

Monika Hemerling-Powidzka

**MORFOLOGICZNA ANALIZA
BŁONY ŚLUZOWEJ DZIAŚŁA POKRYWAJĄCEGO
TYTANOWE WSZCZEPY ŚRÓDKOSTNE
W OKRESIE ICH WGAJANIA**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. Ryszard Koczorowski

Klinika Gerostomatologii Katedry Protetyki Stomatologicznej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Kierownik: Prof. dr hab. Ryszard Koczorowski

Poznań 2010

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi, Panu prof. dr. hab. Ryszardowi Koczorowskiemu, za inspirację, opiekę i troskę o rozwój naukowy, przekazaną wiedzę oraz udostępnienie materiału do badań będącego podstawą niniejszej pracy

Gorąco dziękuję Pani prof. zw. dr hab. Renacie Brelińskiej-Plinzner, za wprowadzenie mnie w dziedzinę badań immunocytochemicznych, cenne uwagi, dyskusje i zaangażowanie w przygotowaniu niniejszej rozprawy

Pragnę również podziękować Koleżankom z Pracowni Mikroskopii Elektronowej Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii za stworzenie życzliwej atmosfery, otuchę i pomoc w wykonywaniu badań

Spis treści

Wykaz używanych w pracy skrótów	4
1. Wstęp	5
2. Rys historyczny implantologii	6
3. Przegląd piśmiennictwa	9
3.1. Tytan, rodzaje implantacji, wskazania i przeciwwskazania	9
3.2. Budowa morfologiczna błony śluzowej dziąsła	12
3.3. Zmiany w błonie śluzowej dziąsła wokół zębów własnych.....	16
3.4. Budowa morfologiczna tkanek miękkich wokół implantów.....	17
3.5. Zmiany w błonie śluzowej w odpowiedzi na tytanowe wszczepy śródkostne	18
4. Cel pracy	24
5. Materiał i metody	25
5.1. Materiał kliniczny – pacjenci	25
5.2. Materiał właściwy do badań	25
5.3. Pobieranie materiału i postępowanie kliniczne	27
5.4. Przygotowanie materiału badawczego	30
5.5. Metody badawcze	31
5.5.1. Analiza morfologiczna	31
5.5.2. Techniki immunocytochemiczne	32
5.5.3. Reakcja PAS	35
6. Analizy statystyczne	36
7. Wyniki	37
7.1. Budowa błony śluzowej dziąsła w analizowanym materiale	37

7.2. Immunohistochemiczna charakterystyka składu komórkowego	
w błonie śluzowej dziąsła	50
7.2.1. Komórki Langerhansa	50
7.2.2. Limfocyty T	54
7.2.3. Limfocyty B	59
7.2.4. Skład komórkowy nacieków	61
7.2.5. Cytokeratyny	65
8. Dyskusja	68
9. Wnioski	76
10. Streszczenie	77
11. Abstract	80
12. Piśmiennictwo	83
13. Spis tabel i rycin	98
14. Załącznik (zgoda Komisji Bioetycznej)	104

Wykaz używanych skrótów

Ab – przeciwciało

ABC – kompleks awidyna-biotynylowana peroksydaza (*avidin-biotin-peroxidase complex*)

Ag – antygen

CK – cytokeratyna

DAB – 3,3' diaminobenzzydina

EGF – czynnik wzrostu naskórka (*epidermal growth factor*)

H+E – hematoksylina i eozyna

HEV – żyłki pozawłosowate z wysokim śródbłonkiem (*high endothelial venules*)

IL – interleukina

Ki67 – marker komórek proliferujących

kL – komórka Langerhansa

MHC – główny kompleks zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*)

MMP – metaloproteinaza (*matrix metalloproteinase*)

PAS – barwienie umożliwiające wykrycie w komórkach mukopolisacharydów, glikogenu i glikoproteidów błon podstawnych (*periodic acid schiff*)

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (*phosphate buffered saline*)

S-100 – białko S-100

TGF – transformujący czynnik wzrostu (*transforming growth factor*)

TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteinaz (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*)

TUNEL – kit wykrywający komórki w apoptozie (*TdT-mediated dUTP nick and labeling*)

1. Wstęp

Śródkostne wszczepy stosowane od kilkudziesięciu lat jako sztuczne filary różnych rekonstrukcji protetycznych dzięki procesowi osteointegracji pozwalają przenosić siły żujące bezpośrednio na struktury kostne narządu żucia i optymalizować jego funkcję. W wyniku gojenia się kości jako następstwa chirurgicznego urazu po implantacji biokompatybilnego tytanowego wszczepu i dzięki błonie śluzowej przylegającej do powierzchni dwufazowego implantu, następuje uszczelnienie strefy osteointegracyjnej i separacja połączenia kość-implant od środowiska jamy ustnej. Istnieje wiele badań klinicznych i eksperymentalnych dotyczących procesu osteointegracji śródkostnych wszczepów różnego typu, rzadziej natomiast analizuje się tkanki miękkie pokrywające wgajające się implanty stomatologiczne w oparciu o badania histochemiczne. Wydaje się interesujące śledzenie zmian w poszczególnych warstwach błony śluzowej pokrywającej integrujący się z kością wszczep i analiza reakcji układu odpornościowego na alloplastyczny materiał kontaktujący się bezpośrednio z tkankami ludzkiego organizmu. Zmiany w błonie śluzowej pokrywającej tytanowy wszczep śródkostny mogą być indykatorem procesów jego integracji z kością. Chociaż sukces w leczeniu implantoprotetycznym jest wynikiem wielu już znanych reakcji i procedur, to jednak istnieją, choć tylko w kilkuprocentowym wymiarze, implantologiczne niepowodzenia do utraty wszczepu włącznie, w których trudno dopatrzeć się jednoznacznych przyczyn. Stąd też wszelkiego typu badania na materiale ludzkim w odniesieniu do procedur implantologicznych wydają się szczególnie wartościowe i przydatne dla praktyki stomatologicznej.

2. Rys historyczny implantologii

Pierwsze próby uzupełnienia brakujących zębów za pomocą muszli morskich sięgają kilku tysięcy lat przed naszą erą. W wykopaliskach prowadzonych w Hondurasie przez dr Wilsona Poponoe odkryto fragmenty żuchwy, w której zęby sieczne zastąpiono muszlą w formie stożka. W 1100 roku Abulcasis zalecał wszczepianie kości wołowej w miejsce brakujących zębów, natomiast w XVI wieku, Pare wykonywał implanty z kości słoniowej [Jarzab i wsp., 1985; Jundziłł-Bieniek i wsp., 2006]. Pierre Fauchard, uznawany za ojca nowoczesnej dentystyki, w swoim podręczniku chirurgii wydanym w 1728 roku opisał udane zabiegi implantacji [Was, 1995]. Jednak rozwój technik operacyjnych oraz materiałów do wykonawstwa alloplastycznych wszczepów zębowych nastąpił dopiero w XX wieku [Jarzab i wsp., 1985]. W 1913 roku amerykański naukowiec Greenfield doniósł o satysfakcjonujących próbach wszczepienia implantu platynowo-irydowego [Świech, 1998]. Z kolei Strock w 1934 roku wykazał dobrą tolerancję ze strony otaczających tkanek wobec implantu chromo-kobaltowo-molibdenowego (Vitalium). Obserwowane zjawisko zrastania implantu z kością autor ten nazwał ankylozą [cyt. za: Świech, 1998; Hahn, 2005]. W kolejnych latach podejmowano również próby zastosowania implantów wykonanych z tlenku aluminium, sztucznego szafiru, tantalu, szkła węglowego a nawet tworzywa akrylowego [Jundziłł-Bieniek i wsp., 2006; Świech, 1998; Mieszkowska, 1957; Taylor i wsp., 2002].

Początkowe niepowodzenia w leczeniu implantologicznym wynikały z niewłaściwie przeprowadzanych procedur chirurgicznych, często dochodziło bowiem do przegrzania kości oraz zakażeń śród- i pooperacyjnych. W świetle dzisiejszej wiedzy niepowodzenia w implantologii w tym okresie są związane przede

wszystkim z zastosowaniem wszczepów wykonanych z materiałów o niskiej biogodności oraz wszczepów o niewłaściwych kształtach [Jarzab i wsp., 1985; Jundziłł- Bieniek i wsp., 2006]. Dlatego też przełomowe znaczenie dla rozwoju współczesnej implantologii miało wprowadzenie nowych biomateriałów, co przyczyniło się do opracowania sprawdzonych koncepcji leczenia implantoprotetycznego w oparciu o badania naukowe.

Należy podkreślić, że dynamiczny rozwój stosowania implantów w stomatologii zapoczątkowały badania doświadczalne Per-Ingvara Brånemarka przeprowadzone na przełomie lat 50. i 60. ubiegłego wieku i kontynuowane następnie przez jego współpracowników. Per-Ingvar Brånemark, szwedzki chirurg ortopeda, prowadząc badania nad ukrwieniem tkanki kostnej królika zaobserwował za pomocą mikrokamery umieszczonej w tytanowej tulei, silne zrośnięcie się tkanki kostnej z tuleją, uniemożliwiające jej usunięcie. W 1965 roku autor ten wszczepił pacjentowi pierwsze implanty tytanowe. W kolejnych latach wraz z współpracownikami opisał mechanizm łączenia się elementów tytanowych z otaczającą kością, co było podstawą wprowadzenia do terminologii pojęcia osteointegracji (osseointegracji). Pojęcie to, zatwierdzone przez American Academy of Implant Dentistry w 1985 roku, oznacza bezpośrednio, czynnościowo-morfologiczne połączenie zorganizowanej tkanki kostnej gospodarza z powierzchnią śródkostnego wszczepu [Brånemark, 1985; Wood i wsp., 2004; Thomason i wsp., 2003].

Tytanowe implanty zębowe stosowane w nowoczesnej stomatologii umożliwiają uzupełniania pojedynczych braków zębowych jak i stanowią filary wielocłonowych protez stałych. Protezy typu *overdenture* wsparte na wszczepach śródkostnych stwarzają lepsze możliwości przywrócenia właściwej czynności narządu żucia oraz optymalnego wyglądu u pacjentów z całkowitym bezzębiem, znaczną atrofią kości

wyrostka zębodołowego i tkanek miękkich. Z dużym powodzeniem stosuje się je również u pacjentów z silnymi odruchami wymiotnymi, gdy występują kłopoty z wymową a także w przypadkach wrodzonych i nabytych wad szczęki i żuchwy [Thomason i wsp. 2003; Morais i wsp. 2003; Mierzwińska-Nastalska i wsp., 2006; Kamińska i wsp. 2002; Koczorowski i wsp. 2007].

3. Przegląd piśmiennictwa

3.1. Tytan, rodzaje implantacji, wskazania i przeciwwskazania

Tytan stanowi 0,56% pokrycia skorupy ziemskiej, zajmując tym samym czwarte miejsce pod względem częstości występowania. Metal ten charakteryzuje się: brakiem smaku i zapachu, wysoką temperaturą topnienia (1688°C) i wrzenia (3260°C), małym współczynnikiem przewodnictwa cieplnego (21,4 W/mk), dużą wytrzymałością zmęczeniową oraz bardzo niską gęstością (4,5 g/cm³), co umożliwia wykonywanie twardych, sztywnych a jednocześnie lekkich konstrukcji [Pryliński i wsp., 2007; Orlicki i wsp., 2003; Kűpper i wsp., 1995].

Tytan i jego stopy wyróżnia spośród innych biomateriałów wysoka biokompatybilność, wynikająca z dużej odporności na korozję oraz zdolność osteointegracji z tkanką kostną. Dobra przepuszczalność dla promieni rentgenowskich i niemagnetyzm pozwalają na zastosowanie nowoczesnych technik diagnostycznych takich jak zdjęcia rentgenowskie czy rezonans magnetyczny [Orlicki i wsp. 2003, Pohler i wsp. 2000].

Czysty tytan, w odróżnieniu do stopów Ti₆Al₄V, posiada grubszą warstwę pasywacyjną (TiO₂) zapewniającą wyższą odporność na korozję. Implanty śródkostne stosowane w stomatologii wykonywane są z tak zwanego komercyjnie czystego tytanu (*ang. commercially pure titanium*), który w swoim składzie zawiera jednak niewielkie ilości innych pierwiastków (O, N, C, H). W zależności od stopnia zawartości tlenu wyróżnia się 4 gatunki czystego tytanu [Pryliński i wsp. 2007; Orlicki i wsp. 2003; Pohler i wsp. 2000; Chaturvedi i wsp. 2009; Grosogeat i wsp. 2004].

Implantacje wszczepów śródkostnych można przeprowadzać natychmiast po utracie czy planowanej ekstrakcji zęba lub kilku zębów, jak również po miesiącach czy nawet latach od ich utraty. W zależności od okresu między utratą zęba, a zabiegiem wprowadzenia implantu wyróżnia się: implantacje natychmiastowe, natychmiastowe odroczone i implantacje późne.

W przypadku implantacji natychmiastowych wszczep śródkostny wprowadza się do przygotowanego łoża kostnego w obrębie pustego zębodołu nie później niż siedem dni po utracie zęba. Implantacja natychmiastowa umożliwia dobrą lokalizację wszczepu, opóźnia zanik kości wyrostka zębodołowego, a także, co niezwykle istotne dla pacjenta, zapewnia szybsze wykonanie uzupełnienia protetycznego. Ze względu na większe ryzyko zaburzeń w gojeniu sugeruje się, iż częściej może dochodzić do powikłań pozabiegowych (obrzęki, krwiaki, rozejście się szwów) oraz utraty wszczepów [Kryst, 2004; Brandt, 1998; Sethi i wsp., 2009, Koeck i wsp., 2004].

W implantacjach natychmiastowych odoczonych zabieg wszczepienia implantu przeprowadza się od jednego do dwunastu tygodni po utracie zęba. Odroczenie procedury chirurgicznej umożliwia wykonanie zabiegu w tkankach bez stanu zapalnego. Zębodół zamknięty nabłonkiem, wypełniony jest tkanką łączną, a nierzadko już kością pierwotną. Wgajanie się implantu następuje przeważnie bez kontaktu ze środowiskiem jamy ustnej, bowiem część śródkostną wszczepu pokrywa się najczęściej płatem błony śluzowej dziąsła [Kryst, 2004; Brandt, 1998; Sethi i wsp., 2009; Koeck i wsp., 2004].

Terminem implantacje późne określa się zabiegi wykonywane, po co najmniej sześciu miesiącach od utraty zęba. W przypadku implantacji późnych wszczepienie implantu następuje zawsze w miejscu z pełni odbudowaną tkanką kostną.

Istnieją dwie metody implantacji późnych, różniące się liczbą etapów zabiegu chirurgicznego a także sposobem wgajania się wszczepu.

W metodzie jednoetapowej część środkostna implantu i jego część naddziąsłowa (filar protetyczny) tworzą monolit, a więc po zabiegu wszczepienia, suprastruktura naddziąsłowa przechodzi przez błonę śluzową i wgajanie odbywa się w kontakcie ze środowiskiem jamy ustnej.

W metodzie dwuetapowej osadzona w kości część środkostna wszczepu pokryta jest błoną śluzową przez okres 3–5 miesięcy, zatem wgajanie następuje bez kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym. Część naddziąsłowa (łącznik, filar), na której będzie osadzona korona, umieszczana jest w części środkostnej wszczepu po jego odsłonięciu, czyli po okresie osteointegracji. Metoda dwuetapowa stwarza możliwość kąтового ustawienie części naddziąsłowej (filaru) w odniesieniu do części środkostnej, co pozwala uzyskać właściwą relację filarów protetycznych nawet w warunkach braku równoległości części środkostnych wszczepów. Z uwagi na szersze możliwości rozwiązań protetycznych oraz na eliminację kontaktu wszczepów ze środowiskiem jamy ustnej w fazie osteointegracji, metoda dwuetapowa jest częściej stosowana w praktyce stomatologicznej.

Wszczepy stomatologiczne stosuje się w celu uzupełniania braku pojedynczych zębów, w rozległych brakach zębowych, u pacjentów z całkowitym bezzębiem a także w przypadkach protez pooperacyjnych. Powodzenie leczenia warunkuje zakończony wzrost szczęki i żuchwy, odpowiednia ilość oraz jakość tkanki kostnej.

Bezwzględny przeciwwskazaniem do leczenia implantologicznego są: zaawansowana dysfunkcja nerek, stan po wszczepieniu sztucznych zastawek serca (do 18 miesięcy po zabiegu), cukrzyca oporna na leczenie, uogólniona osteoporoza,

alkoholizm, narkomania, nikotynizm (ponad 20 papierosów dziennie), okres radioterapii.

Względne przeciwwskazania związane są przede wszystkim z rodzajem i zaawansowaniem choroby systemowej. Zalicza się do nich AIDS i inne choroby przebiegające z obniżeniem odporności, długotrwałą terapię kortykosteroidami, zaburzenia w gospodarce wapniowo-fosforanowej, zaburzenia hematopoetyczne, zaburzenia wydzielania gruczołów endokrynowych, choroby psychiczne, niezdrowy styl życia a także złą higienę jamy ustnej i niechęć pacjenta do współpracy [Esposito i wsp., 1998; Chanavaz, 1998; Mierzwińska-Nastalska i wsp., 2007].

Obserwacje kliniczne potwierdzają, że zaawansowany wiek nie stanowi przeszkody w podjęciu leczenia implantoprotetycznego. Jednakże leczenie pacjentów starczych powinno być zawsze poprzedzone dokładną diagnozą ogólnozdrowotną, a o kwalifikacji do zabiegu decyduje indywidualna psychofizyczna kondycja pacjenta, nie zaś wiek metrykalny [Bryant, 1998; Garg i wsp., 1997; Al Jabbari i wsp., 2003; Koczorowski i wsp., 2007].

3.2. Budowa morfologiczna błony śluzowej dziąsła

Błonę śluzową dziąsła tworzy blaszka właściwa pokryta nabłonkiem, który w klasyfikacji histologicznej zaliczany jest do nabłonekówwielowarstwowych płaskich, rogowaciejących. Najliczniejszą populacją komórek w nabłonku są keratynocyty układające się w 4 główne warstwy: podstawną, kolczystą, ziarnistą i warstwę rogowaciejącą. Pośród keratynocytów warstwy podstawnej występują komórki macierzyste, odznaczające się wysoką aktywnością proliferacyjną [Kmieć, 2007; Knychalska-Karwan, 2002]. Do bezpośrednich regulatorów proliferacji

keratynocytów należy naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*) o działaniu stymulującym oraz transformujący czynnik wzrostu (TGF β , *transforming growth factor*) działający przeciwstawnie [Feliciani i wsp., 1996; Shirasuna, 1991]. W wyniku licznych podziałów mitotycznych z komórek macierzystych powstają kolejne populacje tych komórek oraz keratynocyty wchodzące w proces różnicowania, które równocześnie tracą zdolność do podziału. Sygnałem do procesu różnicowania jest utrata kontaktu z błoną podstawną i przemieszczenie się komórek do wyższych warstw nabłonka. W kolejnych warstwach keratynocyty zmieniają kształt, płaszczyznę ułożenia względem warstwy podstawnej, a przede wszystkim zmieniają profil produkowanych cytokeratyn (CK), białek budujących filamenty pośrednie. O ile w warstwie podstawnej występują CK charakterystyczne dla komórek aktywnych mitotycznie (jak CK 6/16, CK 5) to w kolejnych etapach różnicowania i w kolejnych warstwach nabłonka wzrasta masa cząsteczkowa cytokeratyn. Począwszy od warstwy kolczystej keratynocyty wykazują ekspresję pary CK 1 i 10 w nabłonku rogowaciejącym oraz pary CK 4 i 13 w nabłonku nierogowaciejącym. Cytokeratyna 14 zaś obecna jest we wszystkich warstwach nabłonka, podczas gdy cytokeratyna 19 wyłącznie w warstwie podstawnej [Pellisier i wsp., 1992].

Ponadto w keratynocytach warstwy kolczystej rozpoczyna się synteza białek, które w kolejnych warstwach wchodzą w skład otoczki rogowej. Najbardziej znanym białkiem a równocześnie markerem różnicowania keratynocytów jest involucryna [Caroll i wsp., 1993; Yaffe i wsp., 1993]. W komórkach warstwy ziarnistej występują zasadochłonne ziarnistości, w których zidentyfikowano profilagrynę, lorikrynę, kornifinę, oraz bogate w prolinę białka oznaczone jako SPR (*small proline-rich*

proteins) [Hohl i wsp., 1995; Bibbs i wsp., 1993]. Zawartość ziarnistości, bogata w sterole oraz glikolipidy jest wydzielana do przestrzeni międzykomórkowej tworząc w ten sposób barierę nieprzepuszczalną dla wody. Stopniowo w kolejnych warstwach nabłonka komórki tracą organelle cytoplazmatyczne oraz jądro, dlatego też w warstwie rogowaciejącej występuje od kilku do kilkunastu pokładów martwych komórek, o spłaszczonym kształcie w postaci płytek. Jak określono dla komórek w naskórku cykl procesów związanych z podziałem keratynocyту, jego różnicowaniem do etapu martwej płytki trwa od 26 do 28 dni, natomiast w nabłonku błony śluzowej dziąsła znacznie krócej – około 5 dni [Hasskarl i wsp., 2006; Göger i wsp., 2008].

Nabłonek błony śluzowej dziąsła ulega rogowaceniowi pełnemu, czyli ortokeratozie z charakterystycznym brakiem jąder w keratynocytach warstwy szczytowej. Zaburzenia w procesie różnicowania keratynocytów nabłonka prowadzą do wielu chorób takich jak leukoplakia, liszaj płaski Willsona czy toczень rumieniowaty. W obrazach histologicznych chorób z zaburzeniami rogowacenia wyróżnić można: pogrubienie warstwy rogowaciejącej, któremu towarzyszy również wzrost warstwy ziarnistej (hiperkeratoza), nieprawidłowe rogowacenie pojedynczych komórek począwszy od warstwy kolczastej (dyskeratoza), a także skrócenie czasu różnicowania się keratynocytów z obecnością jąder w szczytowych warstwach nabłonka (parakeratoza) [Scully, 2006; Jańczuk i wsp., 2004].

Z punktu widzenia obrony tkanek miękkich przed patogenami, ważne miejsce zajmują komórki Langerhansa (kL), które występują głównie na terenie nabłonka, zazwyczaj w warstwie ponadpodstawnej. W obszarach jamy ustnej pokrytych nabłonkiem nierogowaciejącym (wargi, policzki, dno jamy ustnej, podniebienie miękkie) kL występują w większej ilości w porównaniu do obszarów pokrytych nabłonkiem rogowaciejącym (dziąsła, podniebienie twarde) [Daniels, 1984; Barrett

i wsp., 1996]. Dzięki zdolności do migracji komórki te mogą się przemieszczać zarówno w nabłonku jak i pomiędzy nabłonkiem a tkanką łączną i układem limfatycznym kontaktując się na tej drodze z mikrośrodowiskiem okolicznych węzłów chłonnych. Rozgałęzione i długie wypustki KL rozciągają się w kierunku warstwy rogowej, co ma istotne znaczenia dla ich funkcji tj. zaangażowania w procesy rozpoznawania i wychwytywania antygenów (Ag), prezentacji Ag odpowiednim populacjom limfocytów T. Ważną rolę dla funkcji tych komórek odgrywa ekspresja powierzchniowych antygenów MHC klasy II., a także receptorów dla fragmentu Fc przeciwciał oraz składnika C3 dopełniacza [Hasséus i wsp. 2004, Sauget i wsp., 1986; Steinmann i wsp., 1991; Miller i wsp., 2001].

Nabłonek od strony blaszki właściwej tworzy charakterystyczne zagłębienia do tkanki łącznej nazwane soplami, których liczba jak i kształt są różne u poszczególnych osobników, podobnie jak zmienia się grubość tej warstwy. Obszar tkanki łącznej pomiędzy soplami tworzy brodawki łącznotkankowe, w których przebiegają naczynia krwionośne wraz z towarzyszącymi im naczyniami chłonnymi i włóknami nerwowymi. W rejonie tym występują także receptory odpowiedzialne za czucie ucisku oraz ciała Meissnera odpowiadające za czucie dotyku. Blaszka właściwa błony śluzowej dziąsła, zbudowana z tkanki łącznej włóknistej zwartej, zawiera pęczki włókien kolagenowych a także niewielką ilość włókien sprężystych [Stevens i wsp., 2000].

Pośród różnych typów komórek, jakie występują w blaszce właściwej najliczniej reprezentowane są fibroblasty. W fizjologii na terenie blaszki właściwej spotyka się również niewielką liczbę innych typów komórek, charakterystycznych dla tkanki łącznej jak: komórki tuczne, makrofagi, limfocyty T i B, komórki plazmatyczne czy granulocyty [Stevens i wsp., 2000; Kmiec, 2007]. Poszczególne typy komórek mogą

być identyfikowane na podstawie cech morfologicznych, rutynowych barwień histologicznych oraz ekspresji charakterystycznych markerów, antygenów powierzchniowych jak i wewnątrzkomórkowych. Należy podkreślić, że skład komórkowy, liczba komórek danego typu, a także ich rozmieszczenie w obrębie błony śluzowej dziąsła są ważnym wyznacznikiem lokalnych zmian o charakterze zapalnym jak i immunologicznym.

3.3. Zmiany w błonie śluzowej dziąsła wokół zębów własnych

Najczęściej występującymi chorobami tkanek przyzębia są stany zapalne dziąsła (*gingivitis*) i przyzębia (*periodontitis*). Odwracalne *gingivitis* może trwać latami i często prowadzi do *periodontitis*, którego nie można całkowicie wyleczyć. Na podstawie analizy składu komórkowego wyróżniono 4 etapy zmian w zapaleniu dziąseł (*gingivitis*). W pierwszej fazie, czyli fazie inicjacji obserwuje się zwiększoną migrację granulocytów obojętnochłonnych do blaszki właściwej w okolicę podnabłonkową oraz do nabłonka łączącego. W kolejnym etapie zwanym fazą wczesną zapalenia dziąseł zmienia się skład komórkowy i obok granulocytów obojętnochłonnych pojawia się duży odsetek limfocytów, głównie T. W fazie ustabilizowanej *gingivitis* na terenie tkanki łącznej przeważają komórki plazmatyczne i limfocyty, natomiast w nabłonku występują również granulocyty obojętnochłonne oraz makrofagi. Zawansowana faza zapalenia dziąseł charakteryzuje się naciekami złożonymi głównie z limfocytów B i komórek plazmatycznych [Jańczuk, 2004].

O przejściu zapalenia dziąseł w zapalenie przyzębia (*periodontitis*) świadczy resorpcja kości wyrostka zębodołowego. Pod wpływem limfokin wydzielanych przez

komórki naciekające błonę śluzową, dochodzi bowiem do aktywacji osteoklastów. W przebiegu *periodontitis* skład komórkowy w błonie śluzowej zależy od ciężkości uszkodzeń tkanek przyzębia. W większości jednak obserwuje się wyraźny wzrost liczby komórek, pośród których dominują granulocyty, komórki plazmatyczne (do 80%), a następnie limfocyty. Komórki te, początkowo występują na terenie blaszki właściwej a następnie naciekają nabłonek. W przewlekłym *periodontitis* główną populacją komórek pod względem liczebności są z kolei limfocyty T, a w dalszej kolejności limfocyty B i komórki plazmatyczne [Kasprzak i wsp., 2009].

3.4. Budowa morfologiczna tkanek miękkich wokół implantów

W procesie gojenia wokół tytanowego wszczepu odtwarza się wolne dziąsło, którego budowa morfologiczna jest zbliżona do struktury dziąsła wokół zdrowego zęba [Abrahamsson i wsp., 1997; Abrahamsson i wsp., 2003; Mckinney i wsp., 1984; Mckinney i wsp., 1988]. Dziąsło wolne łączy się z powierzchnią implantu wytwarzając połączenie przypominające strukturalnie przyczep nabłonkowy, odgrywający ważną rolę w odporności wrodzonej w obrębie jamy ustnej [Mckinney i wsp., 1998]. Szczegółowe analizy na poziomie ultrastrukturalnym potwierdziły, że komórki nabłonkowe wyściełające szczelinę dziąsłową wytwarzają błonę podstawną, z którą łączą się za pomocą półdesmosomów, przylegającą do powierzchni wszczepu [Mckinney i wsp., 1988]. W blaszce właściwej błony śluzowej dziąsła, w bezpośrednim sąsiedztwie wszczepu obserwuje się odmienny przebieg włókien kolagenowych, w porównaniu do połączenia łącznotkankowego w zębie naturalnym, co wg autorów należy wiązać z brakiem cementu na powierzchni implantu [Mckinney i wsp., 1984; Mckinney i wsp., 1988]. Dziąsło związane i dziąsło wolne

w sąsiedztwie implantu podobnie jak wokół zębów naturalnych pokrywa nabłonek, który w klasyfikacji histologicznej należy do nabłoneków wielowarstwowych płaskich, rogowaciejących [Jańczuk i wsp., 2001]. Szerokość dziąsła związanego ma pozytywny wpływ na efekt estetyczny jak również na utrzymanie wszczepu i zapewnia łatwiejsze warunki do prawidłowej higieny [Siemiątkowski i wsp., 2006].

Berglundh i wsp. w badaniach na psach wykazali słabsze ukrwienie tkanek okołointplantowych, co zdaniem autorów przyczynia się do większej podatności na procesy zapalne jak i do osłabionej reakcji ze strony układu odpornościowego [Berglundh i wsp., 1994]. Istotne znaczenie w powyższych procesach mają również różnice w budowie struktur tkankowych w porównaniu do zębów naturalnych takie jak brak ozębnej, cementu korzeniowego i blaszki zbitej zębodołu, a także mniejsza liczba fibroblastów w blaszce właściwej błony śluzowej, co warunkuje słabszą ochronę przed destrukcją [Nevins i wsp., 1998; Schroeder i wsp., 1981].

