

Krzysztof Makuch

**Analiza zawartości tytanu w błonie śluzowej
pokrywającej dwuetapowe
titanowe wszczepy śródkostne
w okresie ich wgajania**

Praca 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 2011

**Panu prof. dr hab.
Ryszardowi Koczorowskiemu**
składam serdeczne podziękowania
za wskazanie ciekawego tematu pracy,
życzliwą pomoc oraz wsparcie
w czasie jej realizacji

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW W PRACY

AAS lub ASA	atomowa spektrofotometria absorpcyjna (<i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ASTM F 67	(<i>Standard Specification for Unalloyed Titanium for Surgical Implant Applications</i>)
CD25	subpopulacja limfocytów T zawierająca na powierzchni błony komórkowej cząstkę regulującą 25 (<i>cluster of differentiation 25</i>)
CD4	subpopulacja limfocytów T zawierająca na powierzchni błony komórkowej cząstkę regulującą 4 (<i>cluster of differentiation 4</i>)
CD8	subpopulacja limfocytów T zawierająca na powierzchni błony komórkowej cząstkę regulującą 8 (<i>cluster of differentiation 8</i>)
cp	czysty tytan (<i>commercially pure</i>)
DCP	plazma prądu stałego (<i>Direct Current Plasma</i>)
EDS lub EDX	spektroskopia rentgenowska z rozpraszaniem energii (<i>Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>)
ELI	stop tytanu o najwyższej czystości (<i>extra low interstitial</i>)
H₂O₂	nadtlenek wodoru
HNO₃	kwaz azotowy
ICP	plazma indukcyjnie sprzężona (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)
ICP-MS	spektrometria masowa z plazmą indukcyjnie sprzężoną (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ISO	Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (<i>International Organization for Standardization</i>)
LTT	test transformacji blastycznej limfocytów (<i>Lymphocyte Transform Test</i>)
MELISA[®]	(<i>Memory Lymphocyte Immuno-Stimulation Assay</i>)
MHC	główny układ zgodności tkankowej (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIP	plazma mikrofalowa (<i>Mikrowave Induced Plasma</i>)
ppm	1 ppm = 10 ⁻⁶ , część na mln (<i>parts per million</i>)
V2A	stal austenityczna (Cr – 17,0-21,0, Ni – 8,0-13,0)
V4A	stal austenityczna (Cr – 16,0-20,5, Ni – 9,0-16,0, Mo – 1,5-3,0)
XPS	rentgenowska spektroskopia fotoelektronowa (<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)

SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW W PRACY	3
SPIS TREŚCI.....	4
1. WPROWADZENIE.....	6
2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA.....	7
2.1. Błona śluzowa jamy ustnej – jako bariera ochronna dla wgajających się wszczepów .	7
2.2. Biomateriały, podział, właściwości	7
2.3. Tytan.....	9
2.4. Osteointegracja	10
2.5. Typy implantacji, wskazania i przeciwwskazania, przyczyny niepowodzeń	11
2.6. Czysty tytan oraz jego stopy – charakterystyka materiałów implantacyjnych.....	13
2.7. Biokompatybilność, oddziaływania tytanu na organizm	15
2.7.1. Korozja biomateriałów	16
2.7.2. Przebarwienia, metalozy.....	17
2.7.3. Reakcje alergiczne	18
3. CELE PRACY.....	23
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	24
4.1. Materiał.....	24
4.1.1. Pobranie materiału biologicznego od pacjentów poddanych wszczepieniu implantów	24
4.2. Metody badawcze.....	27
4.2.1. Analiza zawartości jonów tytanu w błonie śluzowej.....	27
4.2.1.1. Mineralizacja próbek.....	27
4.2.1.2. Analiza metodą spektrometrii masowej z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-MS)	29
4.2.1.3. Warunki analizy ICP-MS.....	32
4.3. Analiza statystyczna wyników	33

5. WYNIKI BADAŃ	35
5.1. Porównanie wyników dla grupy badanej i grupy kontrolnej.....	35
5.2. Porównanie wyników dla poszczególnych systemów implantologicznych.....	38
5.2.1. Zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi dla różnych badanych systemów implantologicznych.....	38
5.2.2. Zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi dla największej grupy systemu implantologicznego – Osteoplast [®] , a pozostałymi systemami.....	45
5.2.3. Porównanie wyników zawartości tytanu u pacjentów, którym wszczepiano większą liczbę implantów (analiza wewnątrzsobnicza)	48
5.2.4. Porównanie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej w zależności od lokalizacji wszczepu	49
5.2.5. Porównanie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej w zależności od wieku pacjenta	50
5.2.6. Porównanie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej w zależności od płci pacjenta	52
6. DYKUSJA.....	55
7. WNIOSKI.....	66
8. STRESZCZENIE	67
9. ABSTRACT	69
10. PIŚMIENNICTWO.....	71
11. SPIS RYCIN.....	79
12. SPIS TABEL	81
13. DOKUMENTACJA.....	83
14. ZAŁĄCZNIK.....	90

1. WPROWADZENIE

Rozwijająca się prężnie implantologia stomatologiczna staje przed coraz nowszymi wyzwaniami oraz kieruje zainteresowania badań naukowych na różnorodne pola związane zarówno z kliniką jak i naukami podstawowymi. Rozwój badań nad materiałami wykorzystywanymi wszechstronnie w medycznej implantologii ujawnia wciąż nowe dane dotyczące ich niepożądanych skutków ubocznych.

