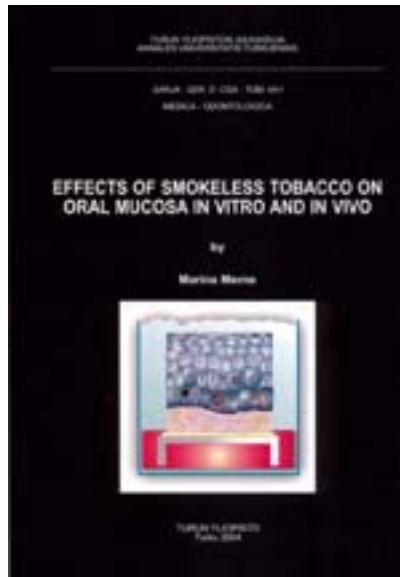


Nuuskan vaikutukset suun limakalvoon

HLL Marina Mernen suupatologian alan väitöskirja "Effects of smokeless tobacco on oral mucosa in vitro and in vivo" tarkastettiin Turun yliopistossa perjantaina 17.12.2004. Vastaväittäjänä tilaisuudessa toimi professori Roland C. Grafström Karoliinisesta Instituutista Ruotsista ja kustoksena professori Stina Syrjänen Turun yliopistosta. Työn ovat ohjanneet professori Stina Syrjänen ja dosentti Kristiina Heikinheimo Turusta, ja sen esitarkastivat dosentti Kalle Alanen Turusta, professori Tony Axéll Ruotsista sekä professori Ian Mackenzie Isosta-Britanniasta.

Suusyöpä on maailman yleisimpiä syöpätyyppejä. Väitöskirjan kirjallisuuskatsauksessa käsitellään suun limakalvon normaalia rakennetta, suusyöpää ja sen esiastemuutoksia, suusyövän riskitekijöitä ja molekyylibiologiaa sekä suusyövän in vitro -tutkimusmalleja. Useimmat suusyövät kehittyvät suun limakalvon levyepiteelissä. Syövän kehittyminen on monivaiheinen tapahtuma, johon liittyy useita geenimuutoksia. Tavallisimmat suusyövän aiheuttajat ovat tupakka eri muodoissaan ja alkoholi. Savuton tupakka (nuuska) ase-



tetaan suoraan kosketukseen suun epiteelin kanssa, ja sen jatkuva käyttö aiheuttaa limakalvovaurion. Näiden kliinisesti vaaleiden ja rypyisten sekä histologisesti epiteelin paksuuntumiseen ja hyperkeratoottisuuteen liittyvien muutosten solu- ja molekyyllitason tapahtumat ovat vielä suurimmaksi osaksi tutkimatta. Väitöskirjatyössä tutkittiin nuuskan vaikutuksia nuuskankäyttäjien limakalvomuuutoksista otetuista kudoksenäytteistä sekä yksisolukerröksisessä soluviljelyssä että kolmiulotteisissa soluviljelmissä tuotetussa keinolimakalvossa.

Kolmiulotteinen soluviljely on sopiva malli ulkoisten tekijöiden tutkimiseen

Keinolimakalvo, joka voidaan valmistaa kolmiulotteisessa kudosviljelmässä, on käyttökelpoinen koemalli esimerkiksi kemiallisten aineiden ja muiden ulkoisten tekijöiden vaikutuksen

tutkimiseen. Tässä tutkimuksessa selvitettiin eri sidekudoskoostumusten (Vitrogen 100®, Matrigel®, Cellon®, kollageeni tyyppi I) sekä eri fibroblastien (suun tai vaginan limakalvo, iho) vaikutusta HaCaT-solulinjan muodostaman epiteelin rakenteeseen ja siinä ilmaantuviin eräisiin proteiineihin (Ki-67, PCNA, pankeratiini, involukriini, Ck10, Ck17, Ck19, p53, p21 ja kollageeni tyyppi IV). Tutkimus osoitti, että HaCaT-solulinja muodosti dysplastisen ja proliferatiivisen epiteelin. Matrigel®- ja kollageeni tyyppi I -alustalla epiteelistä työntyi saarekkeita sidekudokseen. Epiteeli, joka kasvatettiin Cellon®-sidekudosalustalla, oli eniten erilaistunutta, kun taas Vitrogen 100® yhdessä limakalvofibroblastien kanssa muodosti vähiten erilaistuneen epiteelin. Tulokset osoittivat myös, että sidekudoksen solujen alkuperä on tärkeä epiteelin rakennetta muokkaava tekijä. Sidekudossolut eivät kuitenkaan vaikuttaneet proliferaation tai terminaalista erilaistumista ilmaisevien proteiinien ilmentymiseen epiteelissä.

Tutkimus osoitti kudosiselityksen standardisoinnin tärkeyden, erityisesti matriksin ja fibroblastien alkuperän osalta vertailukelpoisten olosuhteiden luomiseksi. Standardoinnin puute osittain selittää eri tutkimuslaboratorioissa saatujen tulosten huomattavatkin vaihtelevuudet.