3.5. Zmiany w błonie śluzowej w odpowiedzi na tytanowe wszczepy

śródkostne

Podstawą stabilności wszczepu jest jego trwała integracja z tkanką kostną, jednak wieloletni sukces leczniczy zależy także w dużym stopniu od stanu tkanek miękkich otaczających implant. Zaburzenia w procesie integracji z tkankami okołowszczepowymi prowadzą do zmian o charakterze zapalnym, atroficznym lub rzadziej hiperplastycznym [Majewski, 2006]. Do niepowodzeń natury biologicznej prowadzą zaburzenia równowagi pomiędzy patogennymi drobnoustrojami

i odpornością organizmu pacjenta, często na bazie czynników ogólnych i/lub miejscowych.

Najczęściej spotykanym powikłaniem biologicznym w tkankach miękkich po obciążeniu wszczepów (20–39%) jest zapalenie błony śluzowej – *perimucositis* [Majewski, 2006; Kotkowski, 2002]. Proces ten ogranicza się wyłącznie do tkanek miękkich wokół implantu, stanowi odpowiednik *gingivitis* w procesach zapalnych wokół zębów. Nielezione *perimucositis* rozszerza się na tkankę kostną, przechodząc w *periimplantitis*, podobnie jak *gingivitis* prowadzi do *periodontitis* [Berglundh i wsp., 1992; Ericsson i wsp., 1992; Schou i wsp., 1992].

Jedną z zasadniczych przyczyn późnej utraty implantów jest *periimplantitis*, definiowane jako reakcja zapalna tkanek okołointerfacyjnych, która w końcowej fazie prowadzi do utraty łoża kostnego wszczepów [Albrektsson i wsp., 1994]. Badania *Esposito i wsp.* Wskazują, że 10–50% niepowodzeń w pierwszym roku po implantacji wywołanych jest właśnie przez zapalenie tkanek okołowszczepowych [Esposito i wsp., 1998]. Etiologia *periimplantitis* jest złożona i wciąż nie do końca poznana. W patomechanizmie tej choroby istotną rolę przypisuje się mikroflorze bakteryjnej, odpowiedzialnej za procesy zapalne, które w kolejnych stadiach indukują mechanizmy odpowiedzi immunologicznej [Silverstein i wsp., 1994]. Do czynników zwiększających ryzyko wystąpienia *periimplantitis* zalicza się ponadto: mnogość wszczepianych implantów, ich zagęszczenie (gdy odległość pomiędzy implantami jest mniejsza niż 3 mm) oraz wydłużony czas przebywania w jamie ustnej [Fransson i wsp., 2005; Brägger i wsp., 2005]. Jak wykazują badania, u nałogowych palaczy tytoniu dwukrotnie częściej dochodzi do całkowitej utraty osteointegracji implantu a także do rozwoju *periimplantitis*. Okres przetrwania wszczepów w jamie ustnej jest znacznie krótszy w porównaniu do pacjentów

niepalących. Pod wpływem tytoniu, dochodzi do zmniejszenia przepływu krwi w tkankach oraz upośledzenia funkcji leukocytów, co objawia się znaczną utratą możliwości regeneracyjnych błony śluzowej [Hinode i wsp., 2006; Haas i wsp., 1996; Jones i wsp., 1992; Gorman i wsp., 1994].

Tkanki okołowszczepowe, podobnie jak przyzębie, wykazują podatność na zapalenia wywołane m.in. płytką nazębną [Silverstein i wsp., 1994]. W kieszonkach okołointplantowych objętych stanem zapalnym wykazano obecność bakterii charakterystycznych dla zapaleń przyzębia, przede wszystkim Gram - ujemnych pałeczek i krętków. Na uwagę zasługuje również obecność bakterii z rodzaju *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* oraz grzybów z rodzaju *Candida spp.*, które nie mają pierwotnego związku z *periodontitis* [Koczorowski i wsp., 2007; Koczorowski i wsp., 2009; Mombelli, 2002; Leonhardt i wsp., 1999; Rams i wsp., 1990]. Bakterie z kieszonek przyzębnych naturalnych zębów przenikają do szczeliny dziąsłowej otaczającej implanty. Dlatego też w grupie pacjentów z *periodontitis*, ryzyko utraty wszczepów w wyniku *periimplantitis*, wzrasta o 3,1% w porównaniu do osób ze zdrowym przyzębiem [Rosenberg i wsp., 2004]. Warto zaznaczyć, że nie tylko aktualny stan uzębienia, ale także przyczyna utraty zębów mogą mieć wpływ na przetrwanie wszczepów. Dziesięcioletnia obserwacja pacjentów, u których powodem utraty zębów była przewlekła choroba przyzębia wykazała częstsze przypadki wystąpienia zapalenia tkanek wokół implantów w porównaniu do grupy kontrolnej [Karoussis i wsp., 2003].

W genezie i w rozwoju *periimplantitis*, podobnie jak w przebiegu *periodontitis* znaczącą rolę odgrywa Interleukina-I (IL-1). Jej wysokie stężenie towarzyszy wczesnej fazie gwałtownie postępującego zapalenia tkanek okołointplantowych. IL-1

zwiększa przepuszczalność komórek śródbłonna, co umożliwia migrację leukocytów do tkanek objętych procesem zapalnym [Panagakos i wsp., 1996; Hultin i wsp., 1993].

W ostatnich latach zwrócono uwagę na związek pomiędzy przebiegiem *periodontitis* oraz *periimplantitis* a charakterystycznymi zmianami w sekwencji genów odpowiedzialnych za produkcję IL-1 [Kornman i wsp., 1997; Wilson i wsp., 1999]. U pacjentów genotypowo - pozytywnych tj. wykazujących zmiany w sekwencji genów dla IL-1, wykazano nadmiernie wysoki poziom sekrecji mediatorów zapalnych, zwiększoną wrażliwość na choroby przyzębia a także około 3-krotnie większe ryzyko utraty zębów [Mc Guire i wsp., 1999]. Badania *Feloutzis i wsp.* potwierdzają ścisłe relacje pomiędzy występowaniem charakterystycznych polimorfizmów genów dla IL-1 a resorpcją kości wokół implantu. Ponadto z badań autorów wynika również, że występowanie polimorfizmów u palaczy tytoniu zwiększa ryzyko utraty śródkostnych wszczepów [Feloutzis i wsp., 2003].

Badania patomorfologiczne dziąsła brzeżnego pobranego z rejonu objętego *periimplantitis*, wsparte analizą immunohistochemiczną, wykazały wzrost liczby limfocytów, zwiększoną proliferację naczyń, zwiększoną sekrecję Tumor Necrosis Factor- α (Czynnik Martwicy Nowotworu), Interleukiny-1 (IL-1), Interleukiny-6 (IL-6) i Interleukiny-8 (IL-8) [Konttinen i i wsp., 2006].

Analizując skład komórkowy w biopsjach tkanek miękkich pobranych z okolicy wszczepów z klinicznymi objawami procesu zapalnego (ropotok, przetoki, zwiększona ruchomość) wykazano, że najliczniej występowały komórki plazmatyczne (70%), a kolejną pod względem liczebności populacją komórek były granulocyty obojętnochłonne (10%). Populacje tych komórek tworzą nacieki na terenie nabłonka zmienionej patologicznie kieszonki jak również w bezpośrednim

sąsiedztwie naczyń włosowatych w rejonach dziąsła odległych od wszczepu [Berglundh i wsp., 2004].

W płynie kieszonki okołointplantowej wykazano zwiększony poziom enzymów proteolitycznych, zwanych metaloproteinazami (MMPs) [Kivelä-Rajamäki i wsp., 2003]. MMPs obejmują, co najmniej 25 strukturalnie i czynnościowo podobnych enzymów proteolitycznych, wydzielanych głównie przez fibroblasty, które odgrywają ważną rolę zarówno w fizjologii jak i patologii. Ich podstawową funkcją jest przebudowa mikrośrodowiska na drodze proteolizy składników substancji międzykomórkowej, receptorów błonowych i cytokin. W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy regulują procesy rozwojowe i odgrywają bardzo ważną rolę w procesach gojenia i regeneracji dziąseł. Poziom MMPs wzrasta w chorobach nowotworowych, a ich udział w reakcji zapalnej może prowadzić do uszkodzenia tkanek [Sorsa i wsp., 2004; Brew i wsp., 2000]. Do najważniejszych czynników regulujących aktywność metaloproteinaz należą białka wydzielane przez fibroblasty, nazwane tkankowymi inhibitorami metaloproteinaz (TIMP). Wysoka aktywność biologiczna fibroblastów wiąże się z ich ważną rolą w procesach gojenia i regeneracji dziąseł [Kmieć, 2007]. Szczególnie wysokie stężenie MMP-8 (kolagenaza-2) oraz MMP-13 (kolagenaza-3) odnotowano w płynie przy wszczepach z pionowym ubytkiem kości przekraczającym 3 mm oraz z klinicznymi objawami *periimplantitis* [Ma i wsp., 2000]. Wyniki te przemawiają za udziałem MMPs w osteolizie kości. W badaniach płynu pobranego z kieszonki wokół wgajających się implantów stwierdzono wysoki poziom MMP-1 i MMP-8 w pierwszym tygodniu po wszczepieniu, a następnie odnotowano stopniowe zmniejszanie się poziomu w 2, 4, i 12 tygodniu po zabiegu. Podobnie zmienia się poziom tkankowego inhibitora MMP-1. W pierwszym tygodniu po wszczepieniu implantu odnotowano wzrost

TIMP-1, natomiast w 4 tygodniu spadek do poziomu podobnego jak w zdrowym dziąśle. Charakterystyczne zmiany w aktywności MMP-1 i MMP-8 spotyka się zarówno w *periimplantitis* jak i *periodontitis* [Schou wsp., 1992].

W ostatnich latach coraz częściej pojawiają się doniesienia o reakcji nadwrażliwości na tytanowe protezy stawów biodrowych, rozruszniki serca, lub też minipłytki używane do osteosyntezy [Lalor i wsp., 1991; Flatebø i wsp., 2006; Thomas i wsp., 2006; Egusa i wsp., 2008]. Udokumentowano także nieliczne przypadki nadwrażliwości w odpowiedzi na tytanowe wszczepy śródkostne, stosowane w stomatologii. Najczęściej są to objawy miejscowe o charakterze rumienia lub wyprysku na skórze twarzy [Egusa i wsp., 2008]. Niektórzy autorzy sugerują, iż w wyniku nadwrażliwości na tytan dochodzić może do samoistnego odsłaniania się części śródkostnych wszczepów (*spontaneous rapid exfoliation*), hiperplazji dziąseł a także do niewyjaśnionej dotychczas utraty implantów bez reakcji zapalnej, przeciążenia czy błędów w procedurach chirurgicznych [Deas i wsp., 2002].

Procesy zachodzące w tkankach miękkich, jak dotąd diagnozowano i dokumentowano, na materiale biopsyjnym wyłącznie w przypadkach niepowodzeń w leczeniu implantologicznym [Gislason i wsp., 2004; Piatelli i wsp., 1998]. Nie ma natomiast danych czy u pacjentów z pełną integracją implantu, bez klinicznych objawów zapalenia zachodzą jakiegokolwiek zmiany w błonie śluzowej dziąsła, które można opisać stosując kryteria morfologiczne.

4. Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka zmian w błonie śluzowej dziąsła, które mogą być następstwem kontaktu z tytanowym wszczepem śródkostnym w okresie jego wgajania.

Z tego powodu przeprowadzono badania, których kolejne etapy miały na celu:

1. Porównanie budowy morfologicznej błony śluzowej dziąsła pobranej z części śródkostnej wszczepu z materiałem pozyskanym z tej samej okolicy przed zabiegiem implantacji:
 - a. ocena skrawków barwionych H+E oraz PAS,
 - b. analiza wybranych cech morfologicznych błony śluzowej z zastosowaniem programu Microlmage.
2. Ocena składu komórkowego w błonie śluzowej dziąsła na podstawie ekspresji charakterystycznych markerów:
 - a. ilościowa analiza występowania subpopulacji limfocytów T i B,
 - b. ilościowa analiza występowania komórek Langerhansa.
3. Charakterystyka keratynocytów na podstawie ekspresji cytokeratyn.

5. Materiał i metody

5.1. Materiał kliniczny – pacjenci

Badania przeprowadzono na materiale klinicznym pobranym od 15 pacjentów, w tym 9 kobiet i 6 mężczyzn w wieku 40–69 lat (średnia 52). Zabiegi implantacji przeprowadzono w Specjalistycznych Gabinetach Stomatologicznych LRM w latach 2006–2008, po kwalifikacji pacjentów na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego. Dla potrzeb tej pracy implantowano dwuetapowe śródkostne wszczepy śrubowe: Osteoplast-Hex (PL), Neoss (USA), Ilerimplant (E) (tabela I), wykonane z tytanu klasy IV (tabela II). Łącznie przeprowadzono 43 implantacje w tym 25 zabiegów w szczęcie oraz 18 w żuchwie. Liczba implantowanych wszczepów u poszczególnych pacjentów wahała się od 1 do 4. We wszystkich przypadkach stwierdzono po 4–6 miesiącach pełną osteointegrację wszczepów zarówno w oparciu o badanie kliniczne jak i radiologiczne. Każdy z pacjentów był pod specjalistyczną opieką kliniczną prof. dr hab. Ryszarda Koczorowskiego

5.2. Materiał właściwy do badań

Materiał do badań morfologicznych stanowiła błona śluzowa dziąsła, która bezpośrednio kontaktowała się z tytanowym wszczepem śródkostnym w okresie jego wgajania przez 4 do 6 miesięcy.

Materiał porównawczy (kontrolny) stanowiły wycinki błony śluzowej dziąsła z tej samej okolicy, pobrane przy planowanym łożu kostnym, przed dokonaniem implantacji.

Tabela I. Charakterystyka grupy badawczej.

lp	Płeć	Wiek	Miejsce implantacji	Liczba implantów	System implantologiczny
1	K	60	SZ	4	OSTEOPLANT-HEX
2	K	54	SZ	3	OSTEOPLANT-HEX
3	M	48	Ż	4	OSTEOPLANT-HEX
4	M	69	Ż	3	OSTEOPLANT-HEX
5	K	63	SZ	2	OSTEOPLANT-HEX
6	K	59	SZ	2	OSTEOPLANT-HEX
7	M	51	SZ	2	OSTEOPLANT-HEX
8	K	40	SZ	4	OSTEOPLANT-HEX
9	K	54	Ż	2	NEOSS
10	K	63	SZ	2	NEOSS
11	K	59	Ż	4	NEOSS
12	M	50	SZ	3	ILLERIMPLANT
13	M	52	Ż	1	ILLERIMPLANT
14	K	51	SZ	3	ILLERIMPLANT
15	M	59	Ż	4	ILLERIMPLANT

Tabela II. Skład chemiczny klas czystego tytanu (CP) oraz stopów Ti₆Al₄V (%)
(cyt. wg. Mc Cracken, 1999).

	CP Klasa(Grade)I	CP Klasa(Grade)II	CP Klasa(Grade)III	CP Klasa(Grade)IV
N	0,03	0,03	0,03	0,03
C	0,10	0,10	0,10	0,10
H	0,015	0,015	0,015	0,015
Fe	0,02	0,03	0,03	0,05
O	0,18	0,25	0,35	0,40
Al	-	-	-	-
V	-	-	-	-
Ti	Pozostałość (balance)	Pozostałość (balance)	Pozostałość (balance)	Pozostałość (balance)

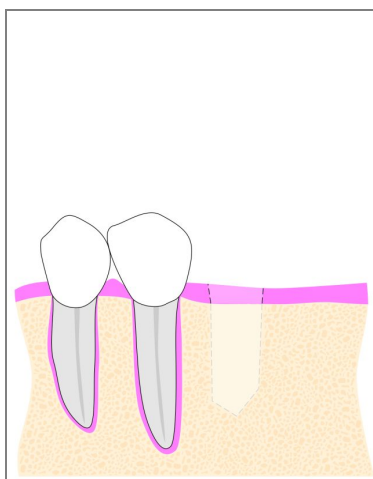
Do badań porównawczych włączono, jako odrębną grupę, dwa przypadki z zaburzeniami w procesie wgajania implantów, które skierowano do oceny specjalistycznej.

5.3. Pobieranie materiału i postępowanie kliniczne

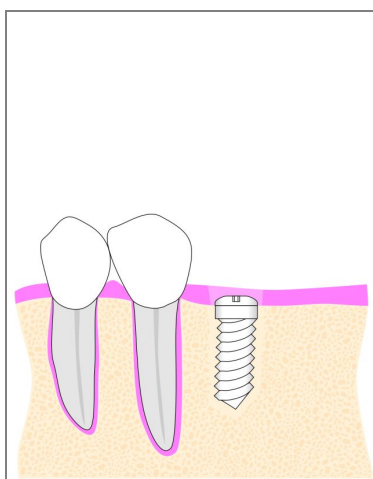
W pierwszym etapie implantacji pozyskano u danego pacjenta materiał porównawczy, który pobrano przed wszczepieniem części śródkostnej, podczas odpreparowywania płata śluzowego na wyrostku zębodołowym z okolicy planowanego łoża implantu (Ryc. 1a). Wprowadzoną część śródkostną wszczepu zamykano śrubą zaślepiającą a następnie ranę dokładnie zaszywano, pokrywając implant odpreparowaną wcześniej błoną śluzową dziąsła (Ryc. 1b). Takie postępowanie umożliwiała wgajanie się śródkostnych wszczepów bez kontaktu ze środowiskiem jamy ustnej. Po zabiegu implantacji wszyscy pacjenci stosowali doustną antybiotykoterapię (Dalacin C 300, przez 8 dni). Proces gojenia oceniano po tygodniu, podczas usuwania szwów, oraz po czterech tygodniach od wszczepienia implantu.

Po 4–6-miesięcznej osteointegracji wykonano zabieg odsłonięcia wszczepu i pozyskiwano materiał badawczy, który stanowiły wycinki błony śluzowej pobrane przy użyciu skalpela (Ryc. 1c, Ryc. 2). Po tym zabiegu w części śródkostnej implantu umieszczano śrubę gojącą w celu ukształtowania brzegu dziąsłowego przed procedurami protetycznymi (Ryc. 3).

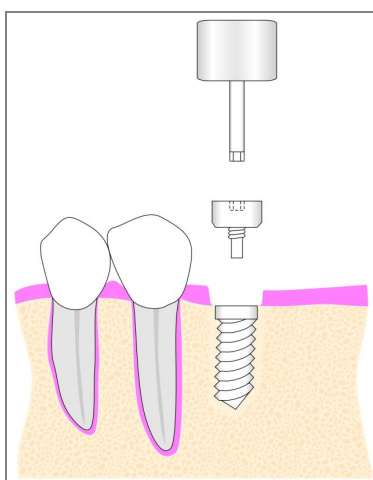
We wszystkich 43 badanych przypadkach stwierdzono pełną osteointegrację wszczepów, potwierdzoną zarówno klinicznie jak i radiologicznie.



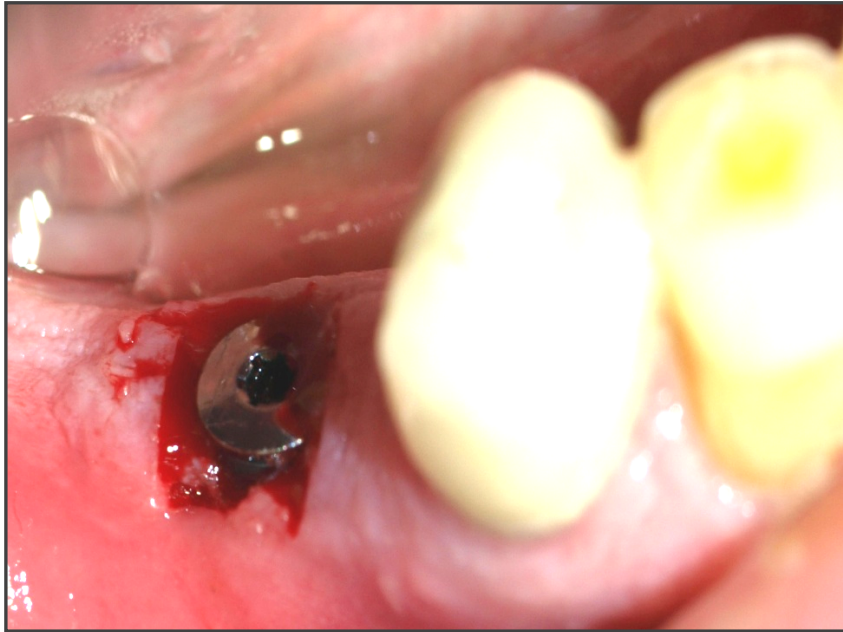
Rycina 1a. Planowane łożo implantu z pokrywającą go błona śluzową (materiał porównawczy – schemat).



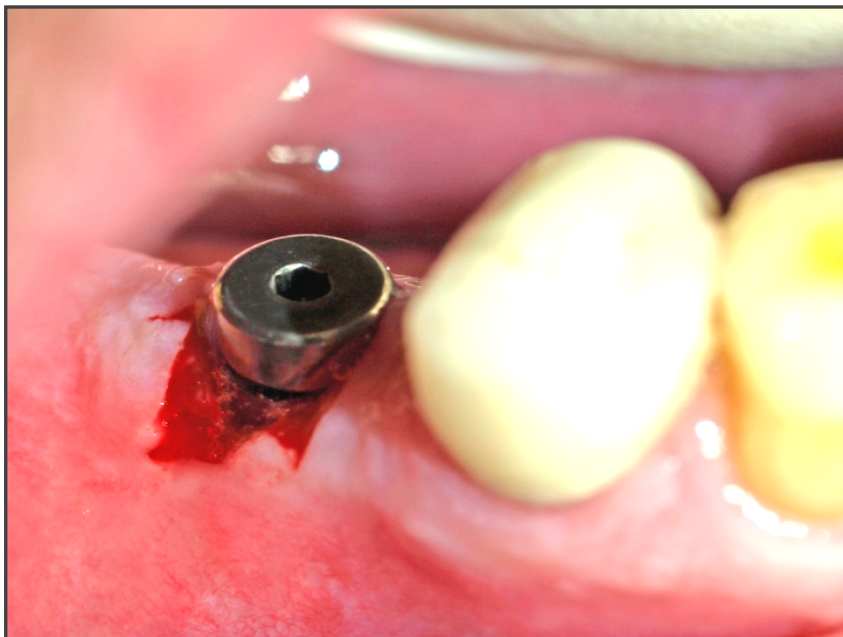
Rycina 1b. Część środkowa implantu pokryta błoną śluzową (materiał badawczy – schemat).



Rycina 1c. Odsłonięcie implantu i założenie śruby gojącej (schemat).



Rycina 2. Odslonięcie zintegrowanej części środkostnej implantu.



Rycina 3. Umieszczenie śruby gojącej w części środkostnej implantu.

Proces wgajania się implantów był monitorowany podczas regularnych, comiesięcznych wizyt kontrolnych.

Wszystkie etapy badań przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 298/06, załącznik).

5.4. Przygotowanie materiału

Badania immunocytochemiczne oraz analizę morfometryczną przeprowadzono w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Wycinki błony śluzowej dziąsła utrwalano w roztworze Bouina (kwas pikrynowy + formaldehyd + kwas octowy, 6 h, temp. pok.), a niewielki jej fragment w 4% roztworze paraformaldehydu w 0,05 M buforze fosforanowym (24 h, temp. pok.).

W kolejnym etapie materiał odwadniano w szeregu stężeń alkoholu etylowego a następnie w mieszaninie ksylen/alkohol. Stosując rutynowe procedury materiał zatapiano w parafinie. Przy użyciu mikrotomu RM 2145 (Leica) uzyskano poprzeczne przekroje błony śluzowej o grubości 5 μm . Z jednego bloczka parafinowego z zatopionym fragmentem błony śluzowej uzyskiwano około 120 skrawków. Kolejne przekroje umieszczano na szkiełkach podstawowych pokrytych 3-aminopropyltriethoxsilanem (Sigma) lub na szkiełkach typu Frost (Menzel-Glaser), po 4 na jednym szkiełku.

Pierwszy skrawek na szkiełku wybarwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną (H+E) do oceny morfologicznej. Przekroje barwione H+E na każdym czwartym szkiełku przeznaczono do analizy morfometrycznej. Pozostałe przekroje parafinowe

wykorzystano w badaniach immunocytochemicznych, a pojedyncze barwiono techniką PAS.

5.5. Metody badawcze

5.5.1 Analiza morfologiczna

W badaniach wstępnych materiału przeprowadzono analizę budowy błony śluzowej dziąsła i wybrano takie parametry oraz cechy morfologiczne, które można było uznać za wykładniki zmian. W tym celu analizowano budowę warstwy nabłonkowej, kształt soplei nabłonkowych oraz aktywność mitotyczną keratynocytów na podstawie ekspresji Ki67. Do bliższej oceny zmian w keratynocytach na poziomie komórkowym wykonano test na apoptozę. Obserwując budowę blaszki właściwej zwrócono uwagę na występowanie skupisk komórkowych i ich szczegółową lokalizację.

Badania wstępne pozwoliły wyeliminować cechy, które zmieniają się niezależnie od warunków (przed i po kontakcie z implantem) lub zmieniają się na kolejnych przekrojach danego wycinka. Umożliwiły one wybór cech do dalszych badań stosując program MicroImage, v. 4.0 (Olympus, MS Windows 98) współpracujący z mikroskopem świetlnym Olympus BX 50. W dalszych etapach analizy błony śluzowej dziąsła postanowiono ocenić grubość warstwy nabłonkowej oraz występowanie skupisk komórkowych.

Grubość warstwy nabłonkowej oszacowano na podstawie wysokości soplei nabłonkowych. Stosując odpowiednią funkcję programu dokonywano pomiarów wysokości soplei, co 0,6 mm warstwy nabłonkowej. Grubość warstwy nabłonkowej dla każdego wycinka błony śluzowej wyrażono w postaci wartości średniej z poszczególnych przekrojów.

Stosując odpowiednią funkcję programu określano także pola powierzchni poszczególnych skupisk komórek oraz pole powierzchni przekroju przez dany wycinek błony śluzowej.

Ponieważ w materiale porównawczym jak i w pobranym znad implantu wykazano występowanie niewielkich skupisk komórek (obejmujących powierzchnię do około $0,01 \text{ mm}^2$), dlatego w dalszych analizach postanowiono zwrócić uwagę na skupiska o powierzchni większej od $0,01 \text{ mm}^2$. Dla każdego wycinka określono całkowite pole powierzchni skupisk komórkowych o powierzchni większej od $0,01 \text{ mm}^2$ oraz całkowite pole badanych przekrojów przez błonę śluzową. Uzyskane dane przedstawiono w postaci wartości odsetkowej.

W kolejnym etapie badań oceniano skład komórkowy badanych skupisk na podstawie ekspresji charakterystycznych markerów. Stosując odpowiednie funkcje programu MicroImage określono:

- (a) odsetek komórek z dodatnim odczynem na badany marker na tysiąc komórek w skupisku,
- (b) gęstość komórek z dodatnim odczynem na badany marker na jednostkę powierzchni skupiska (1 mm^2) a jedynie w przypadku komórek Langerhansa na jednostkę powierzchni warstwy nabłonkowej.

5.5.2. Techniki immunocytochemiczne

Metody immunocytochemiczne wykorzystano do identyfikacji typów komórek występujących w błonie śluzowej dziąsła a przede wszystkim komórek tworzących skupiska. W tym celu zastosowano markery charakterystyczne dla poszczególnych typów komórek (Tabela III).

Tabela III. Panel przeciwciał (Ab) rozpoznających antygeny (Ag) powierzchniowe lub wewnątrzkomórkowe w komórkach błony śluzowej dziąsła oraz zestawy firmowe zastosowane w badaniach immunocytochemicznych.

Przeciwciało (Ab)	Antygen (Ag)	Firma	KIT	Typ wyznakowanej komórki
królicze N1573	S-100	Dako	Dako Cytomation LSAB2 System-HRP	Komórki dendrytyczne
Mysie UCHL1	CD45RO	Novum Biologicals	Vectastain <i>Elite</i> ABC Kit	Limfocyty T
mysie 4C9	CD25	NovoCastra	Vectastain <i>Elite</i> ABC Kit	Limfocyty T
mysie HM47/A9	CD79a	NovoCastra	Vectastain <i>Elite</i> ABC Kit	Limfocyty B, komórki plazmatyczne
mysie DE-K10	CK10	Dako	Vectastain <i>Elite</i> ABC Kit	Keratynocyty powyżej warstwy bazalnej
mysie b170	CK19	NovoCastra	Vectastain <i>Elite</i> ABC Kit	Keratynocyty warstwy podstawnej
mysie MIB1	Ki67	Dako	Dako Cytomation LSAB2 System-HRP	Komórki proliferujące
In situ cell death detection Kit	TUNEL	Roche		

Poszczególne markery wykrywano możliwie w jednym czasie u badanych pacjentów według następujących etapów:

1. odparafinowanie w ksylenie, 30 min. i stopniowe uwodnienie;
2. blokowanie endogennej peroksydazy stosując 5% H₂O₂, 10 min.;
3. płukanie kolejno w wodzie destylowanej i w PBS, 10 min.;
4. blokowanie nieswoistego wiązania przeciwciał na drodze inkubacji z normalną surowicą zwierząt, od których otrzymano drugie przeciwciało (kozią) 1:10, 30 min., temp. pok.;
5. inkubacja z 1-szym przeciwciałem, swoistym, 12 godz., temp. +4°C;
6. płukanie w PBS, 15 min.;
7. inkubacja z drugim przeciwciałem, 60 min, temp. pok;
8. płukanie w PBS, 15 min.;
9. inkubacja z wykorzystaniem firmowych zestawów przedstawionych w tabeli III;
10. płukanie w PBS, 15 min.;
11. wykrywanie peroksydazy: inkubacja w 0,5% 3,3'diaminobenzydynie (DAB) w buforze TRIS/HCl, pH 7,6 z dodatkiem 0,3% H₂O₂, 10 min., temp. pok.
12. płukanie w wodzie destylowanej, 10 min.

