika dla poszczególnych zębów



(Jeżeli danego zęba brakuje, bada się ząb sąsiedni z tej samej grupy.)

Średnia wartość wskaźnika PI=

Ocena:

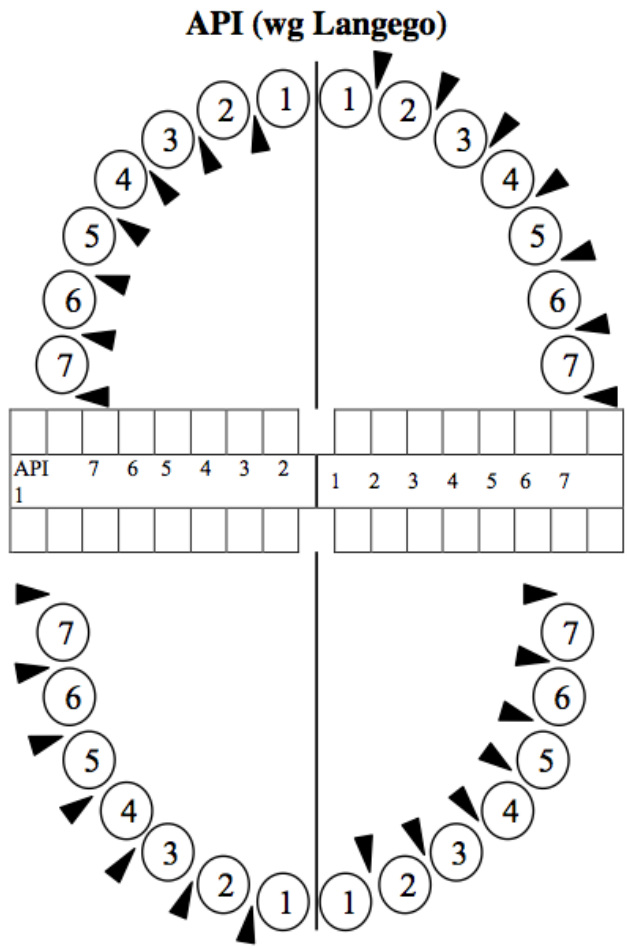
0-0,9- dobra higiena jamy ustnej

1,0-1,9- średnia higiena jamy ustnej

2,0-3,0- zła higiena jamy ustnej

2. Aproxymalny wskaźnik płytki nazębnej (Aproximal Plaque Index-API)

$$\text{API} = \frac{\text{liczba przestrzeni międzyzębowych z płytką}}{\text{liczba wszystkich badanych przestrzeni}} * 100\%$$



Ocena:

- 100-75 %-niedostateczna (zła) higiena jamy ustnej
- 74-35 %- średnia higiena jamy ustnej
- < 35%- dobra higiena jamy ustnej

3. Zmiany występujące w obrębie błony śluzowej jamy ustnej (krótki opis)

.....

.....

.....

.....