Nuuskan vaikutukset epiteeliin

Nuuskankäyttäjiltä otetuissa suun limakalvonäytteissä todettiin epiteelin paksuuntumista, lisääntynyttä sarveistumista ja tulehdusta. Dysplastisia muutoksia ei nuuskankäyttäjien lima-



kalvomutoksista otetuissa kudoksenäytteissä todettu. Vastoin oletuksia sekä kokeelliset että potilasaineistoon perustuvat tutkimukset osoittivat, ettei epiteelin paksuuntuminen johdu solujen lisääntyneestä jakautumisesta vaan mahdollisesti viivästyneestä kypsymisestä.

Nuuskan todettiin vähentävän solujen lisääntymistä sekä *in vitro* että *in vivo*. Solujakautumista kuvastavia proteiineja, PCNA:ta ja Ki-67:ää, ilmentävien solujen osuus väheni nuuska-altistuksen jälkeen. Osaksi tämä saattoi johtua myös nuuskan toksisesta vaikutuksesta. Nuuskan vaikutus on kuitenkin myös solutyypistä riippuvainen. Virtausytometrinen tutkimus osoitti, että DNA-synteesi väheni altistuksen jälkeen ikenestä peräisin olevassa HMK-keratinosyyttisolulinjassa, mutta suun fibroblasteissa se lisääntyi.

P53 on yksi tärkeimmistä solusyklin ja ohjelmoidun solukuoleman säätelijöistä. Nuuskankäyttäjien kudoksenäytteissä p53:n ilmentymistä todettiin vain kahdessa tutkituista 14 näytteestä. Nuuska näyttää edistävän proliferoivien solujen varhaista erilaistumista, mutta vähentävän lopullista, täydellistä erilaistumista. Tämä voi osaksi selittää, miksi

dysplastisia leesioita todetaan harvoin nuuskan aiheuttamissa leesioissa.

Tutkimuksessa käytettiin myös geenilastutekniikkaa (cDNA-mikroarray), jolla selvitettiin 1 176 syöpägeenin ilmentymistä epiteelisolulinjoissa (HaCaT, HMK, IHGK) ja fibroblasteissa nuuska-altistuksen jälkeen. Nuuska-altistuksen ei todettu aiheuttavan minkään geenin samantyyppistä muutosta kaikissa tutkituissa soluissa. Täten yhteistä nuuskan aiheuttamaa geenimuutosta ei tunnistettu, mikä olisi selittänyt epiteelimuutokset. Skandinaavinen nuuskatyyppi ja amerikkalaistyyppinen tutkimusnuuska (1S3) aiheuttivat merkittävästi erilaisen geenien ilmentymisprofiilin soluissa. Tämä voi osaksi johtua 1S3:n aiheuttamasta merkittävästä aneuploidia (solun jakautumishäiriöstä).

Ihmisen papilloomavirus (HPV) on kieli- ja nielurisasyövän vaaratekijä, joskin virusta löytyy osalla henkilöistä myös terveeltä limakalvosta. Tutkimuksissa todettiin, että nuuska-altistus lisäsi IHGK-solujen HPV 16-syöpägeenin E6 ja E7 ilmentymää. Tämän tutkimuksen tulokset tukevat aikaisempia havaintoja, joiden mukaan nuuska yhdessä solujen jakautumisesta lisäävän tekijän, kuten esimerkiksi HPV:n kanssa, voi johtaa solumuutoksiin, jotka altistavat syöpäsolun kehittymiselle.

Effects of smokeless tobacco on oral mucosa *in vitro* and *in vivo*

Oral cancer is one of the most common malignancies worldwide. The majority of these lesions develop in the squamous epithelium of the oral mucosa. The most important implicated causative factors are tobacco in its various forms and alcohol intake. Smokeless tobacco (snuff) is placed in direct contact with the oral epithelium, and its reg-

ular use gives rise to a mucosal lesion. The molecular events underlying these thickened and hyperkeratotic lesions are still largely unexplored. Oral carcinogenesis is a multistep process, involving accumulation of several genetic changes.

An artificial epithelium produced in three-dimensional cell culture systems provides an applicable experimental model for the study of the effects of exogenous carcinogenic factors. Standardization of this method is important, particularly regarding the composition of the matrix and fibroblasts, to create a reproducible and generally appropriate environment and to avoid uncontrollable effects in these experiments. Many compounds (tobacco products included) causing oral mucosal lesions are alkaline. In our experimental model, the oral mucosa of the rat was highly resistant to the effects of long-term administration of alkaline drinking water. Alkaline water may exert some systemic effects as suggested by the lower body weights detected in exposed animals. Snuff was found to suppress cellular proliferation both *in vitro* and *in vivo*. In an oral gingival HMK cell line, DNA synthesis was suppressed in contrast to oral fibroblasts, where it was increased. Snuff seems to facilitate the transition of proliferating cells to early differentiating cells while suppressing terminal differentiation. This may explain why dysplastic (precancer) lesions are rarely found in snuff-induced lesions. In the present cDNA micro-array studies undertaken in four different cell types (HaCaT, HMK, IHGK, fibroblasts), no single investigated gene was consistently up- or down-regulated in response to snuff. Thus, no common genetic pathway explaining the epithelial alterations could be identified. Clear differences in post-exposure gene expression profiles were found between the Scandinavian type of snuff and US type research (1S3) snuff. This may be partly explained by the significant aneuploidy detected after 1S3 exposure. Up-regulation of E6 and E7 was seen in HPV+ cells following snuff exposure. These results support previous findings that snuff together with another carcinogen inducing cell proliferation may induce early cellular changes associated with malignant transformation.