Aby uzyskać ekspresję niektórych antygenów, do standardowego protokołu reakcji immunocytochemicznej wprowadzono dodatkowe etapy, zgodnie z zaleceniami producenta przeciwciał. I tak w przypadku reakcji na białko S-100 bezpośrednio po odparafinowaniu preparatów skrawki trawiono proteinazą K (Dako), przez 3 minuty, w temperaturze pokojowej. W badaniach ekspresji Ki67 i CD25 a także apoptozy zastosowano procedurę odsłaniania antygeny („unmasking technique”) polegającą na inkubacji preparatów w buforze cytrynianowym pH 6, w kuchence mikrofalowej 900 W, 17 min.

W reakcjach kontrolnych skrawki inkubowano w tych samych warunkach z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałem swoistym, zastępując je normalną surowicą kozią albo PBS-em. Po przeprowadzeniu ostatniego etapu reakcji immunocytochemicznej preparaty odwadniano i montowano stosując histofluid (Medlab Products). Obserwacje morfologiczne oraz dokumentację przeprowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus BX 50.

5.5.3. Reakcja PAS

Barwienie techniką PAS zastosowano jako dodatkową metodę do wstępnej oceny występowania niektórych populacji komórek w obrębie błony śluzowej dziąsła, takich jak komórki plazmatyczne, komórki tuczne, granulocyty obojętnochłonne i kwasochłonne.

Odparafinowane i nawodnione szkiełka inkubowano kolejno w następujących roztworach:

1. alkohol etylowy, 70%;
2. kwas nadjodowy, 5 min.;
3. płukanie (woda destylowana) 2 ×;
4. odczynnik Schiffa, 30 min.;
5. płukanie (woda siarkowa) 3 × po 2 min.;
6. płukanie (woda wodociągowa i destylowana), 10 min.;
7. barwienie hematoksyliną;
8. sekwencja płukania, kolejno w wodzie wodociągowej i destylowanej;
9. odwodnienie preparatów (alkohol, ksylen) i montowanie w histofluidzie.

6. Analizy statystyczne

Uzyskane wyniki pomiarów morfometrycznych nie spełniały warunków normalności, dlatego też w analizie statystycznej zastosowano testy nieparametryczne.

Testem Wilcoxon (dla danych powiązanych) porównywano wybrane parametry morfologiczne opisujące błonę śluzową przed implantacją z błoną śluzową pobraną bezpośrednio z nad wszczepu po 4–6 miesiącach.

Analizowano:

1. całkowite pole powierzchni skupisk komórkowych, uwzględniając skupiska występujące na terenie nabłonka oraz w blaszce właściwej tuż pod nabłonkiem;
2. liczbę komórek **S-100** pozytywnych na jednostkę powierzchni nabłonka;
3. liczbę komórek **S-100** pozytywnych w skupiskach podnabłonkowych;
4. liczbę komórek **CD45RO** pozytywnych w skupiskach;
5. liczbę komórek **CD25** pozytywnych w skupiskach;
6. liczbę komórek **CD79a** pozytywnych w skupiskach.

Stosując test Manna-Whitneya analizowano korelacje pomiędzy rodzajem implantu (Osteoplant-Hex, Neoss oraz Ilerimplant) a:

- występowaniem skupisk komórkowych na terenie błony śluzowej dziąsła,
- występowaniem komórek Langerghansa na terenie nabłonka.

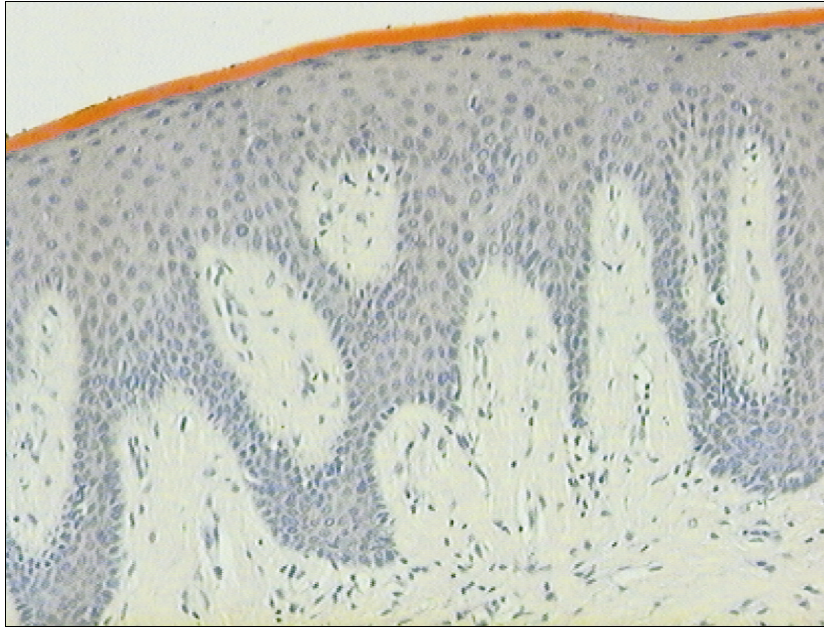
Istotność korelacji badano testem t-studenta. Hipotezy weryfikowano na poziomie $p < 0,05$. Analizę statystyczną wyników badań wykonano przy użyciu programu Statistica v.6.1 (Statsoft, Inc.).

7. Wyniki

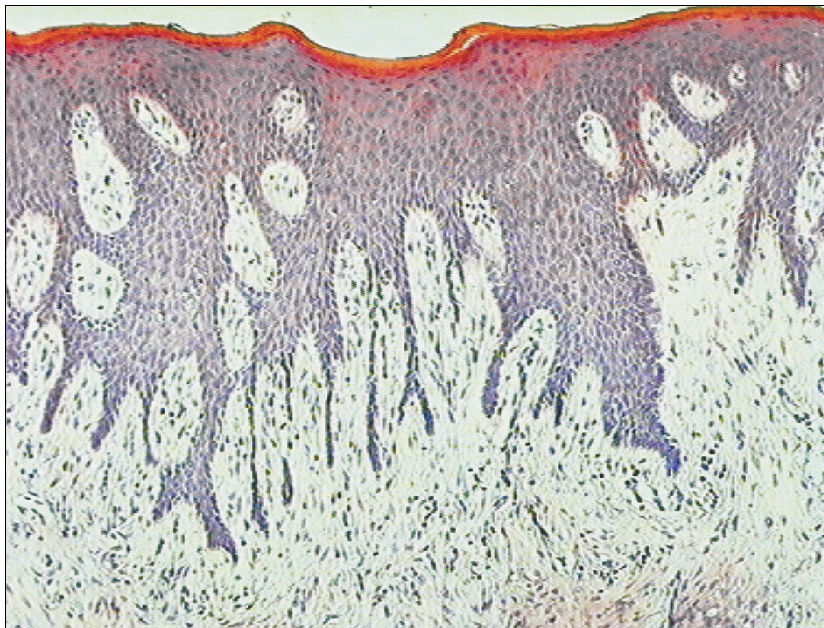
7.1. Budowa błony śluzowej dziąsła w analizowanym materiale

W materiale porównawczym pobranym przy planowanym łożu kostnym nabłonek pokrywający blaszkę właściwą składa się z kilkunastu warstw keratynocytów z dobrze zaznaczoną warstwą rogową. Keratynocyty w warstwie rogowej, spłaszczone w postaci blaszek są pozbawione jąder komórkowych, co wskazuje na rogowacenie pełne czyli ortokeratozę. Od strony blaszki właściwej warstwa nabłonkowa tworzy sople o różnym kształcie niekiedy głęboko zagłębione do tkanki łącznej (Ryc. 4a, 4b). W obserwacjach wstępnych wykazano, że kształt sopli zmieniał się na kolejnych przekrojach przez błonę śluzową, niekiedy nawet w obrębie jednego przekroju pojawiały się sople o różnej budowie. Zaobserwowano, że liczba komórek aktywnych mitotycznie wzrasta w soplach rozgałęzionych (Ryc. 5).

Analizując wysokość sopli jako wykładnik grubości nabłonka wykazano, że w materiale porównawczym ich średnia wartość wynosi 0,48 mm ($\pm 0,08$). W tym samym materiale na terenie blaszki właściwej obserwuje się niewielkie skupiska komórek, głównie jednojądrzastych, które na przekrojach błony śluzowej zajmowały powierzchnię od 0,002 do 0,007 mm². Są one skoncentrowane w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń krwionośnych, widoczne na całym obszarze tkanki łącznej (Ryc. 6). U 2 pacjentów obok niewielkich skupisk wokółnaczyńniowych zaobserwowano skupiska o wielkości od 0,015 do 0,019 mm² obejmujące średnio 5,9 i 3,9% przekrojów całkowitych, zlokalizowane w podnabłonkowym obszarze blaszki właściwej (Ryc. 7). Na preparatach barwionych PAS w ich składzie obok komórek jednojądrzastych zidentyfikowano granulocyty obojętnochłonne i komórki plazmatyczne (Ryc. 8). Komórki te występują również na terenie nabłonka.

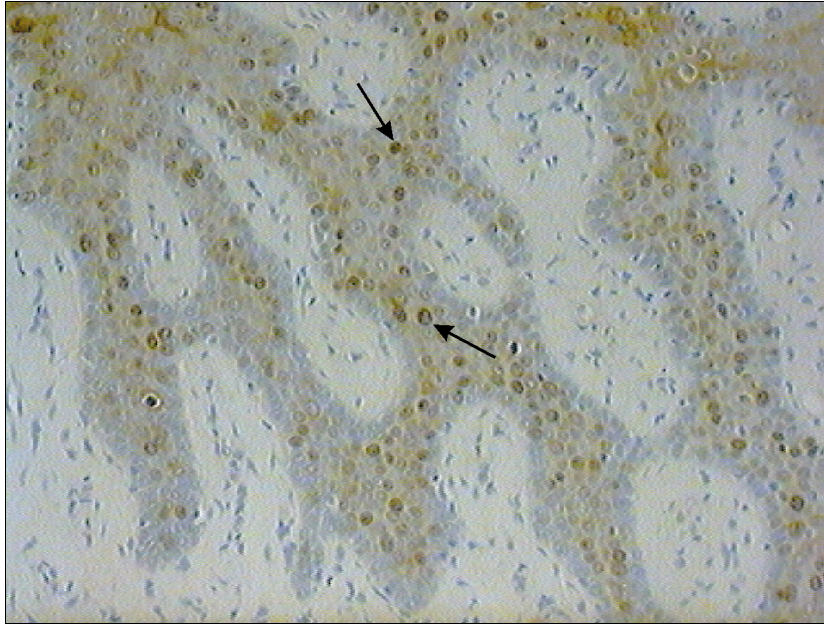


Rycina 4a.

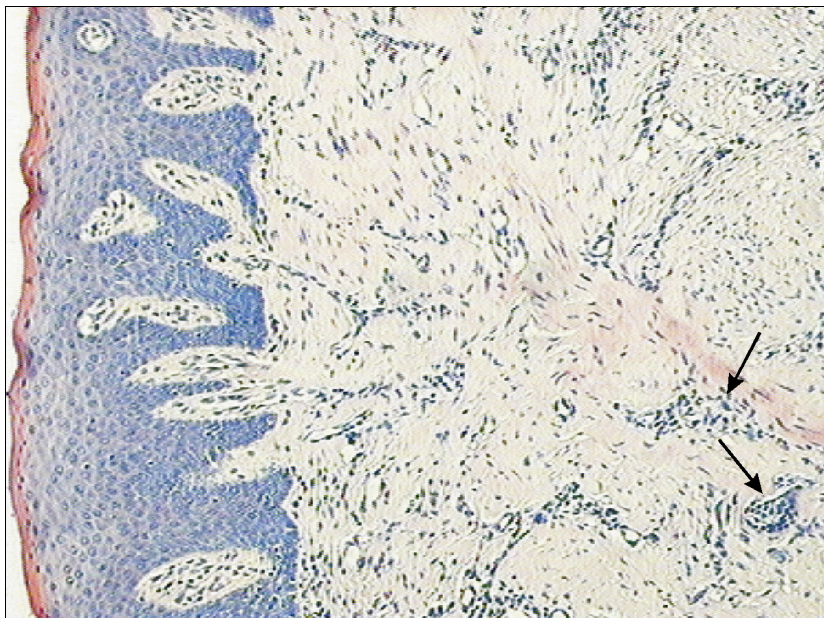


Rycina 4b.

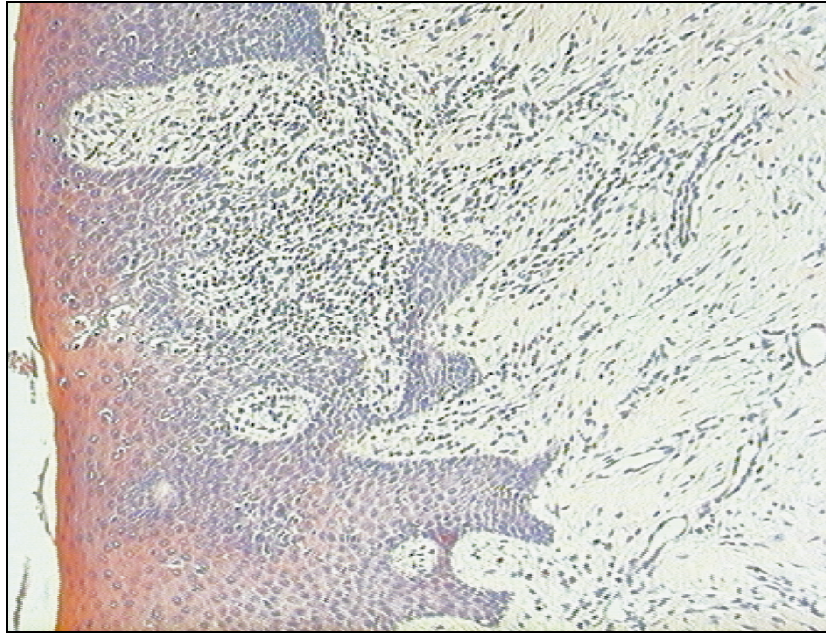
Rycina 4a, b. Przekrój przez błonę śluzową dziąsła grupy porównawczej. Nabłonek tworzy sople różniące się kształtem i wysokością (grubością nabłonka) (a, b). Sople zagłębiają się do blaszki właściwej, a pomiędzy nimi widoczne są brodawki łącznotkankowe. Zwraca uwagę dobrze zaznaczona warstwa rogowa. H+E. Powiększenie a x 16; b x 10.



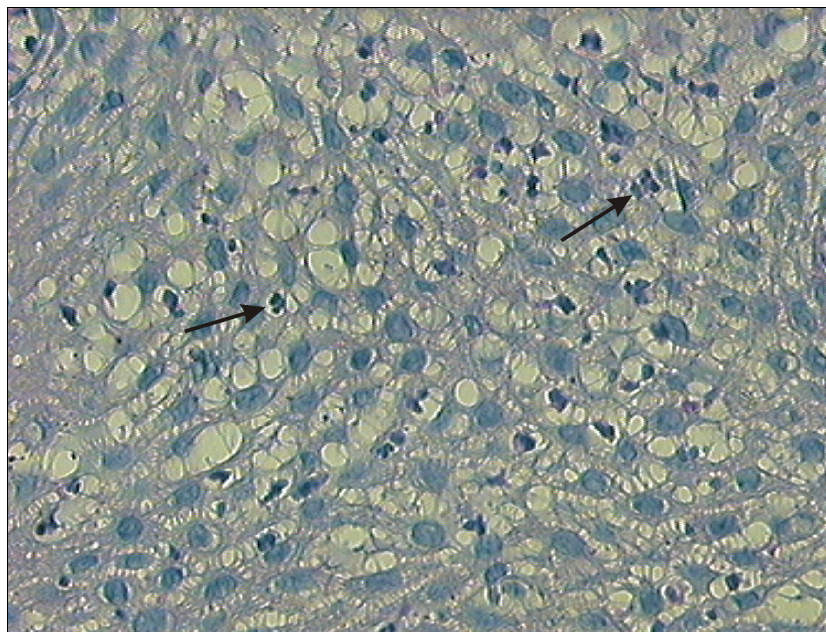
Rycina 5. Fragment błony śluzowej w materiale porównawczym. W rozgałęzionych soplach nabłonkowych występują liczne keratynocyty aktywne mitotycznie, Ki67 pozytywne (↑). Powiększenie x 40.



Rycina 6. Przekrój przez błonę śluzową dziąsła pobraną przed implantacją (materiał porównawczy). W blaszce właściwej w sąsiedztwie naczyń krwionośnych widoczne są niewielkie skupiska komórkowe (↑). H+E. Powiększenie x 10.



Rycina 7. Fragment błony śluzowej z grupy porównawczej. W okolicy podnabłonkowej widoczny naciek utworzony przez leukocyty obecne również na terenie nabłonka. H+E. Powiększenie x 10.



Rycina 8. W naciekach na terenie nabłonka w materiale porównawczym dominują granulocyty obojętnochłonne i komórki plazmatyczne (↑). Zwracają uwagę zmiany morfologiczne w cytoplazmie keratynocytów. Reakcja PAS. Powiększenie x 40.

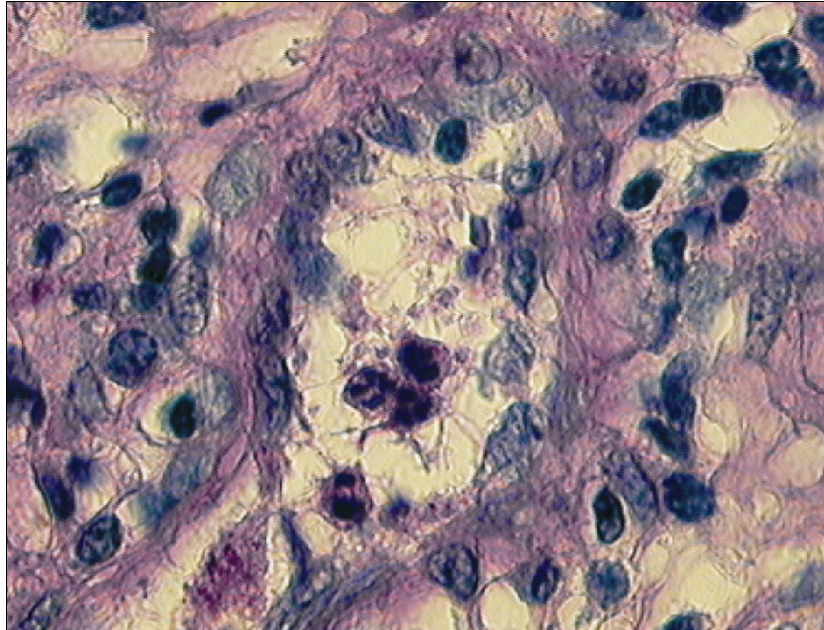
W obszarach objętych naciekiem, w keratynocytach obserwuje się zmiany morfologiczne, które dotyczą głównie wakuolizacji ich cytoplazmy .

U tych samych pacjentów znaczną liczbę granulocytów obojętnochłonnych obserwuje się również w świetle żyłek pozawłosowatych, charakteryzujących się wysokim śródbłonkiem (Ryc. 9). W dalszym ciągu pracy skupiska komórek obejmujące pole powierzchni przekroju powyżej $0,01 \text{ mm}^2$, będą określane naciekami komórkowymi, niezależnie od ich składu.

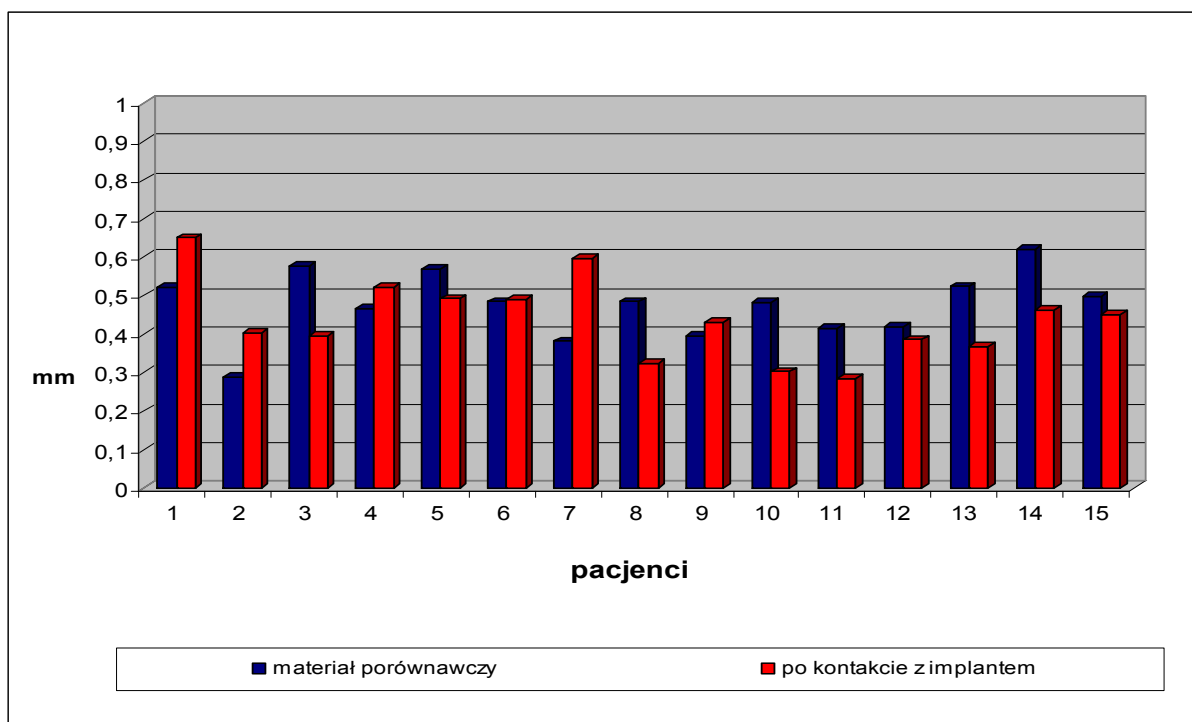
W błonie śluzowej dziąsła pobranej znad implantu średnia wartość grubości nabłonka $0,44 \text{ mm} (\pm 0,1)$ była zbliżona do wartości w materiale porównawczym. Z analizy przeprowadzonej u poszczególnych pacjentów wynika, że średnia wartość grubości nabłonka zmienia się niezależnie od etapu implantacji (Ryc. 10). Jak wynika z ryciny 10, u niektórych pacjentów średnia grubość nabłonka ma wyższą wartość w materiale porównawczym, u innych w materiale pobranym znad implantu, a u wielu w obu etapach implantacji grubość nabłonka ma wartość zbliżoną.

Podobnie jak w materiale porównawczym w błonie śluzowej pobranej znad implantu, widoczne są niewielkie skupiska komórek jednojądrzastych, które na terenie blaszki właściwej są skoncentrowane wokół naczyń. Z tego powodu zwrócono uwagę na występowanie nacieków komórkowych zlokalizowanych podnabłonkowo oraz w sąsiadującym obszarze nabłonka. Jak przedstawiono na rycinie 11 zmiany o tym charakterze występują u 11 pacjentów, w tym u 6 z nich, są spotykane tylko na pojedynczych przekrojach.

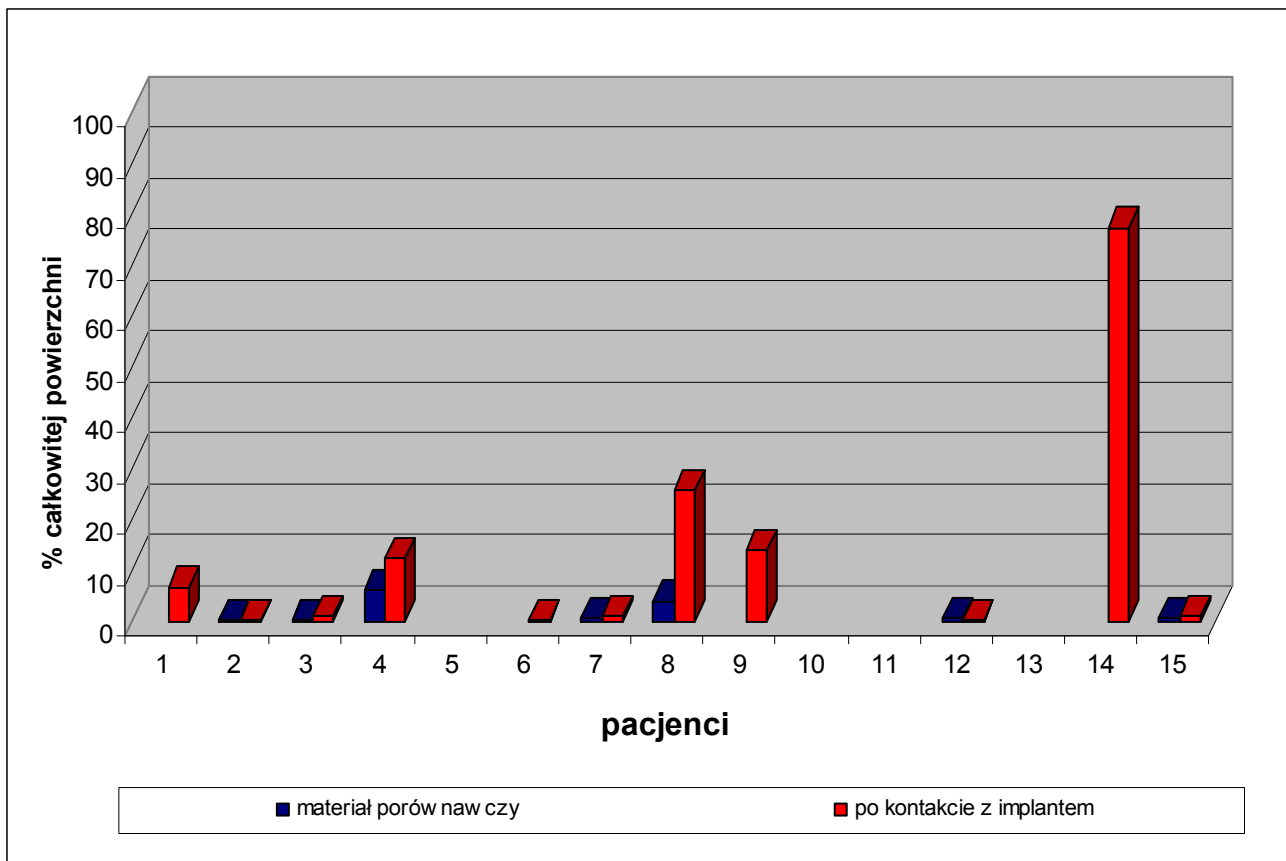
Występowanie nacieków nie zależy od liczby ani rodzaju implantów. W przypadkach pacjentów z większą liczbą wszczepów, nacieki są obserwowane przy wszystkich implantach, choć różnią się wielkością. Z tego powodu prezentowane wyniki przedstawiają odsetek powierzchni nacieków względem całkowitej



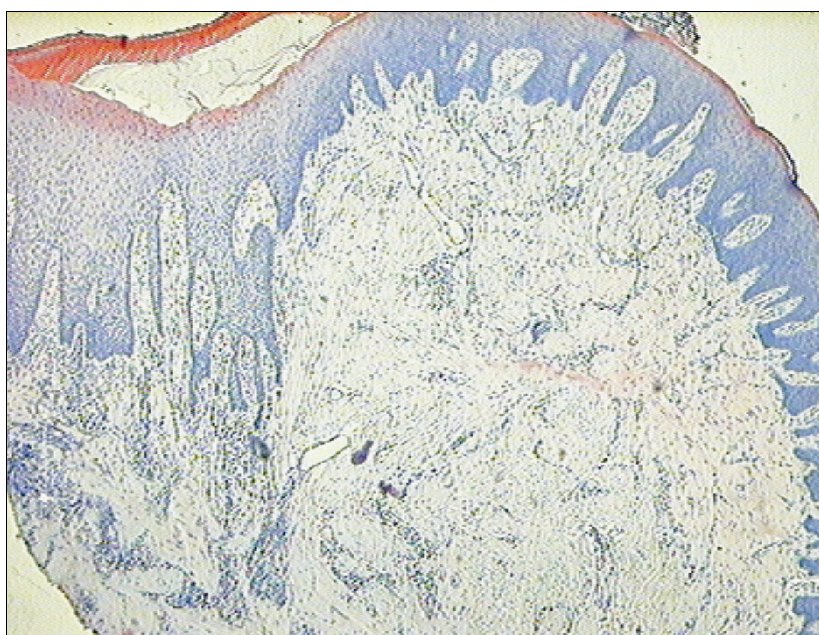
Rycina 9. Błona śluzowa w materiale porównawczym z pojedynczym naciekiem leukocytów. Na terenie blaszki właściwej widoczne jest pozawłosowate naczynie żylnie z wysokim śródbłonkiem (HEV), a w jego świetle granuloocyty. Reakcja PAS. Powiększenie x 100.



Rycina 10. Rozkład grubości nabłonka u poszczególnych pacjentów (oznaczonych kolejnymi numerami) w błonie śluzowej dziąsła pobranej z implantu i w odpowiednim materiale porównawczym.