Korozja biomateriałów dotychczas uważanych za całkowicie niereaktywne i bezpieczne, zwiększająca się liczba osób podatnych na czynniki alergiczne zawarte w materiałach dotąd uznawanych za obojętne, pozwalają lepiej zrozumieć zjawiska, z którymi lekarz dentysta może się zetknąć w pracy klinicznej.

Na podstawie najnowszych doniesień piśmiennictwa oraz własnych doświadczeń klinicznych można stwierdzić, iż występuje uwalnianie się określonych związków z tytanowych wszczepów do organizmu.

Istotnym problemem współczesnej implantologii wydaje się być możliwość przedostawania się do organizmu potencjalnie toksycznych jonów glinu i wanadu, a także tytanu ze stopów używanych przy produkcji implantów stomatologicznych. Uważa się, że proces ten może mieć wpływ na sukces implantacyjny oraz kondycję przylegających do wszczepu tkanek. Zjawiska te jak dotąd nie zostały szeroko udokumentowane, a obecny stan wiedzy nie wskazuje jednoznacznie jak migracja jonów w okolicy implantu może wpływać na okoliczne tkanki oraz jakie mogą być konsekwencje tego procesu.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1. Błona śluzowa jamy ustnej – jako bariera ochronna dla wgajających się wszczepów

Błona śluzowa dziąsła składa się z blaszki właściwej i nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego, zawierającego kilka warstw różnicujących się ku powierzchni keratynocytów. W nabłonku jamy ustnej wyróżnia się warstwę podstawną, kolczystą, ziarnistą i rogowaciejącą.

Nabłonek wrasta w blaszkę właściwą błony śluzowej tworząc charakterystyczne sople, pomiędzy którymi znajdują się łącznotkankowe brodawki, zawierające różnorodne receptory (ucisku, temperatury, bólu). Przebiegają tu też naczynia krwionośne oraz włókna nerwowe.

Blaszka właściwa błony śluzowej dziąsła zbudowana jest z tkanki łącznej włóknistej zwartej, zawierającej głównie fibroblasty, komórki tuczne, limfocyty, makrofagi i granulocyty, zawiera też włókna kolagenowe oraz włókna sprężyste. To właśnie ta część błony śluzowej kontaktuje się bezpośrednio ze śródkostnym wszczepem tytanowym i stanowi barierę oddzielającą implant od środowiska jamy ustnej. Do blaszki właściwej mogą też przenikać jony oraz inne produkty powstałe na skutek fizyczno-chemiczno-biologicznych procesów. Migrujące ze wszczepów jony zostają pochłonięte przez struktury błony śluzowej co zapobiega rozprzestrzenianiu się potencjalnie szkodliwych substancji w organizmie [Welander 2007, Kmiec 2006, Berglundh 1992, Berglundh 1991].

2.2. Biomateriały, podział, właściwości

Rozwijająca się implantologia wymusza zastosowanie nowoczesnych biomateriałów, które powinny spełniać szereg stawianych im wymagań jak: wysoka biotolerancja, odpowiednie własności biomechaniczne (np. granica rozciągania, wytrzymałość na ściskanie i rozciąganie, odporność na

ścieranie, sztywność) i technologiczne (np. koszty wytwarzania, możliwość nadawania odpowiednich kształtów).

Wśród materiałów stosowanych w medycynie wyróżniamy:

- polimery,
- metale,
- ceramikę (węgliki, szkła ceramiczne),
- materiały kompozytowe,
- włókna węglowe.

W wielu gałęziach medycyny od bardzo dawna szeroko rozpowszechnione jest wykorzystanie implantologicznych materiałów metalicznych. Do najczęściej stosowanych metali zalicza się stal chirurgiczną, stopy chromo-kobaltowe oraz tytan i jego stopy. W składzie stali austenitycznych znajdują się odpowiednio dobrane pierwiastki takie jak chrom, nikiel i molibden. Są to materiały przystosowane do implantacji w żywym organizmie o ściśle ustalonych składach chemicznych, które zapewniają im m.in. paramagnetyczną strukturę.

Ze stali tych wytwarza się głównie igły śródszpikowe, płytki kostne, śruby i nakrętki, groty i druty kostne, rzadziej endoprotezy. Są też wykorzystywane w stomatologii. Niestety nie spełniają one, podobnie jak stopy chromowo-kobaltowe, warunków wymaganych od materiałów do implantacji długoczasowej ze względu na stosunkowo dużą podatność na korozję oraz uwalnianie do organizmu substancji szkodliwych [Okazaki 2005, Faccioni 2003, Brune 1986].