Osajulkaisut:

- I Merne ME, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Systemic and local effects of long-term exposure to alkaline drinking water in rats. *Int J Exp Pathol* 2001; 82: 213—219.
- II Merne M, Heinaro I, Lähteenoja H, Syrjänen S. Proliferation and differentiation markers in snuff-induced oral mucosal lesions. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 259—266.
- III Merne M, Syrjänen S. The mesenchymal substrate influences the epithelial phenotype in a three-dimensional cell culture. *Arch Dermatol Res* 2003; 295: 190—198.
- IV Merne M, Heikinheimo K, Salonie-mi I, Syrjänen S. Effects of snuff extract on epithelial growth and differentiation in vitro. *Oral Oncol* 2004; 40: 6—12.
- V Merne M, Ruutu M, Korkeamäki M, Syrjänen S. Gene expression profiles in oral keratinocytes exposed to two different varieties of smokeless tobacco. Manuscript.

●● Haluan kiittää seuraavia järjestöjä väitöskirjatutkimukseni tukemisesta: Suomen Hammaslääkäriseura Apollonia ry, Odontologiska Samfundet i Finland rf, Svenska Kultursamfundet, Turun Lääkärit ry, Suomen Syöpäjärjestöt ja Turun yliopistosäätiö.

Marina Merne
HLL (väit.)
Turun yliopisto,
Suupatologian ja radiologian osasto
marina.merne@finnet.fi

Akryyliproteesin vahvistaminen kuitulujitteilla

Kliininen soveltuvuus ja mekaaniset ominaisuudet

HLL Katja Narvan hammasprotetiikan ja biomateriaalitieteen alan väitöskirja “Fibre-reinforced denture base polymer. Clinical performance and mechanical properties” tarkastettiin Turun yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa 26. marraskuuta 2004. Ohjaajina toimivat professori Pekka Vallittu ja professori Antti Yli-Urpo Turun yliopistosta. Työn esitarkastivat professori Aune Raustia Oulun yliopistosta ja professori Daryll Jagger Bristolin yliopistosta (Iso-Britannia). Vastaväittäjänä tilaisuudessa toimi professori Paul Wright Barts and The London -yliopistosta (Iso-Britannia) ja kustoksena professori Pekka Vallittu.

Väikka täysin hampaattomien ihmisten määrä on vähene-mässä, suurella osalla väestöstä on edelleen vajaa hampaisto ja proteesien tarve tulee lisääntymään tulevana vuosina. Levyproteesien yleisimpinä ongelmina ovat olleet akryylin riittä-mättömästä lujuudesta johtuvat proteesin pohjalevyn halkeamat tai pinte-teen katkeaminen. Jopa tuhansia kertoja päivässä toistuvat purentakuormi-tukset väsyttävät proteesia, ja ajan kuluessa ne voivat johtaa väsymismurtu-maan ja akryyliproteesin halkeamiseen. Murtuma voi syntyä myös iskusta. Pe-rinteiset metallivahvikkeet eivät ole pystyneet ratkaisemaan näitä ongel-mia. Myöskään yleisen pinnemateriaalin, kromikobolttiseoksen, väsymis-rasituskestävyys ei ole riittävä kestä-mään jatkuvaa taipumista, vaan ajan kuluessa joko pinte-teen retentio heikke-nee tai se katkeaa.

Kuitulujitteita (engl. fibre-reinfor-ced composites, FRC) on menestyk-sellisesti käytetty jo vuosia mm. ilmai-

lu-, urheiluväline- ja veneteollisuudes-sa. Vahvistuskykyyn vaikuttavat oleel-lisesti kuitujen laatu, sijoitus raken-teessa, adheesio kuidun ja muovin vä-lillä sekä kuitujen määrä. Kuitulujittei-den on todettu vahvistavan myös ham-maslääketieteessä käytettävän akryylin ominaisuuksia, mutta aiheesta on vielä melko vähän kirjallisuutta.

Tutkimuksen tarkoitus

Väitöskirjatutkimuksessa selvitettiin kliinisellä seurantatutkimuksella kuitu-lujitteen soveltuvuutta haljenneiden akryyliproteesien vahvikkeeksi. Lisäk-si tutkittiin mekaanisilla testeillä ham-maslääketieteessä yleisesti käytössä ole-vien kuitulujitteiden vaikutusta akryy-lisen proteesipohjalevymateriaalin me-kaanisiin ominaisuuksiin. Tarkoitukse-na oli selvittää kuitulujitteen asemoin-nin ja tyyppin vaikutusta rakenteen lu-juuteen ja tutkia kuitulujitteisen kom-posiitin käyttämistä pinnemateriaalina.