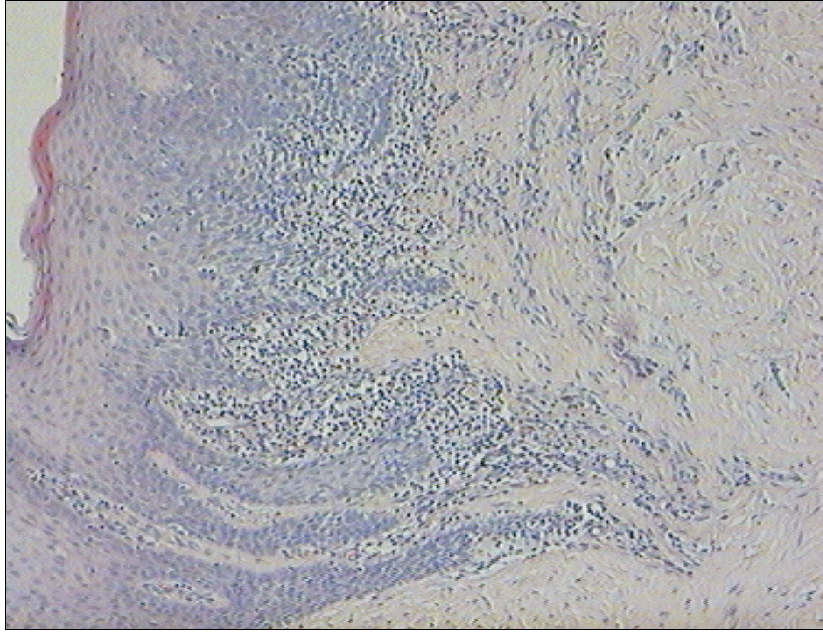
Rycina 11. Występowanie nacieków komórkowych u poszczególnych pacjentów (oznaczonych kolejnymi numerami) i ich powierzchnia, w błonie śluzowej po kontakcie z implantem oraz w odpowiednim materiale porównawczym.



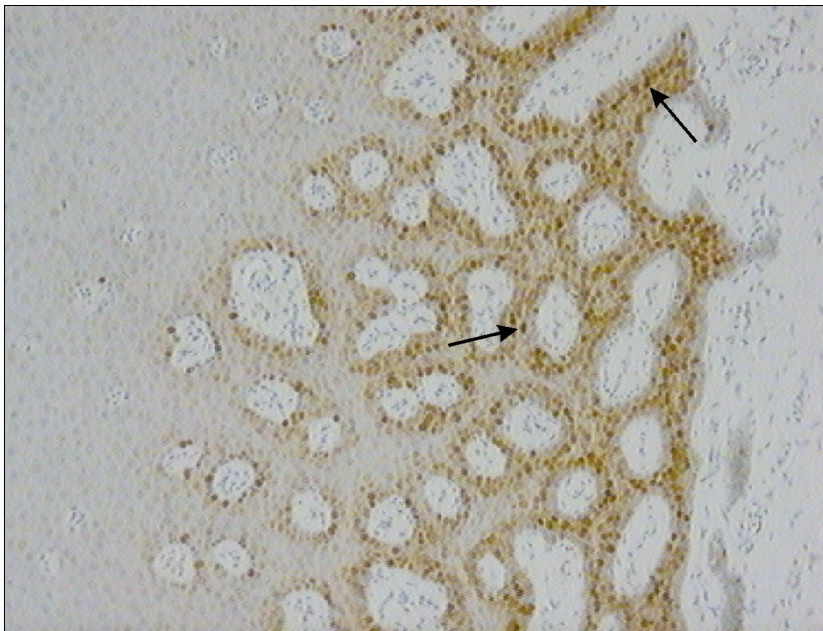
Rycina 12. Przekrój przez błonę śluzową dziąsła pobraną z tytanowego implantu. Zwraca uwagę lokalne pogrubienie warstwy nabłonkowej, któremu towarzyszy obfity naciek komórek limfoidalnych. H+E. Powiększenie x 4.

powierzchni przekrojów dla danego pacjenta. Oceniając całkowitą powierzchnię nacieków względem powierzchni analizowanych przekrojów u 5 pacjentów wykazano, że ma ona kilkakrotnie większą wartość niż u pozostałych 6 pacjentów. Spośród grupy 5 pacjentów z wysoką wartością powierzchni nacieków, u 3 osób nie obserwuje się zmian o tym charakterze w materiale porównawczym. Spośród tej samej grupy 5 pacjentów u 2 osób nacieki komórkowe występowały w materiale porównawczym, a po kontakcie z implantem ich powierzchnia statystycznie znamienne wzrasta ($p < 0,05$). Ponadto u tych samych 2 pacjentów po kontakcie z implantem zmienia się skład komórkowy w obrębie nacieków w kierunku wyraźnej przewagi komórek jednojądrzastych. Podobnie jak w materiale porównawczym występują u nich pojedyncze granulocyty obojętnochłonne jak i komórki plazmatyczne, jednak są one rozproszone na terenie tkanki łącznej jak i w świetle naczyń.

Na przekrojach obejmujących nacieki obserwuje się często lokalne pogrubienie warstwy nabłonkowej wraz ze zmianą kształtu sople nabłonka (Ryc. 12). Nie wykazano jednak korelacji pomiędzy wzrostem grubości nabłonka a wielkością nacieków komórkowych. Analizując kształt sople, nie wykazano różnic pomiędzy grupami, w tym różnic w aktywności proliferacyjnej keratynocytów, analizowanej w badaniach wstępnych. W obu grupach w niewielkich obszarach nabłonka, sople są silnie rozgałęzione, głęboko zagłębione do blaszki właściwej (Ryc. 13). Jak przedstawiono na rycinie 14 (podobnie jak w materiale porównawczym) aktywność mitotyczna keratynocytów w soplach rozgałęzionych jest znacznie wyższa niż w pozostałych obszarach nabłonka, w których sople są niskie, nierozgałęzione.



Rycina 13. Fragment błony śluzowej pobranej znad implantu. Widoczne wydłużenie sopli nabłonkowych z obfitymi naciekami komórek w warstwie podnabłonkowej, które infiltrują nabłonek. H+E. Powiększenie x 10.



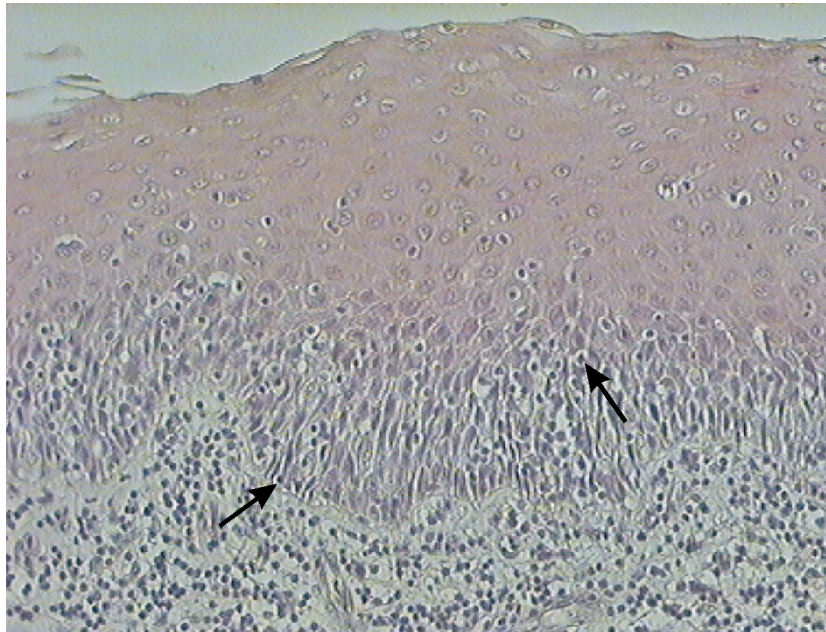
Rycina 14. Liczne keratynocyty Ki67 pozytywne (↑) w rozgałęzionych soplach nabłonkowych w materiale znad implantu. Powiększenie x 10.

Zbyt mała liczba przypadków nie pozwala rozstrzygnąć czy pogrubienie warstwy nabłonkowej jest przypadkowe, czy zachodzi pod wpływem komórek naciekających nabłonek.

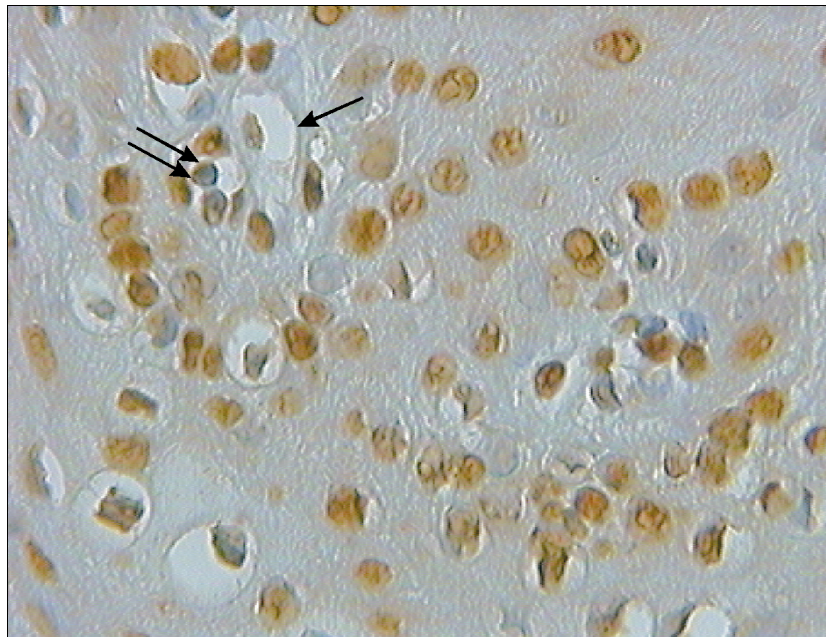
Zwracają uwagę zmiany morfologiczne w tych obszarach nabłonka, które bezpośrednio sąsiadują z naciekami. I tak szczegółowa analiza kolejnych przekrojów tych obszarów pozwala prześledzić komórki jednojądrzaste, które z nacieków podnabłonkowych migrują do nabłonka, zasiedlając jego kolejne warstwy (Ryc. 15). Zauważyć można, że na terenie nabłonka spotyka się niekiedy znaczną liczbę komórek jednojądrzastych skoncentrowanych w jego niewielkim obszarze. W keratynocytach w okolicy tych komórek dochodzi do zmian na terenie jądra komórkowego polegających na kondensacji chromatyny i na poszerzeniu przestrzeni pomiędzy błonami otoczki jądrowej. Komórki te są rozproszone we wszystkich warstwach nabłonka, począwszy od warstwy ponadpodstawnej. W badaniach wstępnych testem *in situ* TUNEL potwierdzono, że powyższe zmiany morfologiczne są związane z indukcją apoptozy zarówno w komórkach nabłonkowych jak i w innych typach komórek w obszarze nacieku (Ryc. 16a, 16b). W niektórych okolicach nabłonka wyraźnie zredukowana jest warstwa rogowa, a w komórkach tej warstwy można zaobserwować występowanie jąder komórkowych (Ryc. 17).

Zupełnie odmienne zmiany histopatologiczne obserwuje się w materiale pobranym od pacjentów z klinicznymi objawami zaburzeń w procesie osteointegracji. Cały obszar blaszki właściwej jest bogaty w komórki, które koncentrują się w głębszych warstwach blaszki właściwej, bez naciekania na nabłonek (Ryc. 18). Zwraca uwagę, że poszczególne typy komórek tworzą grupy, z których jedne zawierają głównie komórki plazmatyczne, a w innych dominują granulocyty obojętnochłonne. W całym obszarze

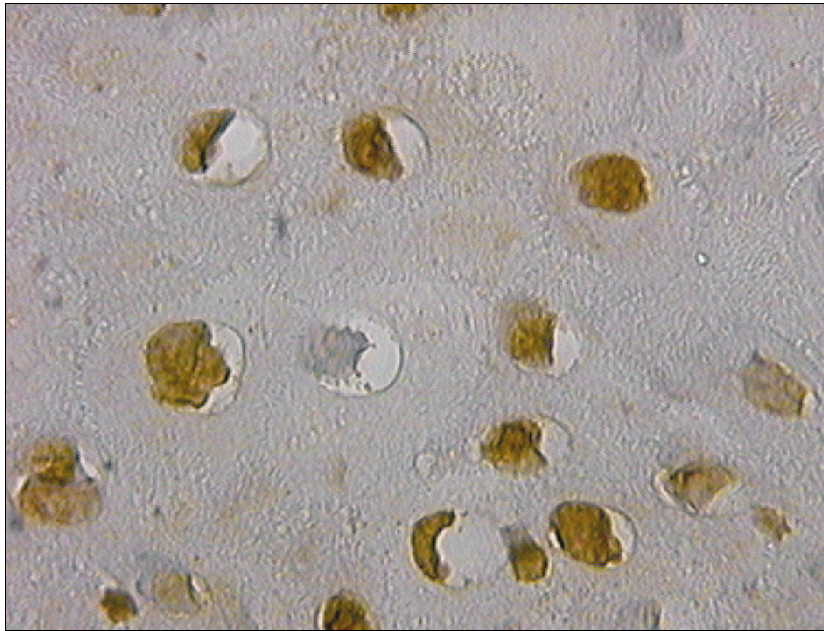
tkanki łącznej obserwuje się występowanie licznych przekrojów przez pozawłosowate naczynia żyłne z wysokim śródbłonkiem (Ryc. 19).



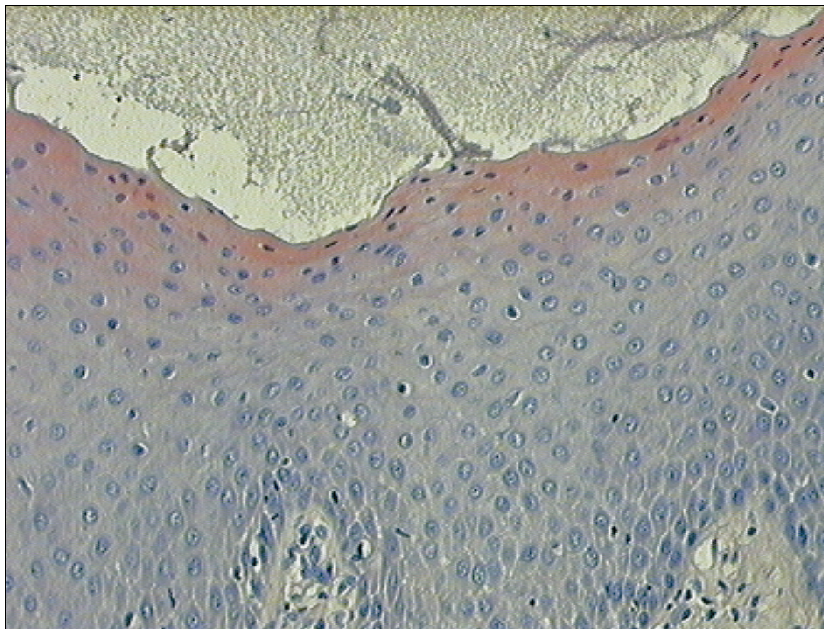
Rycina 15. Naciek komórek limfoidalnych w okolicy podnabłonkowej, migrujących do kolejnych warstw nabłonka (↑). H+E. Powiększenie x 20.



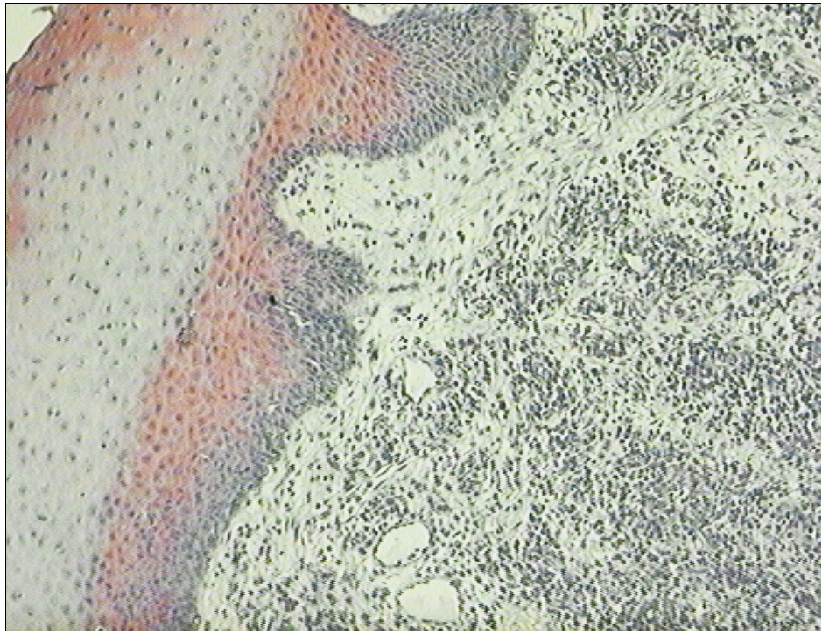
Rycina 16a. Keratynocyty w apoptozie (↑) w bezpośrednim sąsiedztwie z naciekającymi nabłonek komórkami limfoidalnymi (↑↑), w materiale pobranym z implantu. Zwraca uwagę, że liczne komórki limfoidalne wykazują dodatnią reakcję w teście na apoptozę. Powiększenie x 64.



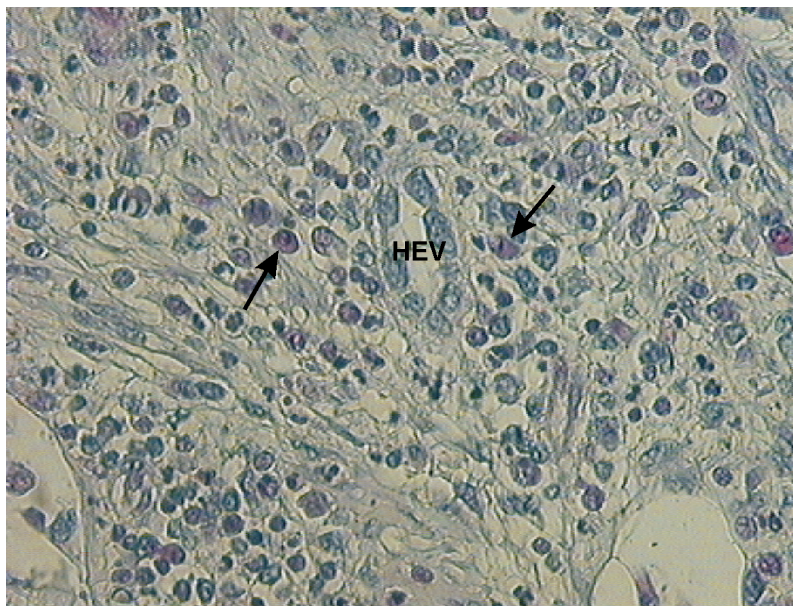
Rycina 16b. Keratynocyty w apoptozie w błonie śluzowej znad implantu. Powiększenie x 80.



Rycina 17. Obszar nabłonka błony śluzowej po kontakcie z implantem z rogowaceniem niepełnym (parakeratoza). Powiększenie x 40.



Rycina 18. Przekrój przez błonę śluzową pobraną znanad implantu z *periimplantitis*. W głębszych obszarach blaszki właściwej obfite nacieki komórkowe. Zwraca uwagę brak infiltracji nabłonka. Reakcja PAS. Powiększenie x 16.



Rrycina 19. Przekrój przez blaszkę właściwą błony śluzowej dziąsła w zaburzonym wgajaniu się wszczepów. Liczne komórki plazmatyczne, PAS+pozytywne (↑) koncentrują się w sąsiedztwie pozawłosowatych naczyń żylnych z wysokim śródbłonkiem (HEV). Powiększenie x 40.

7.2. Immunohistochemiczna charakterystyka składu komórkowego w błonie śluzowej dziąsła

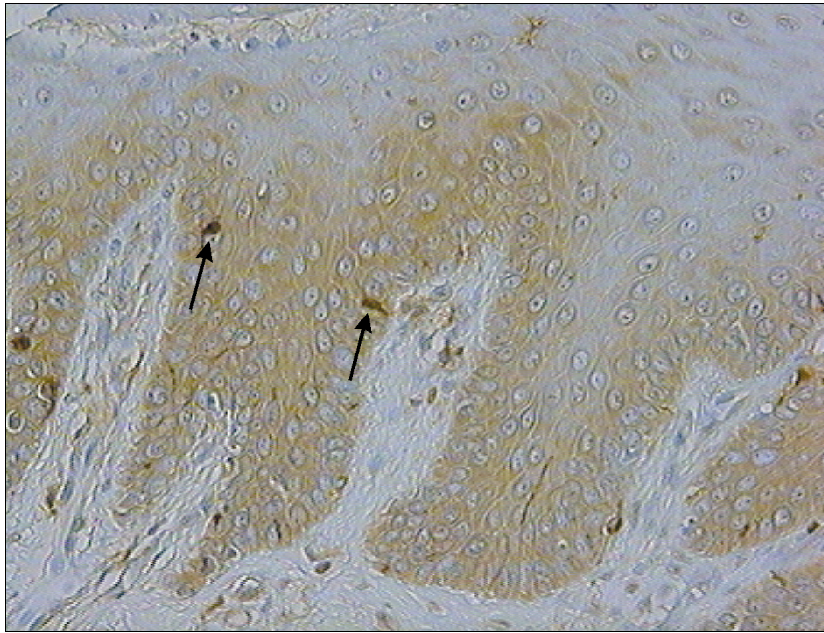
7.2.1. Komórki Langerhansa

Komórki Langerhansa identyfikowano na podstawie cytoplazmatycznej ekspresji białka S-100. W materiale porównawczym komórki Langerhansa wydają się równomiernie rozproszone w obrębie nabłonka, najczęściej zlokalizowane w warstwie ponadpodstawnej (Ryc. 20). Średnia gęstość tych komórek na jednostkę powierzchni nabłonka wynosi 16,5 (\pm 11,8). Na terenie tkanki łącznej tworzącej blaszkę właściwą u większości pacjentów spotyka się tylko pojedyncze komórki z odczynem S-100, zazwyczaj w bezpośrednim sąsiedztwie nabłonka. W tym samym obszarze dodatni odczyn na białko S-100 występuje we włóknach nerwowych.

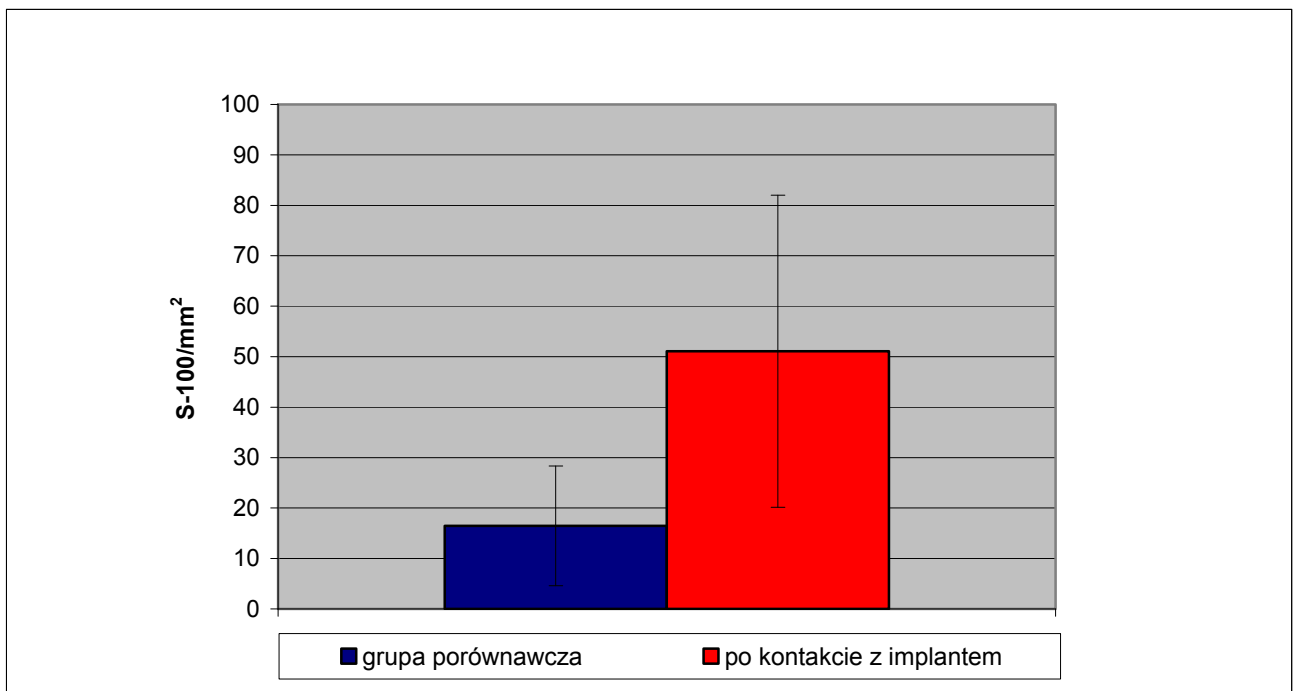
Na wszystkich przekrojach w nabłonku błony śluzowej znad implantów wykazano istotny statystycznie wzrost liczby komórek Langerhansa wyrażonej ich gęstością 51 (\pm 30,9) na mm² w stosunku do materiału porównawczego, przy $P < 0,05$ (Ryc. 21).

Gęstość komórek S-100 pozytywnych na jednostkę powierzchni nabłonka u poszczególnych pacjentów w obu etapach implantacji przedstawiono na rycinie 22. U większości pacjentów gęstość tych komórek wielokrotnie wzrasta, jednak w 2 przypadkach nie wykazano zmian w odniesieniu do ich materiału porównawczego.

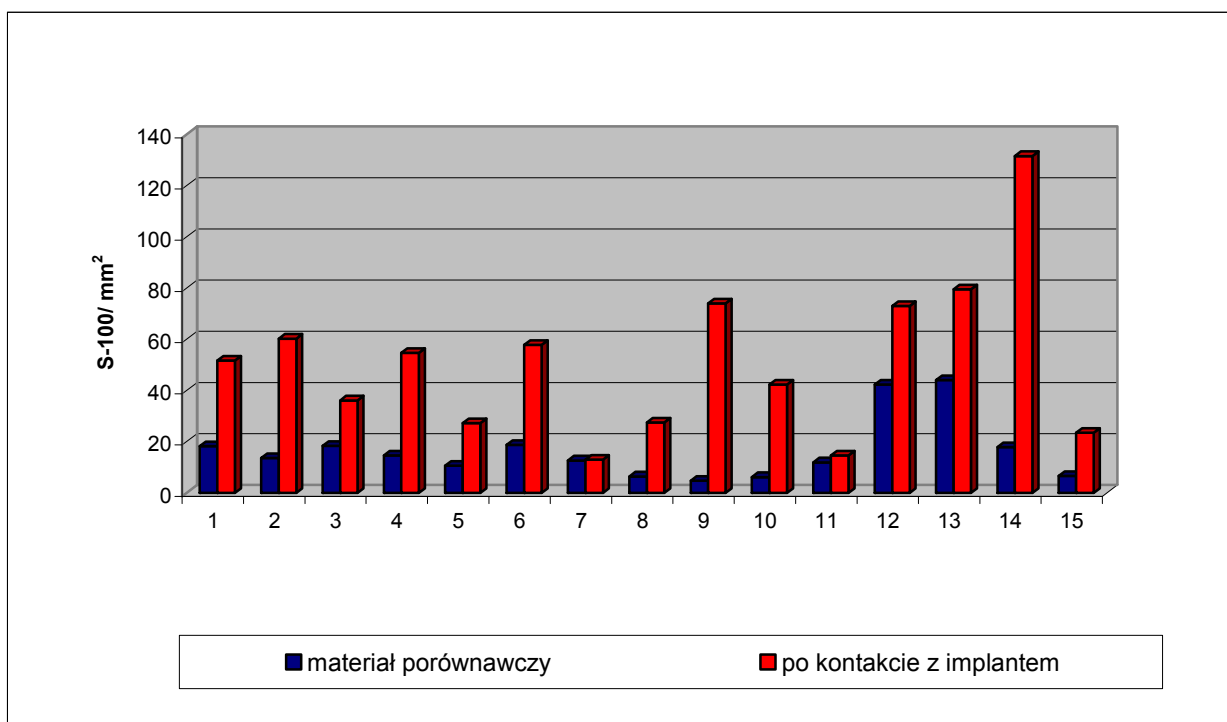
W materiale znad implantów wykazano również zmiany w rozmieszczeniu badanych komórek na terenie nabłonka. Na jednych przekrojach komórki S-100 pozytywne rozproszone są we wszystkich warstwach nabłonka, a na innych komórki z odczynem dodatnim koncentrują się od strefy podnabłonkowej blaszki właściwej do warstwy podstawnej nabłonka, w kierunku zewnętrznych pokładów warstwy kolczystej (Ryc. 23, 24).



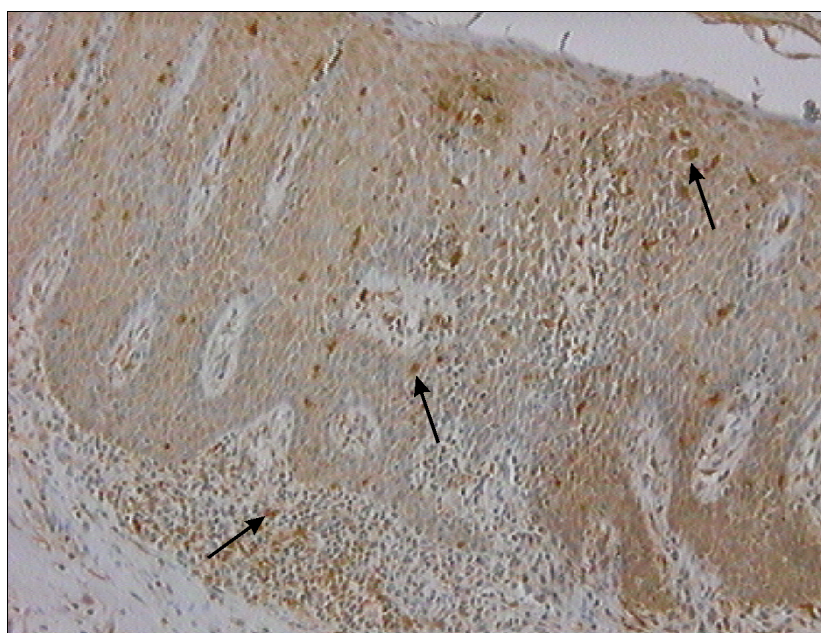
Rycina 20. Występowanie komórek Langerhansa (S-100 pozytywnych, ↑) na terenie nabłonka błony śluzowej w grupie porównawczej. Powiększenie x 25.



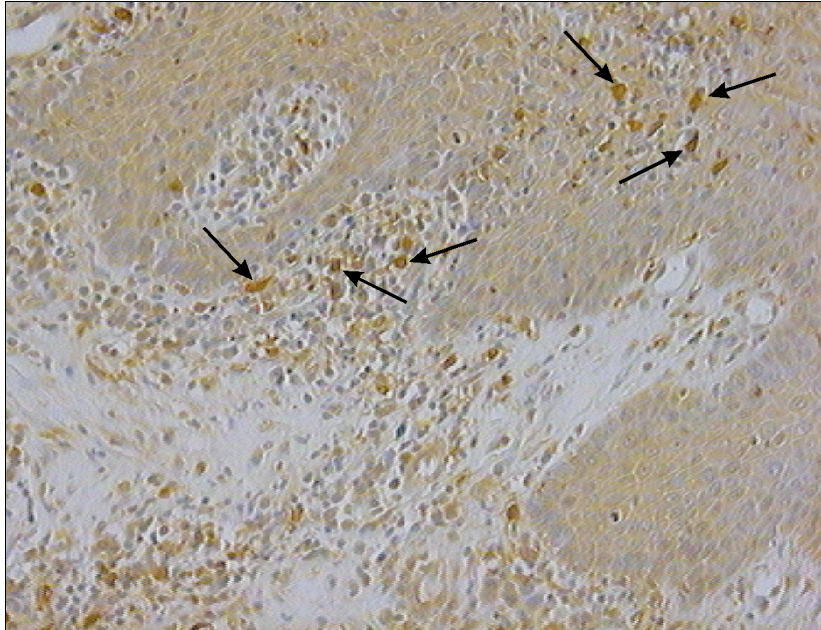
Rycina 21. Średnia gęstość komórek Langerhansa (S-100 pozytywnych) w błonie śluzowej dziąsła pobranej znad implantów i w materiale porównawczym.



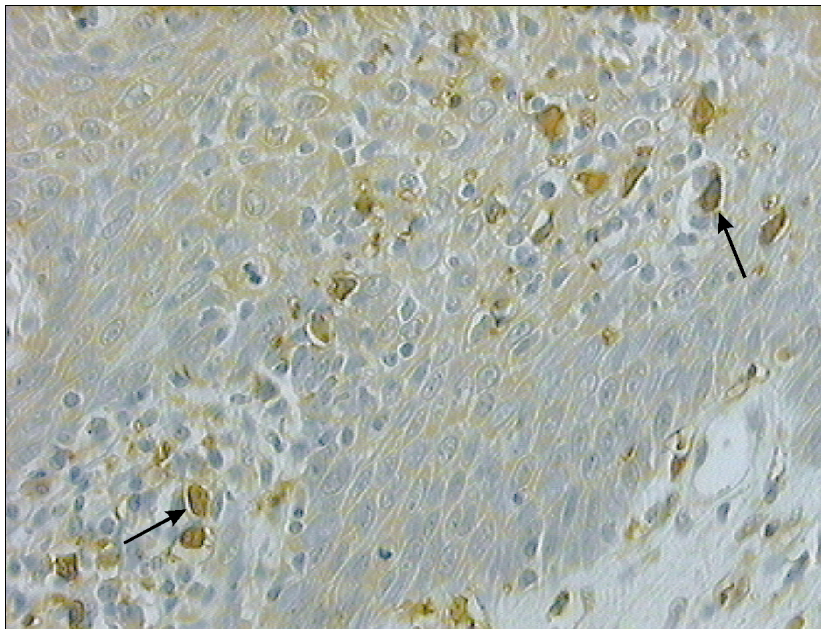
Rycina 22. Rozkład gęstości komórek Langerhansa (S-100 pozytywnych) u poszczególnych pacjentów, w nabłonku błony śluzowej po bezpośrednim kontakcie z implantem oraz w odpowiednim materiale porównawczym.



Rycina 23. Komórki Langerhansa z odczynem na białko S-100 (↑) w różnych warstwach nabłonka oraz pośród komórek w nacieku podnabłonkowym, w błonie śluzowej dziąsła nad implantu. Powiększenie x 20.



Rycina 24. Fragment błony śluzowej dziąsła znad implantu. Zwraca uwagę duża koncentracja komórek Langerhansa z ekspresją S-100 (↑) w rejonie podnabłonkowym oraz skupiska tych komórek na terenie nabłonka. Powiększenie x 20.

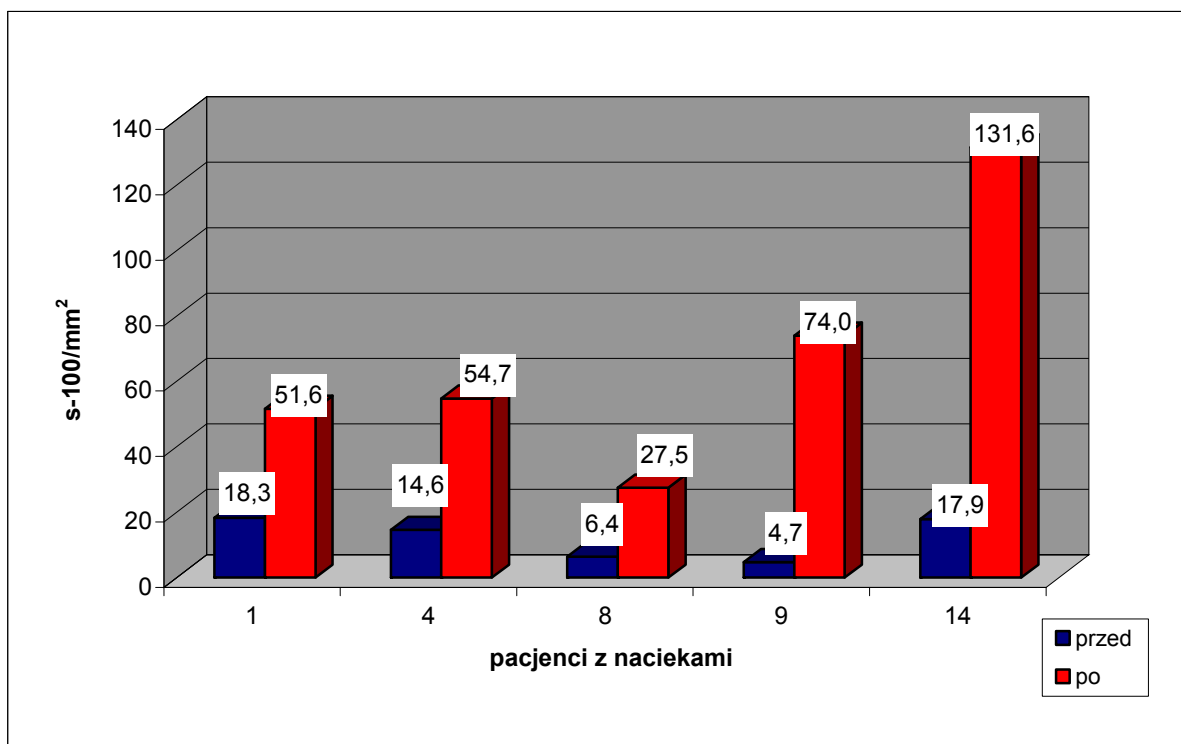


Rycina 25. Komórki Langerhansa z ekspresją S-100 (↑) naciekające nabłonek dziąsła znad implantu. Zwraca uwagę, że komórkom Langerhansa towarzyszy populacja komórek limfoidalnych. Powiększenie x 40.

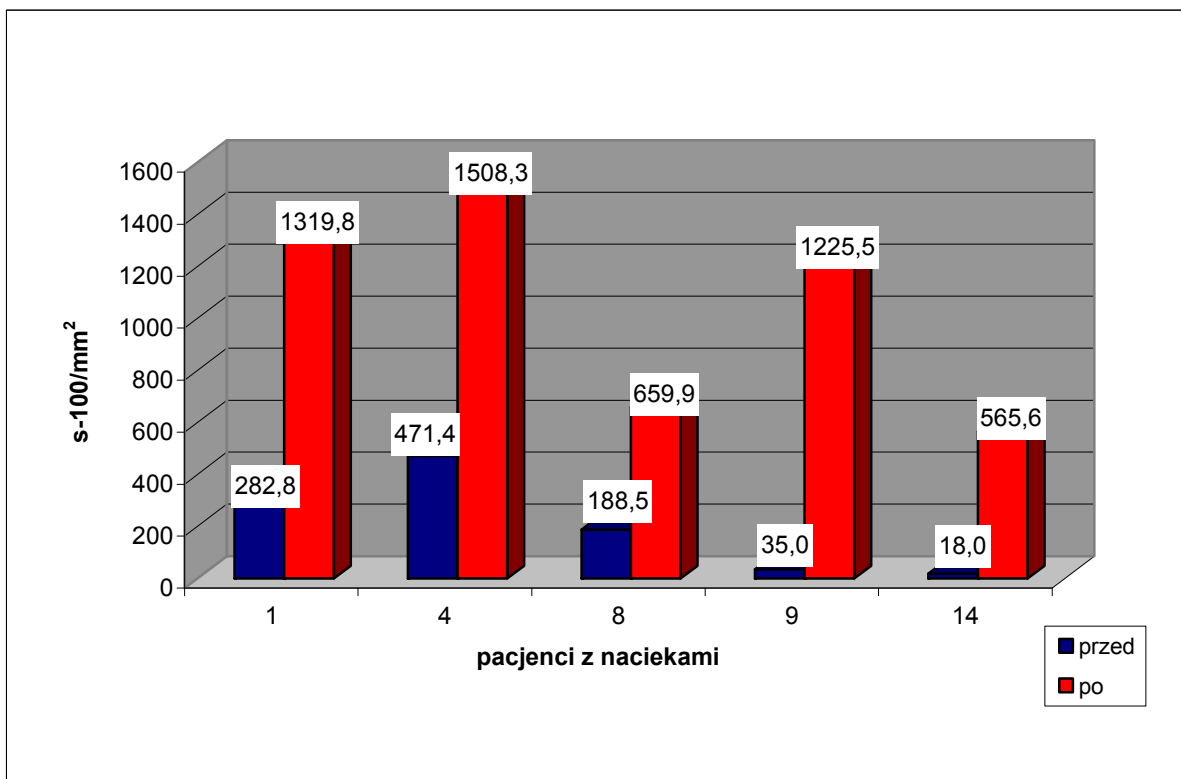
W obszarach nabłonka można prześledzić, że pośród komórek jednojądrzastych tworzących charakterystyczne skupiska, liczne z nich są S-100 pozytywne. Należy zaznaczyć, że w obrębie tych skupisk komórki z dodatnim odczynem tworzą pary z komórkami jednojądrzastymi S-100 negatywnymi o charakterze limfoidalnym (Ryc. 25). Ryciny 26a i b przedstawiają gęstość komórek S-100 pozytywnych, którą oceniono u 5 pacjentów z naciekami na terenie nabłonka (a) i w okolicy podnabłonkowej (b). Zwraca uwagę statystycznie znamienne wzrost komórek S-100 pozytywnych w obu obszarach błony śluzowej znad implantu w stosunku do materiału porównawczego pobranego od tych pacjentów ($P < 0,05$). Ponadto znamienne jest koncentracja znacznej liczby komórek S-100 pozytywnych w strefie podnabłonkowej w naciekach. Jednak nie ma korelacji między wzrostem komórek S-100 a powierzchnią nacieków.

7.2.2. Limfocyty T

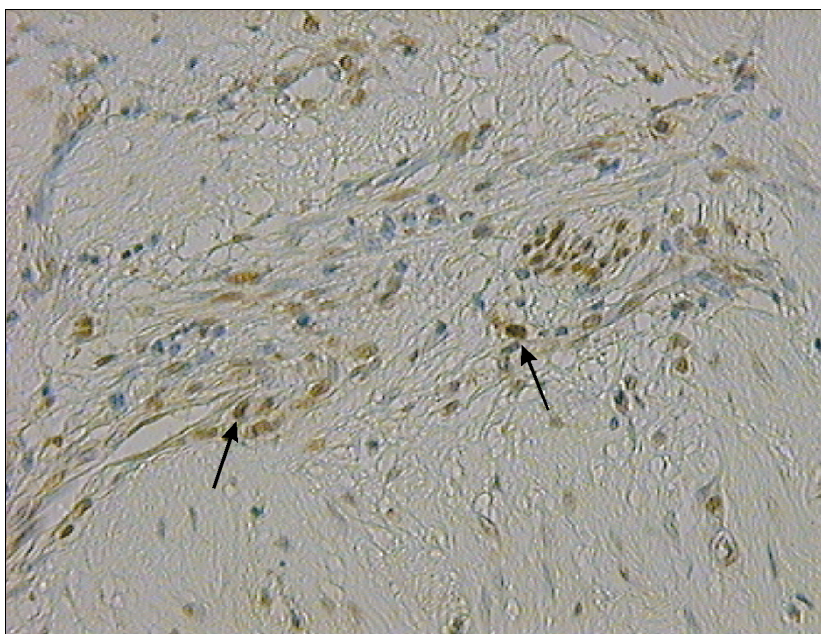
Limfocyty T identyfikowano na podstawie ekspresji antygenu CD45RO a ich subpopulację, ekspresji CD25. U większości komórek oba antygeny wykazują ekspresję powierzchniową, jednak w znacznym odsetku komórek pozytywny odczyn obserwuje się również na terenie ich cytoplazmy. W materiale porównawczym pobranym z okolicy planowanego łoża kostnego u większości pacjentów komórki CD45RO-pozytywne występowały głównie na terenie blaszki właściwej, gdzie koncentrowały się wokół naczyń krwionośnych tworząc niewielkie skupiska (Ryc. 27). W skupiskach wokółnaczyńowych około 20% komórek wykazuje ekspresję CD45RO, natomiast tylko pojedyncze komórki są CD25-pozytywne. Z tego powodu w dalszej części badań występowanie limfocytów CD45RO oraz CD25 analizowano w naciekach komórkowych, natomiast ocenę ilościową przeprowadzono u 5 pacjentów.



Rycina 26a. Rozkład gęstości komórek Langerhansa S-100 pozytywnych, w nabłonku u wybranej grupy pacjentów z naciekami w błonie śluzowej dziąsła znad implantów (po) i w odpowiednim materiale porównawczym (przed).



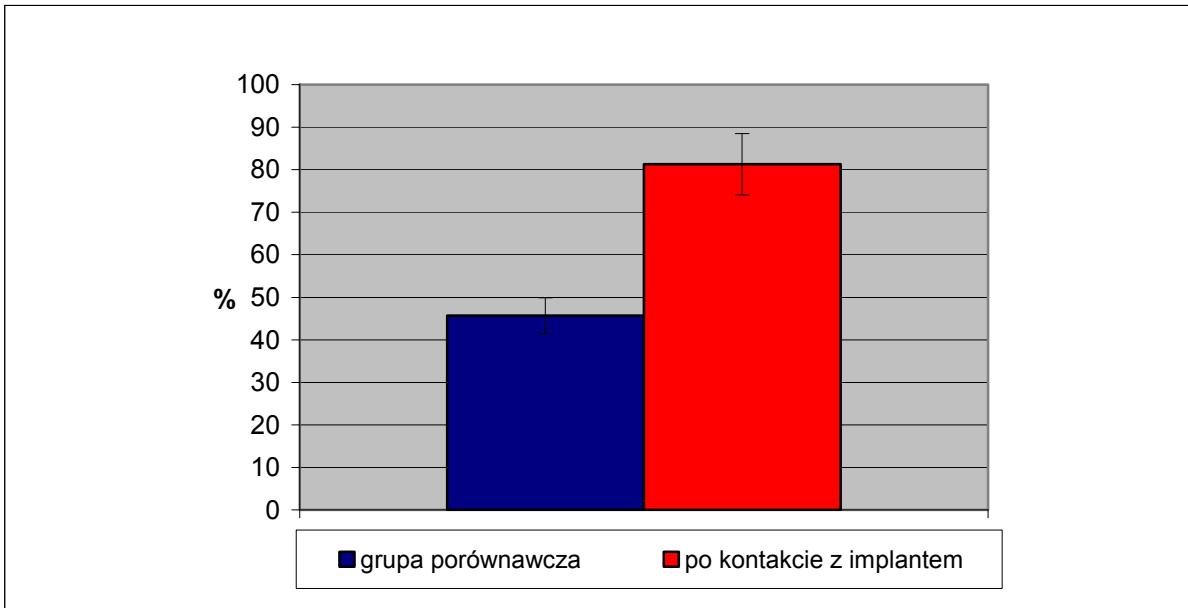
Rycina 26b. Rozkład gęstości komórek Langerhansa S-100 pozytywnych, w naciekach podnabłonkowych u wybranych pacjentów, analizowany w błonie śluzowej znad implantów (po) i w odpowiednim materiale porównawczym (przed).



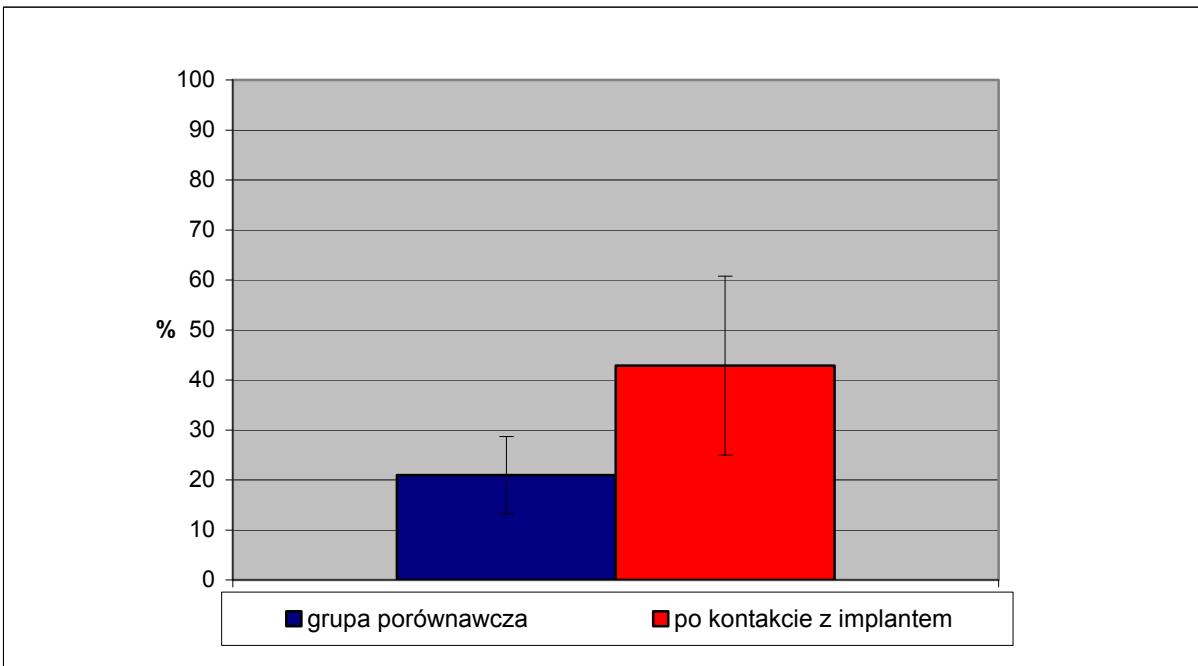
Rycina 27. Limfocyty T CD45RO-pozytywne (↑) w niewielkich skupiskach komórek wokół naczyń w błonie śluzowej dziąsła w materiale porównawczym. Powiększenie x 32.

We wszystkich analizowanych przypadkach na terenie nacieków zdecydowana większość komórek jest CD45-pozytywna .

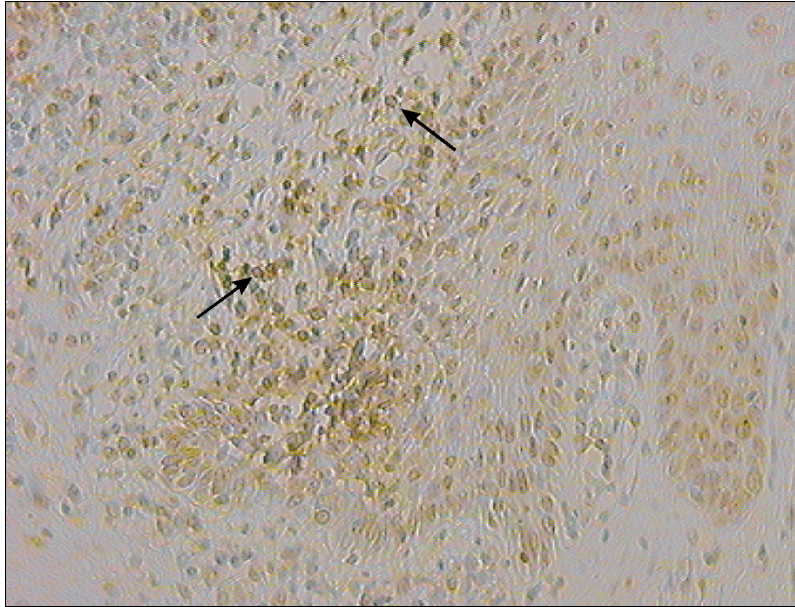
Jak przedstawiono na rycinie 28 w 5 szczegółowo ocenianych przypadkach odsetek komórek CD45RO statystycznie wzrasta z średnio 45,7% w materiale porównawczym do 81,3% po kontakcie z implantem. U tych samych pacjentów wzrasta również średni odsetek komórek CD25-pozytywnych z 21% do 42,9% (Ryc. 29). Zwrócono uwagę, że komórki CD45RO- i CD25-pozytywne stanowią najliczniej reprezentowaną grupę komórek w naciekach na terenie nabłonka, obok komórek S-100 pozytywnych (Ryc. 30a, 30b).



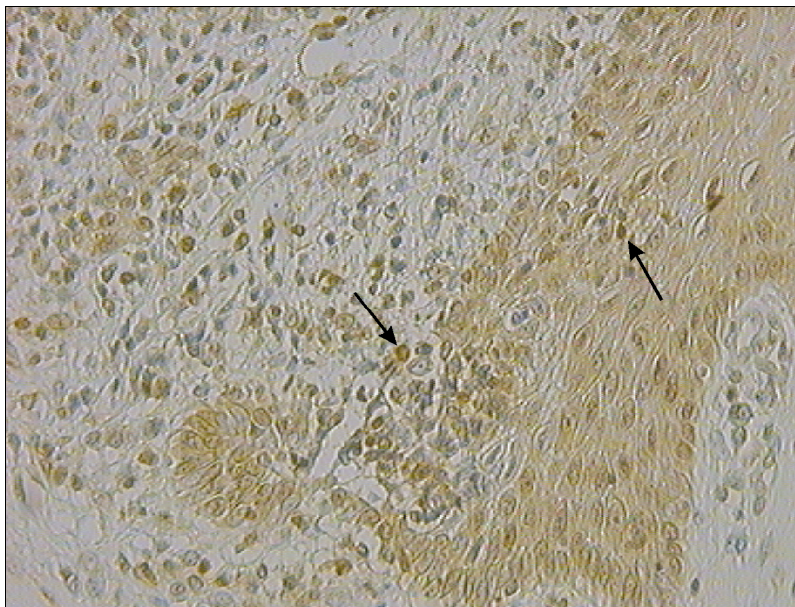
Rycina 28. Występowanie limfocytów CD45RO-dodatnich w naciekach komórkowych w błonie śluzowej dziąsła znad implantów i w odpowiednim materiale porównawczym.



Rycina 29. Występowanie limfocytów CD25-dodatnich w naciekach komórkowych w błonie śluzowej dziąsła znad implantów i w odpowiednim materiale porównawczym.



Rycina 30a. Limfocyty CD45RO-pozytywne (↑) skupione w okolicy podnabłonkowej, naciekające nabłonek. Fragment błony śluzowej pobranej po kontakcie z implantem. Powiększenie x 25.

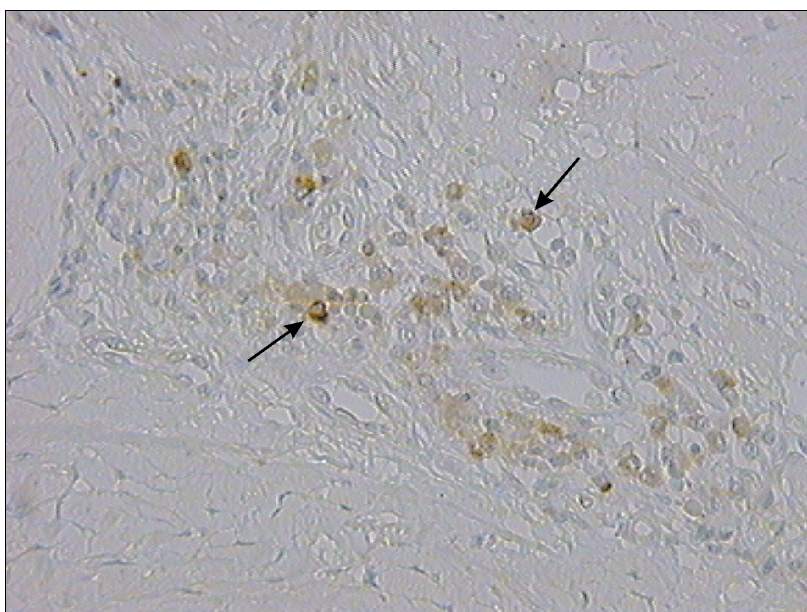


Rycina 30b. Limfocyty CD25-pozytywne (↑) skupione w okolicy podnabłonkowej, naciekające nabłonek. Fragment błony śluzowej pobranej po kontakcie z implantem. Powiększenie x 32.

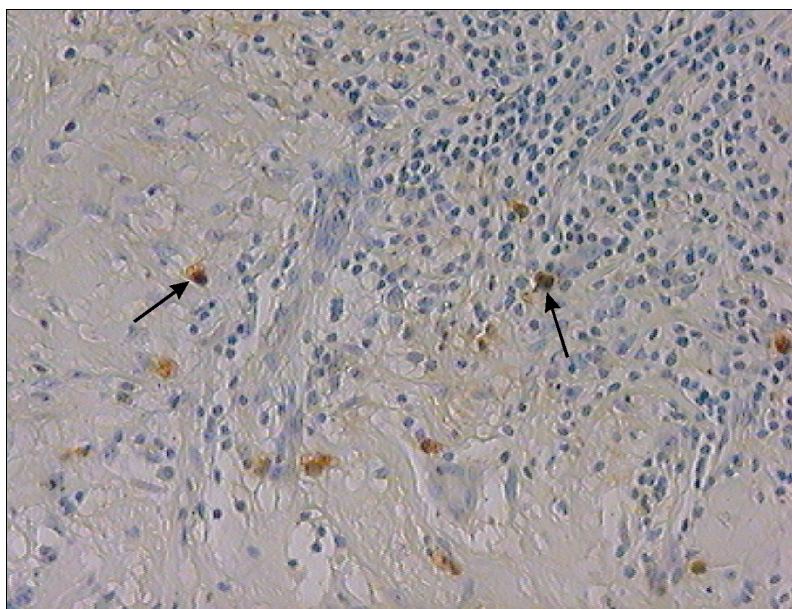
7.2.3. Limfocyty B

Limfocyty B na wszystkich etapach różnicowania, od postaci komórek młodych do komórek plazmatycznych, wykazują ekspresję CD79a. Komórki z dodatnim odczynem obserwowano na terenie tkanki łącznej błony śluzowej w obu badanych grupach. W materiale znad implantu limfocyty B oraz komórki plazmatyczne, spotyka się zazwyczaj pośród komórek tworzących niewielkie skupiska wokół naczyń, a pojedyncze z nich są rozproszone w tkance łącznej (Ryc. 31).

U 2 pacjentów, u których w materiale porównawczym wykazano nacieki utworzone przez granulocyty obojętnochłonne, limfocyty B i komórki plazmatyczne, w błonie śluzowej po kontakcie z implantem komórki CD79a-pozytywne są rozproszone na obwodzie nacieków podnabłonkowych, utworzonych przez komórki jednojądrzaste lub są rozproszone w tkance łącznej (Ryc. 32a).



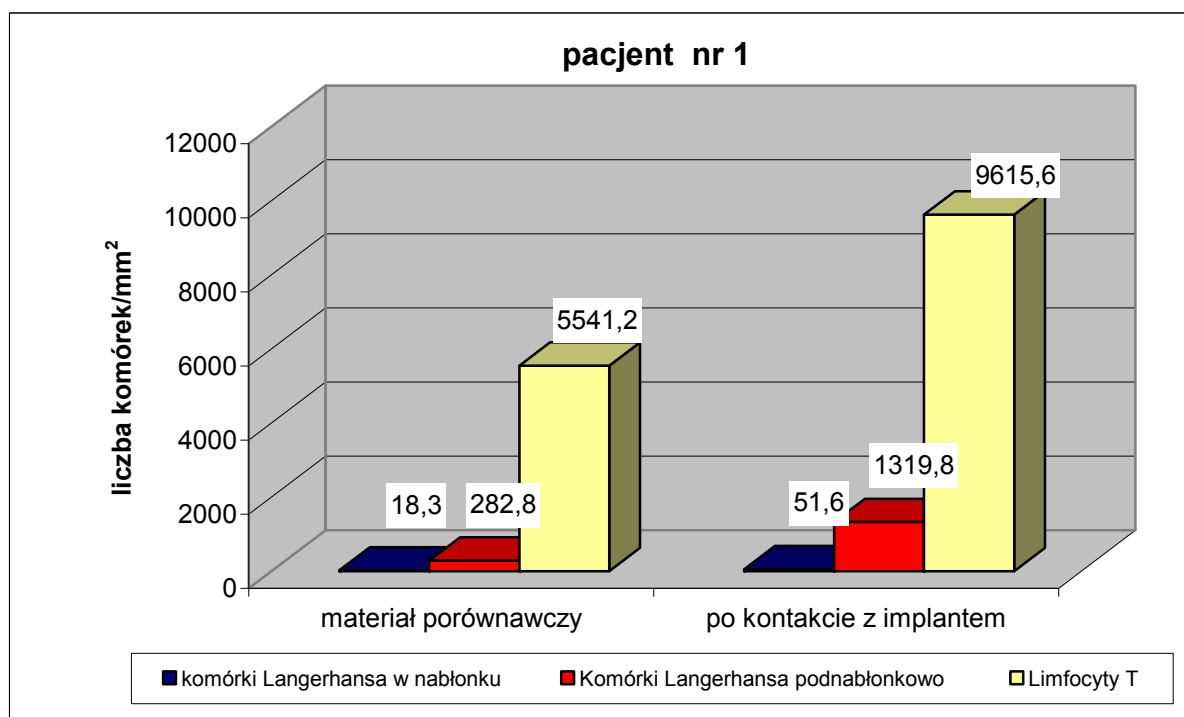
Rycina 31. Limfocyty B i komórki plazmatyczne z ekspresją CD79a (↑) rozproszone w blaszce właściwej błony śluzowej dziąsła znad implantu. Powiększenie x 32.



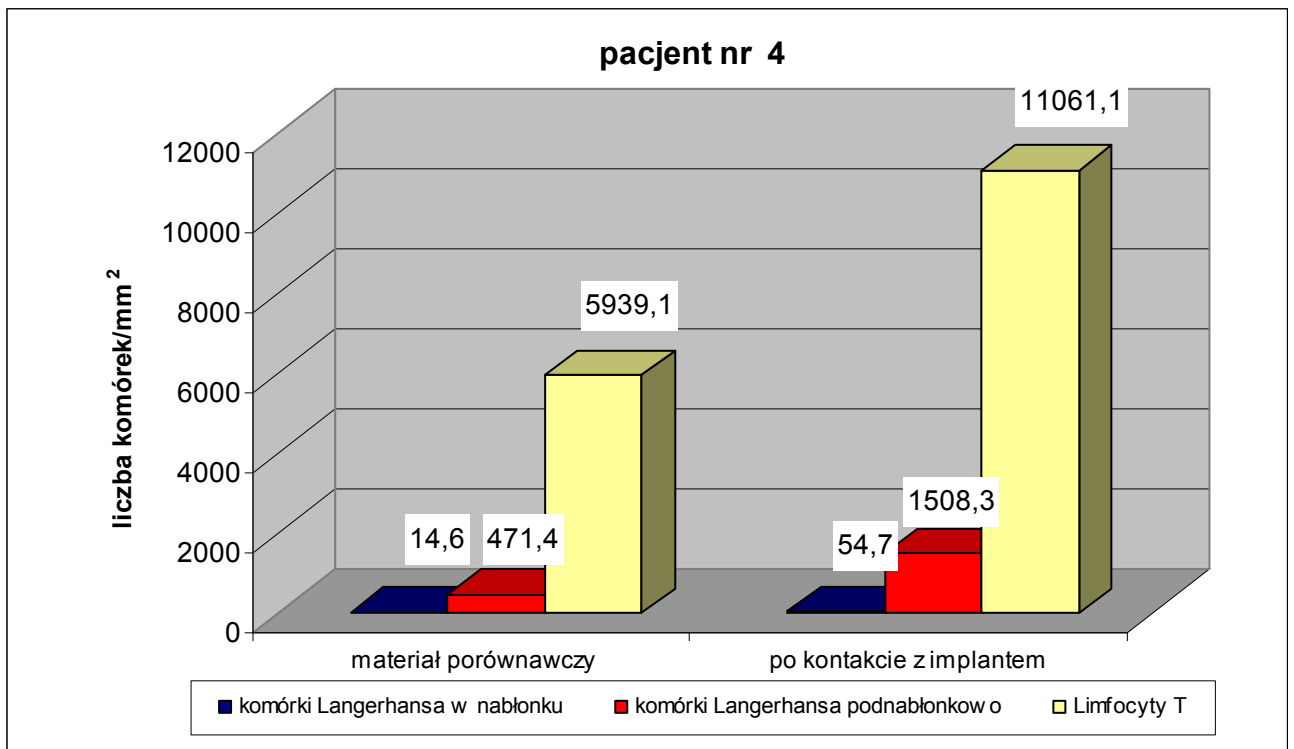
Rycina 32. Limfocyty B i komórki plazmatyczne z ekspresją CD 79a (↑) widoczne na obwodzie nacieków utworzonych przez komórki jednojądrzaste. Powiększenie x 25.

7.2.4. Skład komórkowy nacieków

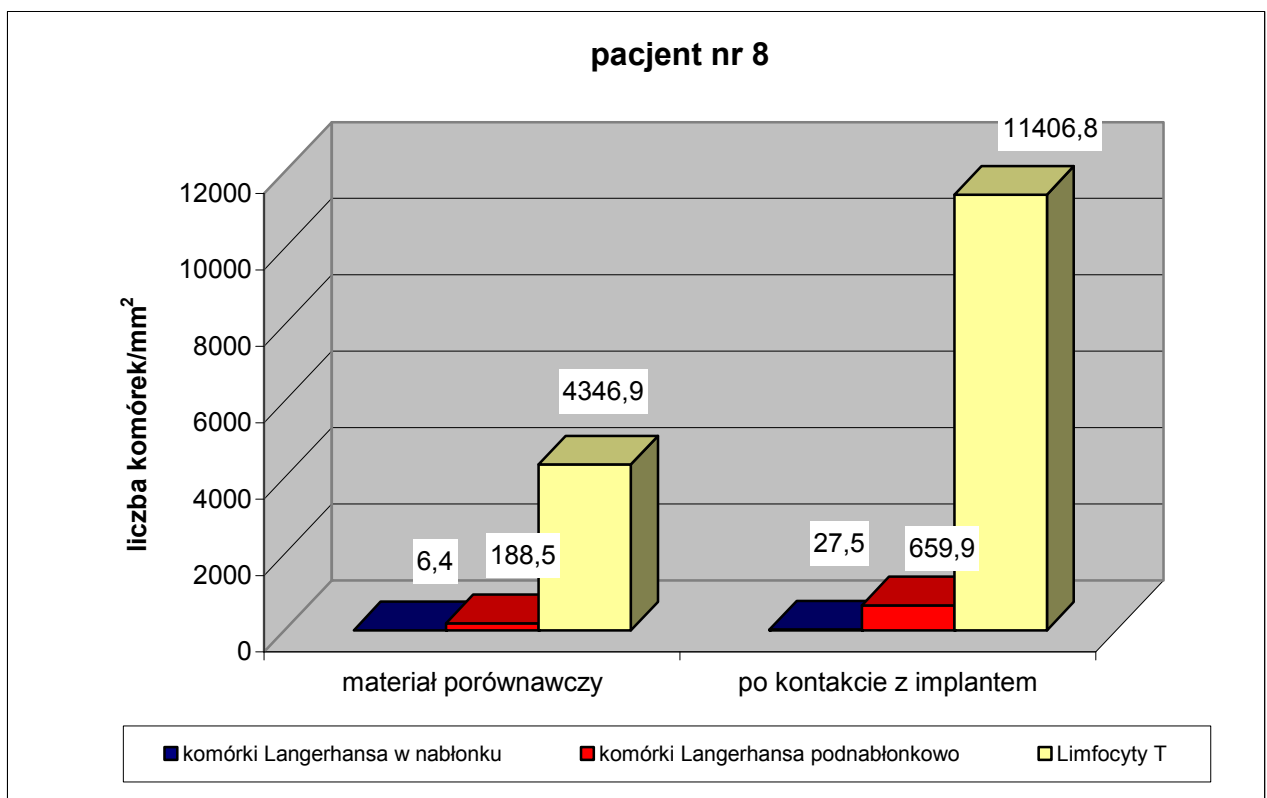
Ryciny 33a–e przedstawiają rozkład typów komórek, które występują w naciekach podnabłonkowych. W błonie śluzowej znad tytanowych implantów, u pięciu pacjentów z wyraźnymi naciekami pod nabłonkiem i na terenie nabłonka, dominującą populacją komórek są limfocyty CD45RO. W tych 5 przypadkach w odniesieniu do materiału porównawczego, obok wzrostu liczby komórek Langerhansa na terenie nabłonka, odnotowano statystycznie znamiennej wzrost liczby tych komórek w blaszce właściwej, w obszarze podnabłonkowym. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wzrostem liczby komórek Langerhansa występujących w naciekach podnabłonkowych, a wzrostem liczby limfocytów CD45RO w tym samym obszarze błony śluzowej. Limfocyty CD45RO-pozytywne stanowiły od 70,1 do 88% całej populacji komórek w nacieku (Ryc. 34). Pośród populacji CD45RO-pozytywnej, limfocyty z ekspresją CD25 stanowiły od 19,9 do 62,1% (Ryc. 35).



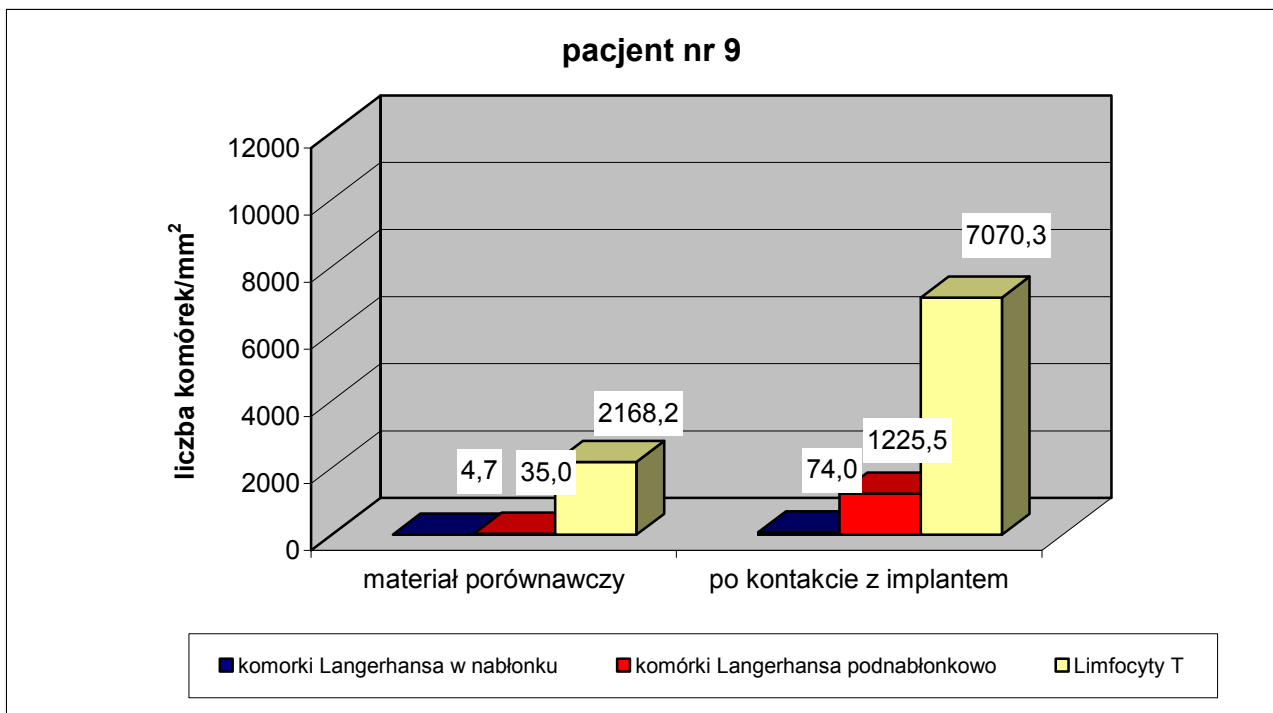
Rycina 33a.



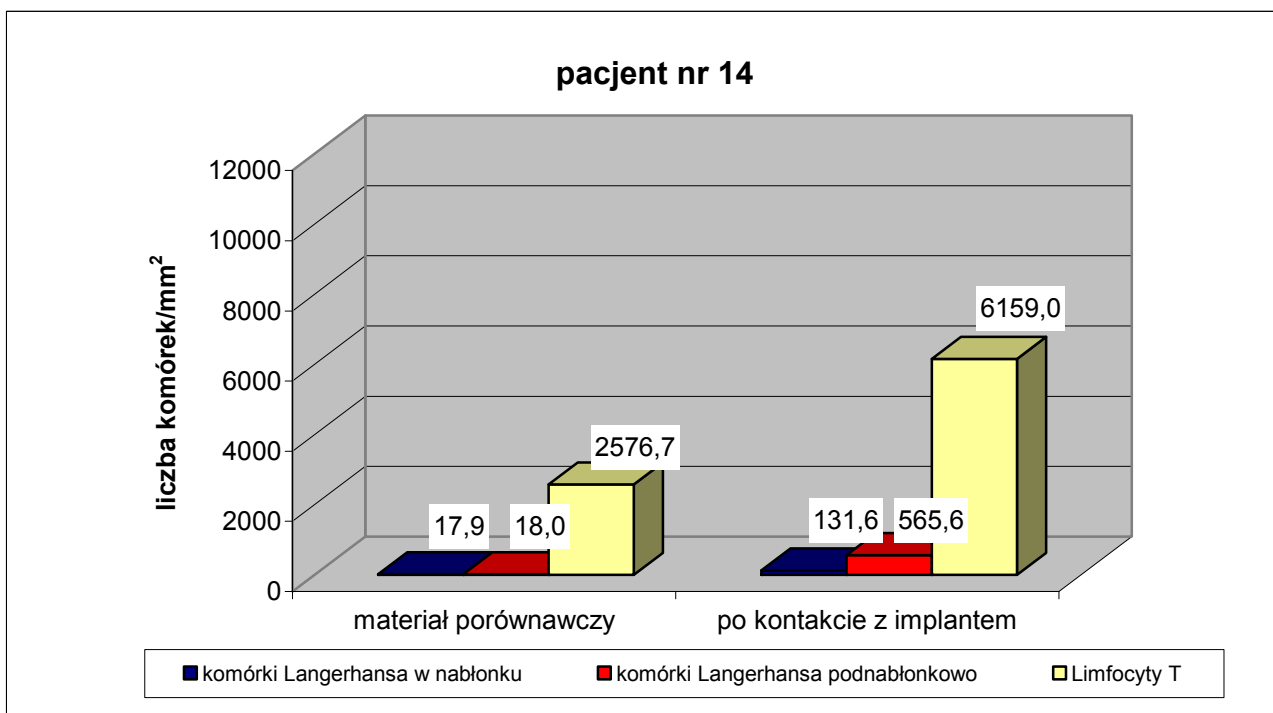
Rycina 33b



Rycina 33c.

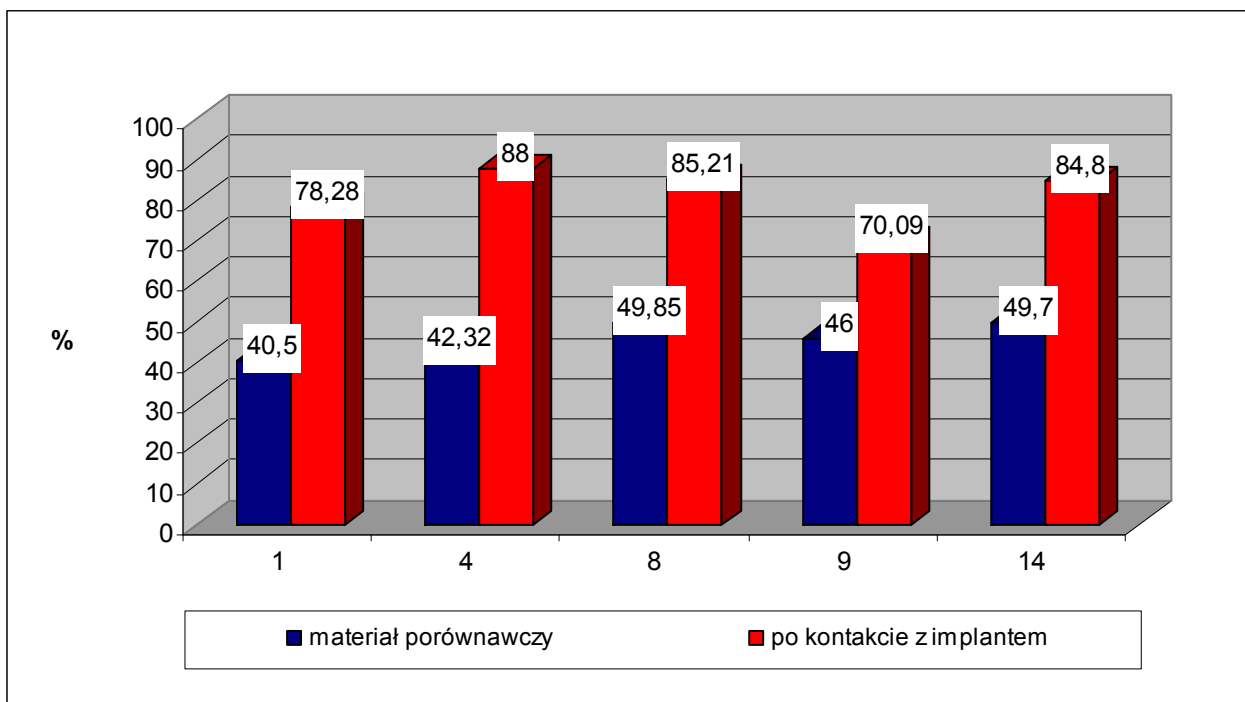


Rycina 33d.

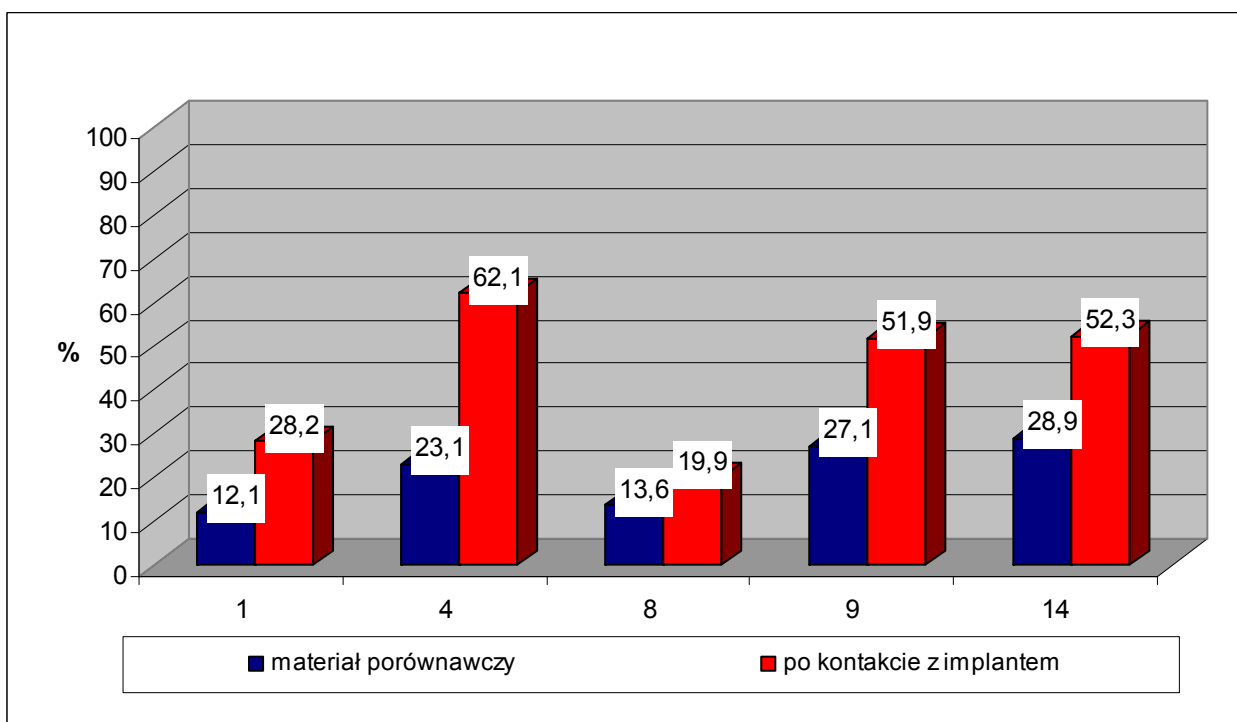


Rycina 33e.

Ryciny 33a–e. Wyniki analizy składu komórkowego w obrębie nacieków w błonie śluzowej dziąsła przed i po kontakcie z implantem w wyodrębnionej grupie (pacjenci 1, 4, 8, 9, 14)



Rycina 34. Występowanie limfocytów T CD45RO-dodatnich w skupiskach komórkowych w wyodrębnionej grupie pacjentów z naciekami w błonie śluzowej znad implantów i w odpowiednim materiale porównawczym.



Rycina 35. Występowanie limfocytów T CD25-dodatnich w skupiskach komórkowych w wyodrębnionej grupie pacjentów z naciekami w materiale po kontakcie z implantem i odpowiednim materiale porównawczym.

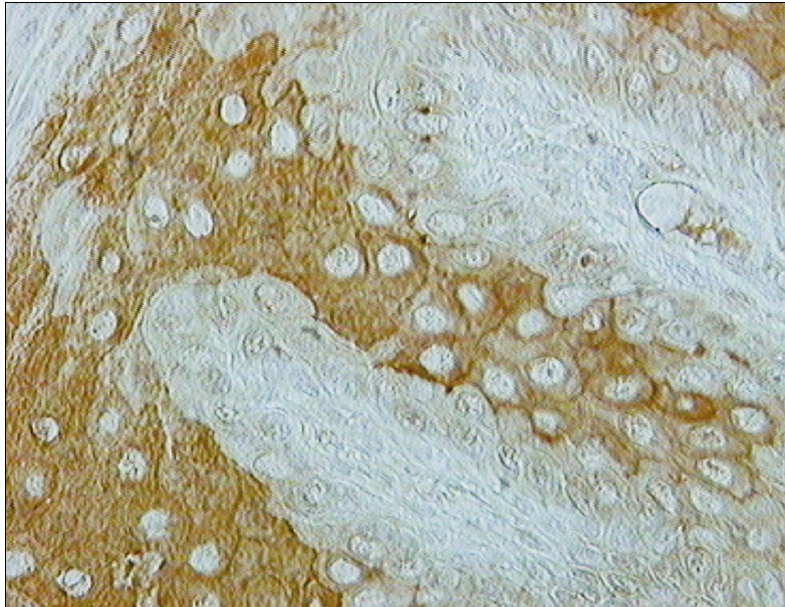
7.2.5. Cytokeratyny

W materiale porównawczym potwierdzono, że ekspresję CK19 wykazują keratynocyty warstwy podstawnej, natomiast od warstwy kolczastej nabłonka keratynocyty charakteryzują się ekspresją CK10 (Ryc. 36, 37).

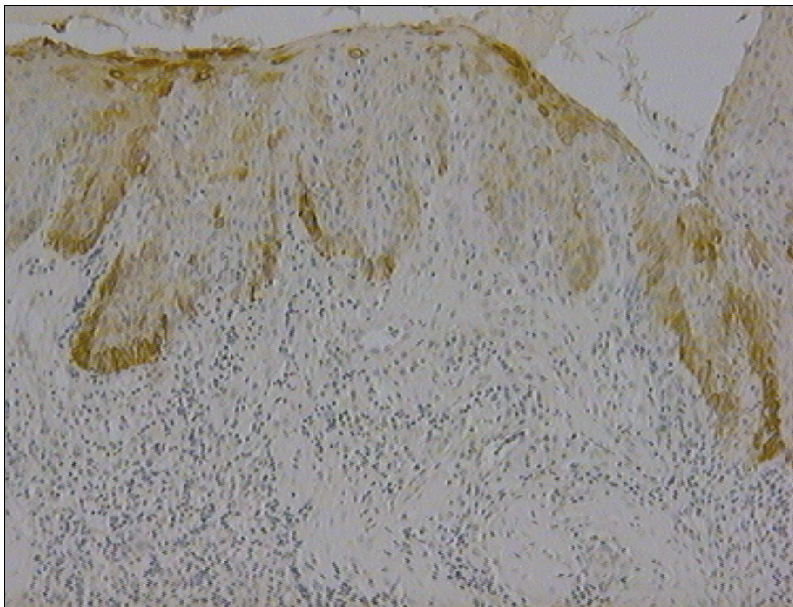
W błonie śluzowej znad implantu u wszystkich pacjentów obszary nabłonka z typowym rozkładem obu CK sąsiadują z obszarami, w których zachodzą istotne zmiany w występowaniu CK. W takich przypadkach CK19 lokalizowano w keratynocytach rozproszonych w warstwie kolczastej, a nawet w warstwie rogowej (Ryc. 38). Z kolei zmiany w ekspresji CK10 dotyczą wyraźnej redukcji liczby keratynocytów z dodatnim odczynem w obrębie warstwy kolczastej. W innych obszarach warstwy kolczastej keratynocyty CK10-pozytywne tworzą niewielkie skupiska otoczone komórkami CK10-negatywnymi (Ryc.39a,39b). Opisane powyżej zmiany w ekspresji CK są wyraźnie nasilone w tych obszarach nabłonka, które sąsiadują z naciekami.



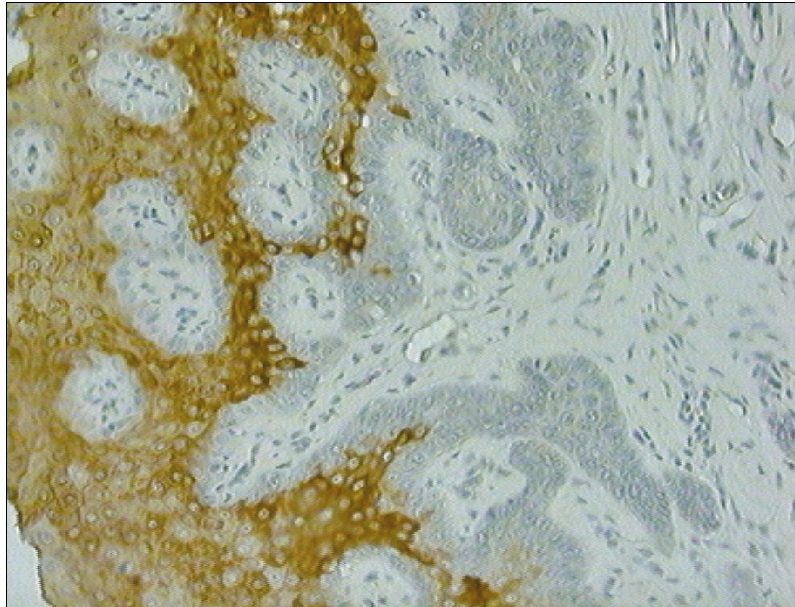
Rycina 36. Ekspresja CK19 w keratynocytach warstwy podstawnej nabłonka w grupie porównawczej. Powiększenie x 20.



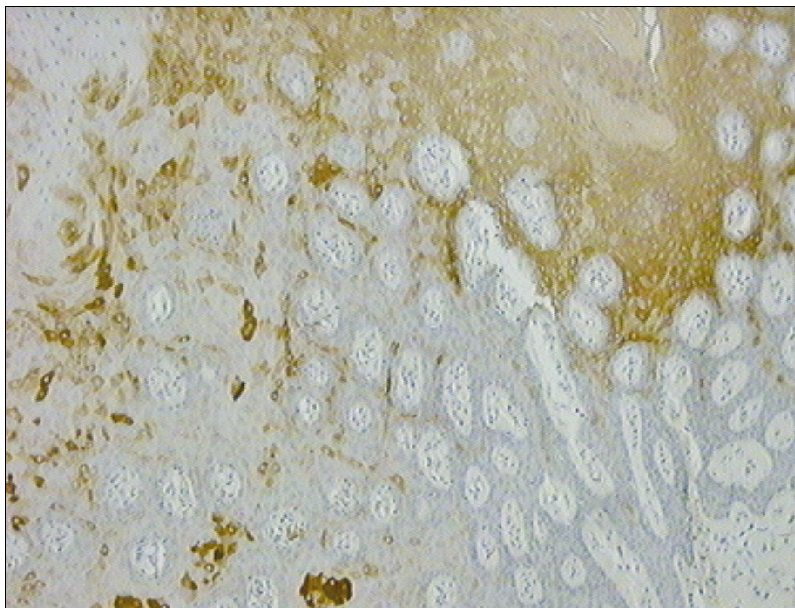
Rycina 37. Ekspresja CK10 w keratynocytach powyżej warstwy podstawnej w materiale porównawczym. Powiększenie x 40.



Rycina 38. Obszar błony śluzowej dziąsła po kontakcie z tytanowym implantem z widocznym naciekiem komórek limfoidalnych w strefie podnabłonkowej i na terenie nabłonka. Zwraca uwagę, że ekspresję CK19 wykazują keratynocyty we wszystkich warstwach nabłonka. Powiększenie x 12,5.



Rycina 39a.



Rycina 39b.

Rycina 39a, b. Charakterystyczna ekspresja CK10 w nabłonki dziąsła znad tytanowego implantu. Zwraca uwagę obszar z typowym rozkładem występowania CK10 (**a**) i sąsiadujący obszar z wyraźną redukcją keratynocytów CK10-pozytywnych (**b**). Powiększenie a x 20, b x 10.

8. Dyskusja

W pracy analizowano budowę morfologiczną błony śluzowej dziąsła pokrywającego części śródkostne tytanowych implantów w czasie ich wgajania. W każdym z 43 przypadków uzyskano pełną osteointegrację wszczepów, którą potwierdzono klinicznie jak i radiologicznie. Błona śluzowa nie wykazywała żadnych objawów świadczących o procesie zapalnym. W badaniach wykorzystano technikę implantacji późnej dwuetapowej. Metoda ta zapewniła wgajanie się wszczepu bez kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym, co ograniczało przenoszenie się procesów zapalnych, a także zapobiegało penetracji bakterii z innych rejonów jamy ustnej. Implantacja dwuetapowa umożliwiła również dwukrotne pobranie materiału badawczego z tej samej okolicy. Wycinki błony śluzowej pozyskane w pierwszej fazie leczenia posłużyły jako grupa porównawcza dla materiału pobranego z nad implantu w czasie jego odsłaniania po okresie 4–6 miesięcy.

Przystępując do analizy morfologicznej wykonano badania wstępne, mające na celu wybranie takich parametrów morfologicznych, które mogły być wykładnikami zmian w błonie śluzowej dziąsła po kontakcie z tytanowym implantem. Porównując kształt soplei nabłonkowych, grubość nabłonka, proliferację keratynocytów uznano, że są to cechy indywidualne lub cechy, które zmieniają się niezależnie od warunków, niekiedy na kolejnych przekrojach tego samego materiału. Równocześnie w dalszej analizie postanowiono uwzględnić skład komórkowy w poszczególnych warstwach błony śluzowej, występowanie skupisk komórek, a także ekspresję cytokeratyn w komórkach nabłonka jako wyznacznika procesu ich różnicowania.

Na podstawie tak przeprowadzonych badań w błonie śluzowej dziąsła po kontakcie z implantem, w każdym z przypadków wykazano przede wszystkim (1)

zmiany w składzie komórkowym na terenie nabłonka jak i blaszki właściwej, (2) występowanie nacieków o charakterystycznej kompozycji komórkowej, które były zlokalizowane podnabłonkowo, skąd infiltrowały nabłonek .

U wszystkich pacjentów po kontakcie z implantem wykazano wzrost liczby komórek Langerhansa na terenie nabłonka. W niektórych przypadkach liczba tych komórek wzrastała również w okolicy podnabłonkowej, w blaszce właściwej. Wzrost liczby komórek Langerhansa wykazano bez względu na liczbę wszczepów jak i rodzaj zastosowanego systemu implantologicznego (Osteoplant, Neoss, Ilerimplant). Zwrócono uwagę, że w błonie śluzowej po kontakcie z implantem zmienia się nie tylko liczba komórek Langerhansa, ale i ich rozmieszczenie. Komórki te tworzą skupiska na terenie nabłonka, czyli są rozmieszczone nierównomiernie, a ponadto występują we wszystkich jego warstwach. Z tego prawdopodobnie powodu u 2 z 15 pacjentów liczba komórek Langerhansa w nabłonku po kontakcie z implantem jest zbliżona do ich liczby w materiale porównawczym. Zwrócono uwagę, że komórki Langerhansa obserwowane w skupiskach na terenie nabłonka występują w bezpośrednim sąsiedztwie limfocytów T. Powyższe zmiany mogą wskazywać, że tytanowy wszczep jest rozpoznawany przez komórki układu immunologicznego gospodarza.

Na podstawie przeprowadzonych obecnie badań w błonie śluzowej nad implantu u większości pacjentów wykazano nacieki komórek zlokalizowane podnabłonkowo, infiltrujące nabłonek. Nacieki zdefiniowano wstępnie jako skupiska komórkowe zajmujące powierzchnię powyżej 0,01 mm² przekroju. W większości przypadków tak zdefiniowane nacieki komórkowe występują na pojedynczych przekrojach, ograniczając tym samym możliwość rozszerzenia ich badań o metody immunocytochemiczne. Z tego powodu szczegółową analizę fenotypową komórek

w naciekach można było przeprowadzić tylko u 5 pacjentów, u których nacieki pojawiały się na kolejnych przekrojach. W pozostałych przypadkach obok technik morfometrycznych w naciekach lub bezpośredniej ich okolicy potwierdzono występowanie limfocytów B lub T oraz komórek Langerhansa.

Na podstawie ilościowej analizy określono, że dominującą populacją komórek w naciekach są limfocyty T, CD45R0-pozytywne. Ponadto w tych samych naciekach znaczny odsetek komórek stanowi subpopulacja limfocytów T z ekspresją CD25, którym towarzyszą komórki Langerhansa. Zwraca uwagę, że wraz ze wzrostem liczby limfocytów T w naciekach w strefie podnabłonkowej, zwiększa się liczba komórek Langerhansa, co może sugerować, że jest to „obszar zbiorczy” dla komórek migrujących do blaszki właściwej błony śluzowej dziąsła, skąd dalej komórki te przemieszczają się do nabłonka.

Bezpośredni kontakt komórek Langerhansa z limfocytami T obserwowany na terenie nabłonka wskazuje na ich wzajemne oddziaływanie, a także ich interakcje z keratynocytami. Zmiany w komórkach nabłonkowych zarówno morfologiczne jak i w procesie ich różnicowania, wyrażone zmianą profilu cytokeratyn wskazują, że komórki te mogą odgrywać rolę komórek docelowych w procesach o charakterze immunologicznym.

Badania na psach przeprowadzone przez *Pongnarisorn i wsp.* wskazały na możliwość występowania nacieków komórkowych w błonie śluzowej dziąsła w przypadkach prawidłowo zintegrowanych z kością implantów, bez jakichkolwiek objawów stanów zapalnych. Podobnie do wyników przedstawionych w obecnej pracy autorzy wykazali, że najliczniejszą grupę komórek w naciekach stanowiły limfocyty T. W badaniach tych nie uwzględniono występowania komórek Langerhansa [Pongnarisorn, 2007].

Immunologiczny charakter zmian opisanych w obecnej pracy potwierdza obraz histopatologiczny błony śluzowej dziąsła w przypadkach zaburzeń osteointegracji wszczepów. Blaszką właściwą u tych pacjentów jest bogata w komórki, pośród których dominują granulocyty i różne postaci linii limfocytów B. Zwrócono uwagę na odmienną lokalizację nacieków - w głębszych warstwach blaszki właściwej, bez obecności komórek w warstwie podnabłonkowej oraz w nabłonku. Wyniki te są zgodne z obserwacjami *Gualini i wsp.* oraz *Berghlundh*, którzy w przypadkach zmian o charakterze *periimplantitis* za najliczniejszą grupę komórek uznają limfocyty B i komórki plazmatyczne [Gualini i wsp., 2003; Berghlundh, 2004]. Jak wykazano w badaniach *Sanz i wsp.* w procesach zapalnych przebiegających w błonie śluzowej wokół tytanowych implantów nacieki komórkowe stanowiły ponad 65% całkowitej powierzchni bioptatów, co znajduje potwierdzenie w analizowanych w obecnej pracy przypadkach [Sanz i wsp., 1991].

W błonie śluzowej pobranej z implantów z zaburzeniami osteointegracji obserwowano ponadto występowanie pozawłosowatych naczyń żylnych z wysokim śródbłonkiem (HEV). W ich świetle widoczne były granulocyty obojętnochłonne i komórki plazmatyczne. Wykazano, że HEV uczestniczą w migracji i recyrkulacji limfocytów z krwi do narządów limfatycznych [Girard i wsp., 1995; Szczepański M., 2001]. Ich obecność w błonie śluzowej dziąsła stwierdzono w tkankach objętych przewlekłym stanem zapalnym, w tym również w przewlekłym zapaleniu przyzębia [Freemont, 1988; Tomczak i wsp. 2008]. W świetle żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem w przebiegu *periimplantitis* obserwowano głównie neutrofile, granulocyty wielojądrzaste, rzadziej limfocyty [Kasprzak i wsp., 2006, Pinchback, 1996; Zoellner i wsp., 1989]. Przypuszcza się, że istnieje związek między rozplemem naczyń z HEV a zaawansowaniem choroby przyzębia [Kasprzak i wsp., 2006].

Naczynia o tej budowie występowały licznie w materiale porównawczym pobranym przed implantacją u dwóch pacjentów z naciekami o charakterze zapalnym, natomiast rzadko obserwowano je w błonie śluzowej po bezpośrednim kontakcie z tytanowym implantem. Należy podkreślić, że w przebiegu *periodontitis* nie opisano dotychczas zmian w występowaniu komórek Langerhansa.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na subpopulację limfocytów T immunoregulatorowych z ekspresją CD25+, które kontrolują aktywność limfocytów T w odpowiedzi na antygeny własne, narządowo swoiste [Itoh i wsp., 1999; Sun, 2006]. Jak wynika z badań Cavani i wsp. [1998; 2000] nad zjawiskiem tolerancji, rola limfocytów T regulatorowych polega na hamowaniu odpowiedzi immunologicznej poprzez sekrecję Interleukiny-10, co prowadzi do zmniejszenia stopnia uszkodzenia komórek, a także przez bezpośredni wpływ na komórki dendrytyczne¹. Wzrost liczby limfocytów T, CD25-pozytywnych w błonie śluzowej po kontakcie z tytanowym implantem, zwraca uwagę na dobrze poznany mechanizm działania tych komórek w przypadku nadwrażliwości kontaktowej na nikiel. Jony niklu podobnie jak jony innych metali np. chromu, kobaltu, złota w tym również tytanu są haptenami, które wykazują zdolność wiązania się z różnymi białkami zewnątrzkomórkowymi jak i wewnątrzkomórkowymi [Czarnobilska i wsp., 2007; Śpiewak i wsp., 2006]. Z badań nad mechanizmem reakcji przebiegających miejscowo wynika że kompleks białko + hapten jest rozpoznawany przez komórki Langerhansa, które transportują go do okolicznych węzłów chłonnych i prezentują limfocytom CD4 i CD8. Komórki te następnie migrują do miejsca reakcji nadwrażliwości. Limfocyty T CD8 mogą wywierać lokalnie wpływ cytotoksyczny na keratynocyty, indukując w nich apoptozę. Z kolei komórki CD4 pełnią w tych warunkach rolę komórek regulatorowych,

¹ Rodzina komórek, do których należą komórki Langerhansa.

wzmacniając bądź też hamując reakcje nadwrażliwości [Büdinger i wsp., 2000; Saint-Mezard i wsp., 2004, Martin i wsp., 2004].

W badaniach procesu wytwarzania tolerancji na nikiel szczególną uwagę zwrócono na rolę limfocytów regulatorowych CD4+CD25+. U pacjentów z alergią, jak i u osób bez objawów nadwrażliwości wykazano obecność komórek uczulonych na nikiel. Dowiedziono, że kliniczna manifestacja objawów nadwrażliwości zależała od liczby komórek CD4+CD25+ i ich aktywności [Cavani i wsp., 2003; Cavani, 2005].

Tytan uznawany jest za materiał wysoce biokompatybilny, choć w piśmiennictwie coraz częściej pojawiają się doniesienia sugerujące jego szkodliwy wpływ u na ogólny stan zdrowia pacjentów, jak również na zaburzenia procesów gojenia [Thomas i wsp., 2006; Nawaz i wsp., 2007]. Ponadto badania *in vitro* jak i *in vivo* wskazują, że mimo pasywnego działania zewnętrznej warstwy tlenków, w środowisku jamy ustnej może zachodzić elektrochemiczna jak i galwaniczna korozja. W ten sposób może dochodzić do uwalniania jonów tytanu, które powodują przebarwienia dziąsła, obrzęk, *gingivitis*, *stomatitis*, wysypkę skórą, rumień, jak również opóźnione gojenie [Chaturvedi, 2009; Koike i wsp., 2001]. Niskie pH oraz duże stężenie jonów fluoru niszczą ochronną warstwę tlenków, prowadząc do zaburzeń w procesie osteointegracji, a także do zmian w tkankach miękkich [Chaturvedi, 2009]. W dziąśle otaczającym wszczepy utracone w wyniku złamania lub utraty osteointegracji wykazano liczne makrofagi, których cytoplazma zawierała cząsteczki tytanu. Proces fagocytozy może stymulować makrofagi do uwalniania mediatorów zapalnych, które prowadzą do aktywacji osteoklastów, a w konsekwencji do resorpcji kości [Olmendo i wsp., 2003].

Kliniczna manifestacja nadwrażliwości na tytan to w większości przypadków zmiany o charakterze pokrzywki, rumienia, wyprysku, obrzęku, świądu na skórze

i/lub błonie śluzowej. Zmiany mogą ograniczać się do tkanek bezpośrednio kontaktujących się z tytanowym implantem, lub też zajmować bardziej odległe miejsca, aż po reakcję uogólnioną [Haug, 1996; Lhotka i wsp., 1998; Thomas i wsp., 2006; Thomas, 2000]. Niekiedy w wyniku nadwrażliwości dochodzić może do atopowego zapalenia skóry, nieprawidłowego gojenia i bolesności [Haug, 1996; Lhotka i wsp., 1998; Thomas, 2000]. Nieliczne przypadki reakcji nadwrażliwości w jamie ustnej tłumaczy się mniejszą liczbą komórek dendrytycznych w błonie śluzowej oraz zmniejszoną przepuszczalnością błony śluzowej w porównaniu ze skórą [Bass i wsp., 1993; Schramm i wsp., 2000]. Ponadto szacuje się, że do wywołania zmian w tkankach miękkich o charakterze nadwrażliwości konieczna jest 5–12-krotnie większa ekspozycja na alergen. Z drugiej natomiast strony glikoproteiny zawarte w ślinie tworzą na powierzchni tytanowego implantu swoistą barierę ochronną przed bezpośrednim kontaktem metalu z błoną śluzową [Thomas, 2000; Bass i wsp., 1993].

Obserwowane w obecnej pracy zmiany morfologiczne zachodzące w błonie śluzowej po kontakcie z tytanowym implantem, z uwagi na ich charakterystyczny obraz, wskazują na proces o charakterze immunologicznym. Nasuwa się pytanie, czy zmiany te są obrazem interakcji komórkowych prowadzących do wytworzenia lokalnej tolerancji w odpowiedzi na tytanowy wszczep śródkostny? Za takim przypuszczeniem przemawia niewątpliwie wzrost liczby komórek Langerhansa oraz limfocytów T (CD45RO, CD25). Z uwagi na podobny skład komórkowy jak i charakter zmian w komórkach nabłonkowych, obserwowane procesy przypominają obraz nadwrażliwości na nikiel. Brak jakichkolwiek objawów klinicznych u pacjentów po zabiegach implantacji można wiązać z wyraźnym wzrostem limfocytów T CD25-pozytywnych w błonie śluzowej pobranej z nad implantów.. Bliższe wytłumaczenie

procesów przebiegających w tkankach miękkich w wyniku kontaktu z tytanowym wszczepem śródkostnym wymaga niewątpliwie dalszych badań, na większej grupie pacjentów.

9. Wnioski

1. Kontakt błony śluzowej dziąsła z tytanowym wszczepem śródkostnym w procesie gojenia i osteointegracji wywołuje lokalne zmiany morfologiczne zarówno w warstwie nabłonkowej, jak i w blaszce właściwej.
2. W procesie gojenia w kontakcie z implantem tworzą się nacieki komórkowe złożone z subpopulacji limfocytów T i komórek Langerhansa.
3. W keratynocytach zaobserwowano występujące lokalnie zmiany w kinetyce procesów proliferacja/różnicowanie/apoptoza.
4. Charakterystyczny skład komórkowy w naciekach na terenie błony śluzowej dziąsła wskazuje, że w obszarach bezpośredniego kontaktu z implantem zachodzą procesy o charakterze immunologicznym.
5. Brak klinicznych objawów nadwrażliwości a także obecność komórek immunologicznie kompetentnych mogą sugerować, że tytanowy implant śródkostny jest rozpoznawany przez układ immunologiczny z wytworzeniem miejscowej tolerancji.

10. Streszczenie

Obecnie podkreśla się, że choć podstawą stabilności wszczepu jest jego trwała integracja z tkanką kostną to jednak wieloletni sukces leczniczy zależy w dużym stopniu także od stanu tkanek miękkich otaczających implant. Na materiale biopsyjnym, diagnozowano i dokumentowano, jak dotąd, procesy zachodzące w tkankach miękkich, wyłącznie w przypadkach niepowodzeń w leczeniu implantologicznym. Nie ma natomiast danych czy u pacjentów z pełną osteointegracją implantu, zachodzą jakiegokolwiek zmiany w błonie śluzowej dziąsła, które można opisać stosując kryteria morfologiczne.

Celem pracy była charakterystyka zmian w błonie śluzowej dziąsła, które mogą być następstwem kontaktu z tytanowym wszczepem śródkostnym w okresie jego wgajania.

Badania przeprowadzono na materiale klinicznym pobranym od 15 pacjentów, 9 kobiet i 6 mężczyzn w wieku 40–69 lat, którym implantowano od 1–4 dwuetapowych wszczepów śródkostnych wykonanych z tytanu klasy IV. We wszystkich badanych przypadkach stwierdzono pełną osteointegrację wszczepów, potwierdzoną klinicznie jak i radiologicznie. Materiał do badań morfologicznych stanowiła błona śluzowa dziąsła, bezpośrednio kontaktująca się z tytanowym wszczepem śródkostnym w okresie jego wgajania. Wycinek błony śluzowej pobierano po 4–6 miesiącach podczas odsłaniania wszczepu i porównano go z błoną śluzową dziąsła z tej samej okolicy, pobraną przed dokonaniem implantacji. W badaniach wstępnych, na podstawie analizy budowy błony śluzowej dziąsła wyróżniono parametry, które można było uznać za wykładniki zmian zachodzących w błonie śluzowej po bezpośrednim kontakcie z tytanowym implantem. Stosując program MicroImage,

v.4.0 (Olympus, MS Windows 98) współpracujący z mikroskopem świetlnym Olympus BX 50. oceniano występowanie skupisk komórkowych o powierzchni większej od 0,01 mm². Na skrawkach parafinowych (H+E) dla każdego wycinka określono całkowite pole skupisk komórkowych o powierzchni większej od 0,01 mm² oraz całkowite pole badanych przekrojów przez błonę śluzową. W kolejnym etapie badań, z zastosowaniem techniki immunocytochemicznej, analizowano skład komórkowy badanych skupisk na podstawie ekspresji markerów charakterystycznych dla poszczególnych typów komórek (S-100, CD45R0, CD25, CD79a). Stosując odpowiednie funkcje programu MicroImage określono odsetek komórek z dodatnim odczynem oraz ich gęstość na jednostkę powierzchni. Aktywność biologiczną komórek nabłonkowych oraz proces ich różnicowania charakteryzowano poprzez ekspresję białek cytokeratynowych (CK10, CK19).

Na podstawie przeprowadzonych badań u 5 pacjentów wykazano kilkakrotnie większą wartość całkowitej powierzchni skupisk komórkowych względem powierzchni analizowanych przekrojów. Dominującą populację komórek w skupiskach, zlokalizowanych pod nabłonkiem i na terenie nabłonka, stanowiły limfocyty T CD45RO-pozytywne (81,3%), z najliczniejszą subpopulacją komórek CD25-pozytywnych (42,9%). W nabłonku błony śluzowej znad wszystkich implantów wykazano natomiast istotny statystycznie wzrost ($p < 0,05$) liczby komórek Langerhansa w stosunku do materiału porównawczego. W obszarach nabłonka komórki Langerhansa występowały w bezpośrednim sąsiedztwie z komórkami limfoidalnymi CD45RO-pozytywnymi. W keratynocytach w obszarach nacieków zaobserwowano zmiany morfologiczne ze zwiększoną indukcją apoptozy, a także zmiany w profilu wydzielanych cytokeratyn, w porównaniu do grupy kontrolnej

Przeprowadzone badania pozwalają sądzić, że kontakt błony śluzowej dziąsła z tytanowym wszczepem śródkostnym w procesie gojenia i osteointegracji wywołuje lokalne zmiany morfologiczne zarówno w warstwie nabłonkowej, jak i w blaszce właściwej. W procesie gojenia w kontakcie z implantem tworzą się nacieki komórkowe złożone z subpopulacji limfocytów T i komórek Langerhansa. W keratynocytach nabłonka znad implantów zaobserwowano również występujące lokalnie zmiany w kinetyce procesów proliferacja/różnicowanie/apoptoza. Charakterystyczny skład komórkowy w naciekach na terenie błony śluzowej dziąsła wskazuje, że w obszarach bezpośredniego kontaktu z implantem zachodzą procesy o charakterze immunologicznym. Brak klinicznych objawów nadwrażliwości a także obecność komórek immunologicznie kompetentnych mogą sugerować, że tytanowy implant śródkostny jest rozpoznawany przez układ immunologiczny z wytworzeniem miejscowej tolerancji.

11. Abstract

It is nowadays emphasised that although the stability of an implant depends on its permanent integration with the osseous tissue, long-term healing success is also determined, to a large extent, by the condition of the soft tissues surrounding the implant. So far, processes taking place in the soft tissues have been diagnosed and documented on bioplastic material only in the cases of failures of implantological treatment. There are, however, no data confirming or denying any changes in the gingival mucosa in patients with complete implant osteointegration which could be described with the use of morphological criteria.

The aim of the study was to describe the changes in gingival mucosa which might result from contact with a titanium intraosseous implant during its healing period.

The study was conducted on clinical material collected from 15 patients, 9 women and 6 men aged 40–69 years, who had had 1–4 two-stage intraosseous implants made of titanium class IV inserted. In all the examined cases, complete implant osteointegration, confirmed clinically and radiologically, was found. The material for the morphological study included gingival mucosa being in direct contact with the titanium intraosseous implants during their healing period. The fragments of mucosa were collected after 4–6 months, during implant exposure, and were compared with the gingival mucosa from the same area collected before implantation. In the initial study, certain parameters indicating the changes occurring in the mucosa after direct contact with a titanium implant were distinguished on the basis of an analysis of the structure of gingival mucosa. The presence of cell concentrations greater than 0.01 mm^2 was determined with the use of the

MicroImage v.4.0 software (Olympus, MS Windows 98) and a light microscope Olympus BX 50. The total area of cell concentrations greater than 0.01 mm² and the total area of the investigated cross-sections through the mucosa were determined for every fragment on paraffin sections (H+E). At the next stage of the research, cell composition of the investigated concentrations was analysed, by means of the immunocytochemical technique, on the basis of the expression of markers characteristic for individual cell types (S-100, CD45R0, CD25, CD79a). The proportion of cells with a positive reaction and their density per unit of area were determined with the use of appropriate functions of the MicroImage software. The biological activity of epithelial cells and the process of their differentiation were characterized through the expression of cytokeratinous proteins (CK10, CK19).

On the basis of the study, a value of the total area of the cell concentrations several times greater in relation to the area of the analysed cross-sections was revealed in 5 patients. The dominant population of cells in the concentrations located under and within the epithelium included CD45RO-positive T lymphocytes (81.3%), with the most numerous subpopulation of CD25-positive cells (42.9%). A statistically significant increase ($p < 0.05$) in the number of Langerhans cells in relation to the comparative material was found in the mucosal epithelium from above all the implants. In the epithelial regions, Langerhans cells were located in the direct vicinity of lymphoid CD45RO-positive cells. In the keratinocytes in the areas of infiltrations, morphological changes with increased apoptosis induction were observed, in addition to alterations in the profile of the emitted cytokeratins, in comparison to the control group.

The studies led to the conclusion that contact of gingival mucosa with a titanium intraosseous implant during the healing and osteointegration processes causes local morphological changes both in the epithelial layer and lamina propria. Cell infiltrations composed of subpopulations of T lymphocytes and Langerhans cells emerge as a result of contact with an implant during the healing process. In the keratinocytes, local changes in the kinetics of the proliferation/differentiation/apoptosis process were observed. The characteristic cell composition in the infiltrations within the gingival mucosa proves that processes of an immunological character take place in the areas of direct contact with an implant. The lack of clinical symptoms of oversensitivity as well as the presence of immunologically competent cells may suggest that a titanium intraosseous implant is recognised by the immune system inducing local tolerance.

12. Piśmiennictwo

Abrahamsson J., Berglundh T., Lindhe J.: The mucosal barrier following abutment disreconnection. An experimental study in dogs. *J. Clin. Periodontol.*, 1997, 24, 568-572.

Abrahamsson J., Berglundh T., Sekino S., Lindhe J.: Tissue reactions to abutment shift an experimental study in dogs. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.*, 2003, 5, 82-88.

Al Jabbari Y., Nagy W.W., Iacopino A.M.: Implant dentistry for geriatric patients: a review of the literature. *Quintessence Int.*, 2003, 34, 4, 281-285.

Albrektsson T., Isidor F.: Consensus report of session IV. In: Lang N P, Karring T, eds. Proceedings of the First European Workshop on Periodontology. London: Quintessence, 1994, 365-369 .

Barrett A.W., Cruchley A.T., Williams D.M.: Oral mucosa Langerhans 'cells. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 1996, 7, 1, 36-58.

Bass J. K., Fine H., Cisneros G. J.: Nickel hypersensitivity in the orthodontic patients. *Am. J. Orthodont. Dentofacial. Orthoped.*, 1993, 103, 280-285.

Berglundh T., Gislason O., Lekholm U., Sennerby L., Lindhe J.: Histopathological observations of human periimplantitis lesions. *J. Clin. Periodontol.*, 2004, 31, 341-347.

Berglundh T., Linde L., Jonsson K., Ericsson I.: The topography of the vascular systems in the periodontal and periimplant tissues in the dog. *J. Clin. Periodontol.*, 1994, 21, 189-193.

Berglundh T., Lindhe J., Marinello C., Ericsson I., Liljenberg B.: Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin. Oral Implants Res.*, 1992, 3, 1, 1-8.

- Bibbs S.**, Fijneman R., Wiegant J., van Kessel A.G., van de Putte P., Backendorf C.: Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. *Genomics*, 1993, 16, 630–637.
- Brägger U.**, Karoussis I., Persson R., Pjetursson B., Salvi G., Lang N.: Technical and biological complications/ failures with single crowns and fixed partial dentures on implants: a 10-year prospective cohort study. *Clin. Oral Implants Res.*, 2005,16, 326-334.
- Brandt H.H.:** Wprowadzenie do implantologii. Urban & Partner, Wrocław, 1998, 22-26.
- Brånemark P.I.:** Introduction to osseointegration. In: Brånemark P.I., Zarb G.A., Albrektsson T., eds Tissue-Integrated prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry. Chicago : *Quintessence*, 1985, 211-232.
- Brew K.**, Dinakarbandian D., Nagase H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem. Biophys. Acta.*, 2000, 1477, 267-283.
- Bryant S.**, Zarb G.:Osseointegration of oral implants in older and younger adults. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 1998,13, 4, 492-499.
- Büdinger L.**, Herlt M.: Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy*, 2000, 55, 108-115.
- Carroll J. M.**, Albers K.M., Garlick J. A., Harrington R., Taichma L. B.: Tissue- and stratum-specific expression of the human involucrin promoter in transgenic mice. *PNAS*, 1993, 90, 21, 10270-10274.
- Cavani A.**, Nasorri F., Ottaviani C., Sebastiani S., De Pita O., Girolomoni G.: Human CD5+ regulatory cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J. Immunol.*, 2003, 171, 5760-5768.

- Cavani A.:** Breaking tolerance to nickel. *Toxicology* 2005, 209, 119-121.
- Cavani A., Mei D., Guerra E., Corinti S., Giani M., Pirrotta L., Puddu P., Girolomoni G.:** Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses: evidence for the presence of effector CD8⁺ T cells and regulatory CD4⁺ T cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1998, 111, 621-68.
- Cavani A., Nasorri F., Prezzi c., Sebastiani S., Albanesi C., Girolomoni G.:** Human CD4⁺ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses . *J. Invest. Dermatol.*, 2000, 114, 295-302.
- Chanavaz M.:** Patient screening and medical evaluation for implant and prosthetic surgery. *J. Oral Implant.*, 1998, 24, 222-229.
- Chaturvedi T. P.:** An overview of the corrosion aspect of dental implants (titanium and its alloys). *Indian J. Dent. Res.*, 2009, 20,1, 91-98.
- Czarnobilska E., Obtulowicz K., Wsołek K., Piętowska J., Śpiewak R.:** Mechanizmy alergii na nikiel. *Przeg. Lek.*, 2007, 64, 502-505.
- Daniels T. E.:** Human mucosal Langerhans' cells post-mortem identification of regional variations in oral mucosa. *Invest. Dermatol.*, 1984, 21-24.
- Deas D. E., Mikotowicz J. J., Mackey S. A., Moritz A. J.:** Implant failure with spontaneous rapid exfoliation: case reports. *Implant Dent.*, 2002, 11, 235-242.
- Egusa H., Ko N., Shimazu T., Yatani H.:** Suspected association of an allergic reaction with titanium dental implants: a clinical report. *J. Prosthet. Dent.*, 2008, 100, 344-347.

Ericsson I., Berglundh T., Marinello C., Liljenberg B., Lindhe J.: Long standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin. Oral Implants Res.*, 1992, 3,,3, 99-103.

Esposito M., Hirsch J. M., Lekholm U., Thomsen P.: Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. Success criteria and epidemiology. *Eur.J. Oral Sci.*, 1998, 106, 527-551.

Esposito M., Hirsch J. M., Lekholm U., Thomsen P.: Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants.(II) Etiopathogenesis. *Eur. J. Oral Sci.*, 1998,106, 721-764 .

Feliciani C., Gupta A. K., Sauder D. N.: Keratinocytes and cytokine/growth factors. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 1996, 7, 300-318.

Feloutzis A., Lang N. P., Tonetti M. S., Bürgin W., Brägger U., Buser D., Duff G. W. , Kornman K. S.: IL-1 gene polymorphism and smoking as a risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clin. Oral Implants Res.*, 2003, 14, 1, 10-17.

Flatebø R. S., Johannessen A. C., Grønningsaeter A. G., Bøe O. E., Gjerdet N. R., Grung B., Leknes K. N.: Host response to titanium dental implant placement evaluated in a human oral model. *J. Periodontol.*, 2006, 77, 7, 1201-1210.

Fransson C., Lekholm U., Jemt T., Berglundh T.: Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin. Oral Implants Res.*, 2005, 16, 440-446.

Freemont J. A.: Functional and biosynthetic changes in endothelial cells of vessels in chronically inflamed tissues: evidence for endothelial control of lymphocyte entry into diseased tissues. *J. Pathol.*, 1988, 155, 3, 225-230.

Garg K., Winkler S.: Dental implants and the geriatric patient. *Implant Dent.*, 1997, 6, 3,168-173.

Gerard J. P., Spronger T. A.: High epithelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. today*, 1995, 16, 9, 449-457.

Gislason O., Lekholm U., Sennerby L., Lindhe J.: Histopathological observations of human periimplantitis lesions. *J. Clin. Periodontol.*, 2004, 31, 341-347.

Göger S., Michel J., Meyle J.: Establishment and characterisation of immortalized human gingival keratinocyte celllines. *J. of Periodontal Research*, 2008, 43, 6, 604-614.

Gorman L. M., Lambert P. M., Morris H. F., Ochi S., Winkler S.: The effect of smoking on implant survival at second stage surgery: DICRG interim report No.5. *Implant Dent.*, 1994, 3, 165-168.

Grosogeat B., Boinet M., Dalardb F., Lissac M.: Electrochemical studies of the corrosion behaviour of titanium and the Ti-6Al-4V alloy using electrochemical impedance spectroscopy. *Bio-Medical Materials and Engineering.*, 2004, 14, 323-331.

Gualini T., Berglundh T.: Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesion at implants. *J. Clin. Periodontol.*, 2003, 30, 14-18.

Haas R., Haimbock W., Mailath G., Watzek G.: The relationship of smoking on periimplant tissue: a retrospective study. *J. Prosthet. Dent.*, 1996, 76, 6, 592-596.

Hahn J.: One piece root form implants: A return to simplicity. *J. Oral Implantol.*, 2005, 31, 2, 77-84.

Hasseéus B., Jontell M., Bergenholtz G., Dahlgren U. I.: Langerhans cells from human oral epithelium are more effective at stimulating allogenic T cells in vitro than Langerhans cells from skin. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, 136, 483-489.

Hasskarl J., Velupillai P., Münger K.: Increased in vitro lifespan of primary human keratinocytes correlates with decreased migration. *Invest. Dermatol.*, 2006,126,1179-1181.

Haug H. R.: Retention of asymptomatic bone plates used for orthognatic surgery and facial fractures. *J. Oral Maxillofac. Surg.*,1996,,54, 611-617.

Hinode D., Tanabe S., Yokoyama M., Fujisawa K., Yamauchi E., Miyamoto Y.: Influence of smoking on osseointegrated implant failure: a meta-analysis. *Clin. Oral Implants Res.*, 2006, 17, 4, 380-385.

Hohl D., Viragh P. A., Arniguet-Barras F., Gibbs S., Backendorf C., Huber M.: The small proline-rich proteins constitute a multigene family of differentially regulated cornified cell envelope precursor proteins. *Invest. Dermatol.*,1995, 104, 902–909.

Hsu S.M., Raine L., Fanger H.: The use of antiavidin antibody and avidin biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am. J. Clin. Pathol.* 1981, 75, 734-738.

Hultin M., Bostrom L., Gustafsson A.: Neutrophil response and microbiological findings around teeth and dental implants. *J. Periodontol.*, 1993, 69, 1413-1418.

Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N., Kuniyasu Y., Shimizu J., Otsuka F., Sakaguchi S.: Thymus and autoimmunity : Production of CD25+CD24+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.*, 1999, 162, 5317-5326.

Jańczuk Z., Banach J.: Choroby błony śluzowej jamy ustnej i przyzębia. PZWL, Warszawa, 2004, 232-241.

Jańczuk Z.: Periimplantitis a periodontitis. Uwarunkowania anatomiczno-czynnościowe i etiopatogenetyczne. *Quintessence Periodontologia/Implanty.*, 2001, 45-48.

Jarząb G., Kołodziejczyk Z., Różyło T. K.: Wszczepy śródkostne zębowe. *Czas. Stomat.*, 1985, 38, 11\12, 798-802.

Jones J. K., Toplett R. G.: The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 1992, 50, 237-239.

Jundziłł - Bieniek E., Maciejewska I.: Implantologia - od starożytności do współczesności. *Implantoprotetyka*, 2006, 7, 1, 35-40.

Kamińska A., Krakowska J.: Zastosowanie protez overdenture wykonanych na implantach w rehabilitacji pacjentów z bezzębną żuchwą. *Twój Przeg. Stomat.*, 2002, 3, 122-127.

Karoussis I. K., Salvi G. E., Heitz-Mayfield L. J., Bragger U., Hammerle C. H., Lang N. P.: Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin. Oral Implant Res.*, 2003, 14, 3, 329-339.

Kasprzak A., Hausmann M., Makowska A., Biczysko-Murawa A.: Analiza zmian histopatologicznych dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. *Dental Forum*, 2006, 2, XXXIV, 9-18.

Kasprzak A., Małkowska A., Surdacka A., Hausmann M., Przybyszewska W.: Analiza fenotypu komórek nacieków zapalnych w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. *Dental Forum*, 2009, 1, 37, 15-26.

Kivelä-Rajamäki M., Maisi P., Srinivas R., Tervahartiala T., Teronen O., Husa V., Salo T., Sorsa T.: Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-

8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J. Periodont. Res.*, 2003, 38, 6, 583-590.

Kmieć Z.: Histologia i cytofizjologia zęba i jamy ustnej. Urban&Partner, Wrocław, 2007, 100-101,115-117.

Knychalska-Karwan Z.: Fizjologia i patofizjologia błony śluzowej jamy ustnej. Czelej, Lublin, 2002, 19-21.

Kock B., Wagner W.: Implantologia. Urban&Partner, Wrocław, 2004, 4-5.

Koczorowski R., Hemerling M., Szponar E., Wiśniewska-Spychała B.: A study of the bacterial flora of an intrabony pocket after the loss of an implant caused by periimplantitis. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2007, 16, 6C, 124-129.

Koczorowski R., Hemerling M.: Implantoprotetyczne leczenie pacjentów w wieku podeszłym. *Stomat. Współcz.*, 2007,14, 4, 23-30.

Koczorowski R., Hemerling M.: Mikroflora bakteryjna łoża implantów niezintegrowanych z kością identyfikowana testem Perio-Analzy. *Implantoprotetyka*, 2009, 10, 2, 35, 3-8.

Koike M., Fujii H.: In vitro assessment of corrosive properties of titanium as a biomaterial. *Am. J. Med. Sci.*, 2007, 334, 215-218.

Konttinen Y. T., Lappalainen R., Laine P., Kitti U., Santavirta S., Teronen O.: Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. *Int. J. Periodont. Restor. Dent.*, 2006, 26, 2, 135-41.

Kornman K. S., Crane A., Wang H. Y., di Giovine F. S., Newman M. G., Pirk F. W., Wilson T. G. Jr, Higginbottom F. L., Duff G. W.: The Interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 1997, 24, 72-77.

Kotkowski G.: Periimplantitis. *Twój Mag. Med.*, 2002, 4, 53-60.

Kryst L.: Chirurgia szczękowo-twarzowa. PZWL, Warszawa, 2007, 536-537.

Küpper H.: Pure titanium as an alternative material in restorative dentistry. *Quintessence Dent. Tech.*, 1995, 15, 143-152.

Lalor P. A., Revell P. A., Gray A. B., Wright S., Railton G. T., Freeman M. A.: Sensitivity to titanium a cause of implant failure? *J. Bone Joint Surg.*, 1991, 73, 1, 25-28.

Leonhardt A., Renvert S., Dahlen G.: Microbial findings at failing implants. *Clin. Oral. Implants. Res.*, 1999, 10, 5, 339-345.

Lhotka C. G., Szekeres T., Fritzer-Szekeres M., Schwarz G., Steffan I., Maschke M., Dubsky G., Kremser M., Zweymüller K.: Are allergic reactions to skin clips associated with delayed wound healing? *Am. J. Surg.*, 1998, 176, 320-323.

Ma J., Kitti U., Teronen O., Sorsa T., Husa V., Laine P., Rönkä H., Salo T., Lindqvist C., Konttinen Y. T.: Collagenases in different categories of peri-implant vertical bone loss. *J. Dent. Res.*, 2000, 79, 11, 1870-1873.

Majewski S.: Późne powikłania poimplantacyjne (biologiczne i mechaniczne) oraz propozycje postępowania profilaktyczno-terapeutycznego. *Implantoprotetyka*, 2006, 7, 4, 30-42.

Martin S. F.: T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions: implications for allergic and autoimmune disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, 134, 186-198.

Mc Guire M. K., Nunn M.: Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J. Periodontol.* 1999, 70, 49-56.

Mc Cracken M.: Dental implant material: commercially pure titanium and titanium alloys. *J. Prosthodont.*, 1999, 8, 40-43.

Mckinney R. V. Jr, Steflik D. E. , Koth D. L.: The epithelium dental implant interface. *J. Oral. Implant.* 1988, 13, 622-641.

Mckinney R. V. Jr, Steflik D. E., Koth D. L.: Per, Peri, or trans? *J. Prosthet. Dent.*, 1998, 52, 297-269.

Mckinney R. V. Jr, Steflik D. E., Koth D. L.: The biological response to the single cristal sapphire endosteal dental implant.: scanning electron microscopic observations. *J. Prosthet. Dent.*, 1984, 51, 372-379.

Mckinney R. V., Marchetti C., Farina A., Cornaglia A.: Microscopic, immunocytochemical and ultrastructural properties of periimplant mucosa in humans. *J. Periodontol.*, 2002, 73, 555-563.

Mierzwińska-Nastalska E., Feder T., Spiechowicz E.: Leczenie implantoprotetyczne z zastosowaniem wszczepów systemu Leader. *Protet. Stomat.*, 2006, LVI, 5, 367-373.

Mierzwińska-Nastalska E., Jaworska M., Łomżyński Ł.: Wpływ czynników ogólnoustrojowych na wyniki leczenia implantoprotetycznego. *Protet. Stomat.*, 2007, LVII, 6, 391-396.

Mieszkowska J.: Wszczepianie zębów z tworzyw sztucznych. *Czas. Stomat.*, 1957, 11 ,683-686.

Miller A., Jędrzejczak W.W.: Komórki dendrytyczne w immunoterapii. *Postępy Biologii Komórki* 2001,28,51-68

Mombelli A.: Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 2002, 28, 177-189.

Morais J.A., Heydecke G., Pawliuk J., Lund J.P., Feine J.S.: The effects of mandibular two-implant overdentures on nutrition in elderly edentulous individuals. *J. Dent. Res.*, 2003, 82, 1, 53-58.

- Nawaz M., Wall B. M.:** Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS syndrome): suspected associated with titanium bioprosthesis. *J. Oral Rehabil.*, 2001, 28, 540-548.
- Nevins M., Mellonig J. T.:** Implant Therapy. *Quintessence*, 1998, 2, 53-55.
- Olmendo D., Fernández M. M., Gugliemotti M. B., Cabrini L. C.:** Macrophages related to dental implant failure. *Implant Dent.*, 2003, 12, 1, 75-80.
- Orlicki R., Kłaptocz B.:** Tytan i jego stopy - właściwości, zastosowanie w stomatologii oraz sposoby przetwarzania. *Inżynieria Stomatol. Biomat.*, 2003, 1, 1, 3-8.
- Panagakos F. S., Aboyousssef H., Dondero R., Jandinski J. J.:** Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant cervical fluid: a pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 1996, 11, 794-803.
- Pelissier A., Ouhayoun J.P., Sawaf M.H., Forest N.:** Changes in cytokinin expression during the development of the human oral mucosa. *J. Period. Res.*, 1992, 27, 6, 558-592.
- Piatelli A., Scarano A., Piatelli M.:** Histologic observations on 230 retrieved dental implants: 8 years experience (1989-1996). *J. Periodont.*, 1998, 69, 178-184.
- Pinchback J. S., Taylor B. A., Gibbins J. R., Hunter N.:** Microvascular angiopathy in advanced periodontal disease. *J. Pathol.*, 1996, 179, 2, 204-209.
- Pohler O. E. M.:** Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Int. J. Care Injured.*, 2000, 31, 7-13.
- Pongnarisorn N. J., Gemmell E., Tan A. E. S., Henry P. J., Marshall R. I., Seymour G. J.:** Inflammation associated with implants with different surface types. *Clin. Oral Impl. Res.*, 2007, 18, 114-125.

Pryliński M., Limanowska-Shaw H.: Właściwości tytanu i problem nadwrażliwości na ten metal. *Implantoprotetyka*, 2007, 74, 50-52.

Rams T. E., Feik D., Slots J.: Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1990, 5, 1, 29-32.

Rosenberg E. S., Cho S. C., Elian N., Jalbout Z. N., Froum S., Evian C. I.: A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally compromised and periodontally healthy patients: a clinical report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 2004, 19, 6, 873-879.

Saint-Mezard P., Bérard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J-F.: The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur. J. Dermatol.*, 2004, 14, 131-138.

Sanz M., Maladze A., Lazaro P., Calvo J. L., Quirynen M., van Steenberghe D.: Histopathologic characteristics of peri-implant soft tissues in Branemark implants with 2 distinct clinical and radiological patterns. *Clin. Oral Implants Res.*, 1991, 2, 128-134.

Sauget P., Soubiran P., Monteil R.A.: Physiology of Langerhans cells and their potential role in oral pathology. *J. Biol. Buccale*, 1986, 14, 3-14.

Schou S., Holmstrup P., Hjørting-Hansen E., Lang N. P.: Plaque-induced marginal tissue reactions of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *Clin. Oral Implants Res.*, 1992, 3, 4, 149-161.

Schramm M., Pitto R. P.: Clinical relevance of allergological tests in total hip joint replacement. In : Willmann G. & Zweymüller K., eds. *Bioceramics in Hip Joint Replacement*, Thieme, 2000, New York, USA, 101-106.

Schroeder A., Van Der Zypen E., Stich H., Sutter F.: The reaction of bone connective tissue and epithelium to endosteal implants with titanium sprayed surface. *J. Maxillofac. Sur.* 1981, 9, 15, 198.

Scully C.: Choroby jamy ustnej. Diagnostyka i leczenie. Urban&Partner, Wrocław, 2006, 317-318.

Sethi A., Kaus T.: Implantologia praktyczna. Wydawnictwo Kwintesencja, 2009, 43-51, 43-68, 71-109.

Siemiątkowski M.: Periimplantitis. Część I - mikrobiologia. *Nowa Stomatol.*, 2006, 4, 192-196.

Silverstein L. H., Kurtzman D., Garnick J. J., Schuster G. S., Steflik D. E., Moskowitz M. E.: The microbiota of peri-implant region in health and disease. *Implant Dent.*, 1994, 3, 3, 170-174.

Sorsa T., Tjaderhane L., Salo T.: Matrix Metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral. Dis.* 2004, 10, 6, 311-318.

Śpiewak R., Piętowska J.: Nikiel alergen wyjątkowy. Od struktury atomu do regulacji prawnych. *Alergia Immunol.*, 2006, 3, 58.

Steinmann R.M.: The dendritic cell system and its role in immunogeneticity. *Ann. Rev. Immunol.*, 1991, 9, 271-296.

Stevens A., Lowe J.: Histologia człowieka. PZWL, Warszawa, 2000, 355-369.

Sun J-B., Raghavan S., Sjöling A., Lundin S., Holmgren J.: Oral tolerance induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates both foxp3⁺CD5⁺ and foxp3⁻CD25⁻CD4⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2006, 177, 7634-7644.

- Szczepański M.**, Szynaka B., Dziecioł J., Małydk J.: Ultrastruktura śródbłonna naczyń włosowatych migdałka gardłowego. *Alergia Astma Immunol.*, 2001, 6, 3, 143-147.
- Świech E.**: Implanty- zarys historyczny, zasady stosowania. *Stoma. Współcz.*, 1998, Supl.1.
- Taylor T. D.**, Agar J. R.: Twenty years of progress in implant prosthodontics. *J. Prosthet. Dent.*, 2002, 88, 89-95.
- Thomas P.**, Wolf-Dieter B., Maier S., Summer B., Przybilla B.: Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing, eczema, and T-cell hyperresponsiveness in vitro: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis*, 2006, 55, 199-202.
- Thomas P.**: Allergological aspects of implant biocompatibility. In: Willmann K.Z.G., ed. *Bioceramics in Hip Joint Replacement*, Thieme, 2000, New York, USA, 117-121.
- Thomason J.M.**, Lund J.P., Chehade A., J.S. Feine.: Patient Satisfaction with mandibular implant overdentures and conventional dentures 6 months after delivery. *Int. J. Prosthodont.*, 2003, 16, 467-473.
- Tomczak M.**, Surdacka A., Kasprzak A.: Żyłki pozawłosowate z wysokim śródbłonkiem (HEV) a przewlekłe zapalenie przyzębia. *Dental Forum* , 2008, 1, XXXVI, 49-60.
- Wajs S.**: Pierre Feuchard (1678-17610). Ojciec nowoczesnej dentystyki. *Czas. Stomat.*, 1995, 11, 747-749.
- Wilson T. G.**, Nunn M.: The relationship between the Interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. *J. Periodontol.*, 1999, 70, 724-729.

Wood M. R., Vermilyca S. G.: A revive of selected dental literature on evidence-based treatment planning for dental implants. *J. Prosthet. Dent.*, 2004, 92, 447-462.

Yaffe M. B., Murthy S., Eckert R. L. : Evidence that involucrin is a covalently linked constituent of highly purified cultured keratinocyte cornified envelopes. *Invest. Dermatol.*, 1993, 100, 3-9.

Zoellner H., Hunter N.: High endothelial-like venules in chronically inflamed periodontal tissues exchange polymorphs. *J. Pathol.*, 1989, 159, 4, 301-310.

13. Spis tabel i rycin

Tabela I. Charakterystyka grupy badawczej

Tabela II. Skład chemiczny klas czystego tytanu (CP) oraz stopów Ti_6Al_4V (%) (cyt. wg. Mc Cracken, 1999).

Tabela III. Panel przeciwciał (Ab) rozpoznających antygeny (Ag) powierzchniowe lub wewnątrzkomórkowe w komórkach błony śluzowej dziąsła oraz zestawy firmowe zastosowane w badaniach immunocytochemicznych.

Rycina 1a. Planowane łożo implantu z pokrywającą go błoną śluzową (materiał porównawczy – schemat).

Rycina 1b. Część środkowa implantu pokryta błoną śluzową (materiał badawczy – schemat).

Rycina 1c. Odstąpienie implantu i założenie śruby gojącej (schemat).

Rycina 2. Odstąpienie zintegrowanej części środkowej implantu.

Rycina 3. Umieszczenie śruby gojącej w części środkowej implantu.

Rycina 4a, b. Przekrój przez błonę śluzową dziąsła grupy porównawczej. Nabłonek tworzy sople różniące się kształtem i wysokością (grubością nabłonka) (a, b) Sople zagłębiają się do blaszki właściwej a pomiędzy nimi widoczne są brodawki łącznotkankowe. Zwraca uwagę dobrze zaznaczona warstwa rogowa. H+E. Powiększenie a x 16; b x 10.

Rycina 5. Fragment błony śluzowej w materiale porównawczym. W rozgałęzionych soplach nabłonkowych występują liczne keratynocyty aktywne mitotycznie, Ki67 pozytywne. Powiększenie x 40.

Rycina 6. Przekrój przez błonę śluzową dziąsła pobraną przed implantacją (materiał porównawczy). W blaszce właściwej w sąsiedztwie naczyń krwionośnych widoczne są niewielkie skupiska komórkowe. H+E. Powiększenie x 10.

Rycina 7. Fragment błony śluzowej z grupy porównawczej. W okolicy podnabłonkowej widoczny naciek utworzony przez leukocyty obecne również na terenie nabłonka. H+E. Powiększenie x 10.

Rycina 8. W naciekach na terenie nabłonka w materiale porównawczym dominują granulocyty obojętnochłonne i komórki plazmatyczne. Zwracają uwagę zmiany morfologiczne w cytoplazmie keratynocytów. Reakcja PAS. Powiększenie x 40.

Rycina 9. Błona śluzowa w materiale porównawczym z pojedynczym naciekiem leukocytów. Na terenie blaszki właściwej widoczne jest pozawłosowate naczynie żyłne z wysokim śródbłonkiem (HEV), a w jego świetle granulocyty. Reakcja PAS. Powiększenie x 100.

Rycina 10. Rozkład grubości nabłonka u poszczególnych pacjentów (oznaczonych kolejnymi numerami) w błonie śluzowej dziąsła pobranej znad implantu i w odpowiednim materiale porównawczym.

Rycina 11. Występowanie nacieków komórkowych u poszczególnych pacjentów (oznaczonych kolejnymi numerami) i ich powierzchnia, w błonie śluzowej po kontakcie z implantem oraz w odpowiednim materiale porównawczym.

Rycina 12. Przekrój przez błonę śluzowej dziąsła pobraną znad tytanowego implantu. Zwraca uwagę lokalne pogrubienie warstwy nabłonkowej, któremu towarzyszy obfity naciek komórek limfoidalnych. H+E. Powiększenie x 4.

Rycina 13. Fragment błony śluzowej pobranej znad implantu. Widoczne wydłużenie sople nabłonkowych z obfitymi naciekami komórek w warstwie podnabłonkowej, które infiltrują nabłonek. H+E. Powiększenie x 10.

Rycina 14. Liczne keratynocyty Ki67 pozytywne w rozgałęzionych soplach nabłonkowych w materiale znad implantu. Powiększenie x 10.

Rycina 15. Naciek komórek limfoidalnych w okolicy podnabłonkowej, migrujących do kolejnych warstw nabłonka. H+E. Powiększenie x 20.

Rycina 16a. Keratynocyty w apoptozie w bezpośrednim sąsiedztwie z naciekającymi nabłonek komórkami limfoidalnymi, w materiale pobranym znad implantu. Zwraca uwagę, że liczne komórki limfoidalne wykazują dodatnią reakcję w teście na apoptozę. Powiększenie x 64.

Rycina 16b. Keratynocyty w apoptozie w błonie śluzowej znad implantu. Powiększenie x 80.

Rycina 17. Obszar nabłonka błony śluzowej po kontakcie z implantem z rogowaceniem niepełnym (parakeratoza). Powiększenie x 40.

Rycina 18. Przekrój przez błonę śluzową pobraną znad implantu z *periimplantitis*. W głębszych obszarach blaszki właściwej obfite nacieki komórkowe. Zwraca uwagę brak infiltracji nabłonka. Reakcja PAS. Powiększenie x 16.

Rycina 19. Przekrój przez blaszkę właściwą błony śluzowej dziąsła w zaburzonym wgajaniu się wszczepów. Liczne komórki plazmatyczne, PAS+pozytywne koncentrują się w sąsiedztwie pozawłosowatych naczyń żylnych z wysokim śródbłonkiem (HEV). Powiększenie x 40.

Rycina 20. Występowanie komórek Langerhansa (S-100 pozytywnych) na terenie nabłonka błony śluzowej w grupie porównawczej. Powiększenie x 25.

Rycina 21. Średnia gęstość komórek Langerhansa (S-100 pozytywnych) w błonie śluzowej dziąsła pobranej znad implantów i w materiale porównawczym.

Rycina 22. Rozkład gęstości komórek Langerhansa (S-100 pozytywnych) u poszczególnych pacjentów, w nabłonku błony śluzowej po bezpośrednim kontakcie z implantem oraz w odpowiednim materiale porównawczym.

Rycina 23. Komórki Langerhansa z odczynem na białko S-100 w różnych warstwach nabłonka oraz pośród komórek w nacieku podnabłonkowym, w błonie śluzowej dziąsła znad implantu. Powiększenie x 20.

Rycina 24. Fragment błony śluzowej dziąsła znad implantu. Zwraca uwagę duża koncentracja komórek Langerhansa z ekspresją S-100 w rejonie podnabłonkowym oraz skupiska tych komórek na terenie nabłonka. Powiększenie x 20.

Rycina 25. Komórki Langerhansa z ekspresją S-100 naciekające nabłonek dziąsła znad implantu. Zwraca uwagę, że komórkom Langerhansa towarzyszy populacja komórek limfoidalnych. Powiększenie x 40.

Rycina 26a. Rozkład gęstości komórek Langerhansa S-100 pozytywnych, w nabłonku u wybranej grupy pacjentów z naciekami w błonie śluzowej dziąsła znad implantów (po) i w odpowiednim materiale porównawczym (przed).

Rycina 26b. Rozkład gęstości komórek Langerhansa S-100 pozytywnych, w naciekach podnabłonkowych u wybranych pacjentów, analizowany w błonie śluzowej znad implantów (po) i w odpowiednim materiale porównawczym (przed).

Rycina 27. Limfocyty T CD45RO - pozytywne w niewielkich skupiskach komórek wokół naczyń w błonie śluzowej dziąsła w materiale porównawczym. Powiększenie x 32.

Rycina 28. Występowanie limfocytów CD45RO-dodatnich w naciekach komórkowych w błonie śluzowej dziąsła znad implantów i w odpowiednim materiale porównawczym.

Rycina 29. Występowanie limfocytów CD25- dodatnich w naciekach komórkowych w błonie śluzowej dziąsła znad implantów i w odpowiednim materiale porównawczym.

Rycina 30a. Limfocyty CD45RO - pozytywne skupione w okolicy podnabłonkowej, naciekające nabłonek. Fragment błony śluzowej pobranej po kontakcie z implantem. Powiększenie x 25.

Rycina 30b. Limfocyty CD25-pozytywne skupione w okolicy podnabłonkowej, naciekające nabłonek. Fragment błony śluzowej pobranej po kontakcie z implantem. Powiększenie x 32.

Rycina 31. Limfocyty B i komórki plazmatyczne z ekspresją CD79a rozproszone w blaszce właściwej błony śluzowej dziąsła znad implantu. Powiększenie x 32.

Rycina 32. Limfocyty B i komórki plazmatyczne z ekspresją CD 79a widoczne na obwodzie nacieków utworzonych przez komórki jednojądrzaste. Powiększenie x 25.

Ryciny 33a–e. Wyniki analizy składu komórkowego w obrębie nacieków w błonie śluzowej dziąsła przed i po kontakcie z implantem w wyodrębnionej grupie (pacjenci 1, 4, 8, 9, 14).

Rycina 34. Występowanie limfocytów T CD45RO-dodatnich w skupiskach komórkowych w wyodrębnionej grupie pacjentów z naciekami w błonie śluzowej znad implantów i w odpowiednim materiale porównawczym.

Rycina 35. Występowanie limfocytów T CD25-dodatnich w skupiskach komórkowych w wyodrębnionej grupie pacjentów z naciekami w materiale po kontakcie z implantem i odpowiednim materiale porównawczym.

Rycina 36. Ekspresja CK19 w keratynocytach warstwy podstawnej nabłonka w grupie porównawczej. Powiększenie x 20.

Rycina 37. Ekspresja CK10 w keratynocytach powyżej warstwy podstawnej w materiale porównawczym. Powiększenie x 40.

Rycina 38. Obszar błony śluzowej dziąsła po kontakcie z tytanowym implantem z widocznym naciekiem komórek limfoidalnych w strefie podnabłonkowej i na terenie

nabłonka. Zwraca uwagę, że ekspresje CK19 wykazują keratynocyty we wszystkich warstwach nabłonka. Powiększenie x 12, 5.

Rycina 39a, b. Charakterystyczna ekspresja CK10 w nabłonki dziąsła znad tytanowego implantu. Zwraca uwagę obszar z typowym rozkładem występowania CK10 (a) i sąsiadujący obszar z wyraźną redukcją keratynocytów CK10-
- pozytywnych (b). Powiększenie a x 20, b x 10.

14. Załącznik (zgoda Komisji Biotycznej)



AKADEMIA MEDYCZNA IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

**KOMISJA BIOETYCZNA PRZY AKADEMII MEDYCZNEJ
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU**

Adres :
uL. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854-62-51, 854-60-60
fax. (+48 61) 854-61-07
www.bioetyka.amp.edu.pl

Uchwała nr 298/06

Na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996r. o zawodzie lekarza i lekarza dentystry (t.j. Dz.U.z 2002r. Nr 21, poz.204 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47, poz.480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz.U. Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz.U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 09 marca 2006 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

prof. AM dr hab. Ryszard Koczorowski

w sprawie prowadzenia badań w

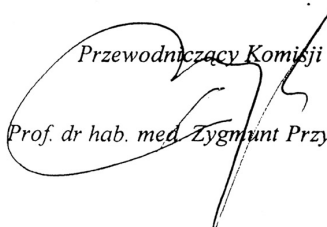
**Pracowni Gerostomatologii Katedry Protetyki Stomatologicznej
AM w Poznaniu**

Główny badacz: lek. stom. Monika Hemerling

**Członkowie zespołu
badawczego: prof. dr hab. Renata Brelińska-Plinzner**

**Temat
badań: "Immunohistochemiczna ocena stanu tkanek miękkich
pokrywających dwuetapowe wszczepy śródkostne
systemu osteoplant."**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. dr hab. med. Zygmunt Przybylski