Oprócz wymienionych materiałów wykorzystuje się w implantologii ceramikę, węgle i kompozyty, a także materiały resorbowalne, takie jak biodegradowalne polimery, które są aktualnie przedmiotem intensywnych badań naukowych. Szczególny postęp obserwuje się w dziedzinie materiałów niemetalicznych posiadających właściwości „przyjazne” tkankom miękkim i kości z jednoczesną dobrą biotolerancją i wytrzymałością. Rozwój bioinżynierii materiałowej jest powiązany przede wszystkim z licznymi dokonaniem interdyscyplinarnymi w wielu dziedzinach nauki i techniki, ze zwiększającą się wiedzą na temat anatomii narządów i procesów fizjologicznych przyspieszających procesy leczenia oraz z wdrażaniem

nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych [Ciupik 2005, Hench 1998].

2.3. Tytan

Bliższe poznanie właściwości biologicznych i fizykochemicznych tytanu spowodowało znaczący przełom w biomedycynie. Dzięki obserwowanej klinicznie dobrej biotolerancji (biozgodności) i osteointegracji, tytan i jego stopy wykorzystywane są do produkcji licznych elementów przydatnych w różnych gałęziach medycyny.

Pod względem częstotliwości występowania w skorupie ziemskiej tytan jest czwartym metalem po żelazie (Fe), glinie (Al) i magnezie (Mg). Ulega przemianie alotropowej w temperaturze 882°C. Poniżej tej temperatury występuje jako α -Ti o sieci heksagonalnej, a powyżej jako β -Ti o sieci regularnej przestrzennie centrowanej, która ma lepsze właściwości plastyczne i dlatego nadaje się do mechanicznej obróbki. Tytan i jego stopy cechuje wysoka wytrzymałość (do 1800 MPa) w odniesieniu do ciężaru właściwego, dobra odporność korozyjna oraz żaroodporność (do 800°C), szczególnie w środowiskach utleniających. Wynika to z faktu, że w atmosferze utleniającej, elementy ze stopów tytanowych pokrywają się warstewką tlenku (TiO_2) i jak wykazano, w skład pasywnej warstwy tlenkowej wchodzić może także podtlenek tytanu. Reaktywność ciekłego tytanu z tlenem, azotem i wodorem stwarza trudności metalurgiczne, ale z uwagi na korzystne właściwości fizyczne i chemiczne tytan znalazł zastosowanie w przemyśle, medycynie oraz takich specjalnościach stomatologicznych jak: chirurgia szczękowa, implantologia, endodoncja, ortodoncja i protetyka stomatologiczna [Roberts 2009, Rusinek 2008, Dutkiewicz 2007, Pryliński 2007, Lijian 2000, McCracken 1999, Stejskal 1999].

Stopy niklowo-tytanowe (Nitinol) posiadające pamięć kształtu (po dostarczeniu energii – np. w temperaturze ludzkiego ciała – wracają do uprzednio zapamiętanego kształtu) wykorzystywane są jako łuki ortodontyczne, klamry chirurgiczne, stenty przywracające drożność naczyń krwionośnych, jelit, przewodów żółciowych i dróg moczowych oraz protezy

naczyniowe [Rusinek 2008, Singh 2007, Orlicki 2003]. Materiały alloplastyczne mogą oddziaływać na kontaktujące się z nimi tkanki wywołując różne reakcje podrażniające, toksyczne lub zapalne. Reakcje na tytan obserwowano najczęściej przy protezach biodra, stymulatorach serca, klamrach i spinkach chirurgicznych oraz osteosyntezach.

W stomatologii początkowo tytan stosowano głównie w formie gotowych fabrykatów, jak: wszczepy, ćwieki kanałowe i okołomiazgowe. Szybki rozwój technologii otworzył możliwość wykonywania z tytanu w warunkach laboratoryjnych prawie wszystkich konstrukcji protetycznych takich jak: wkłady i nakłady, korony i mosty licowane, szkielety protez częściowych, korony teleskopowe, mezo- i suprastruktury konstrukcji implantowych [Dutkiewicz 2007, Orlicki 2003, Berg 1997].

2.4. Osteointegracja

Wszechstronne zastosowanie tytanu w medycynie i stomatologii zawdzięczamy w dużym stopniu odkryciu w 1965 roku przez prof. Bränemarka zdolności połączenia się z tkanką kostną czyli tzw. osteointegracji [Brandt 1998, Li 1997, Bränemark 1985]. Dzięki swoim unikalnym właściwościom tytan sprzyja kontaktowemu nawarstwianiu się kości czyli osteogenezie kontaktowej. W obrazie histologicznym wgajanie się implantów tytanowych przebiega w kości podobnie jak naprawa rany kostnej, niekiedy ze zmodyfikowaną, nieznaczną reakcją zapalną na ciało obce. Zjawisko to we współczesnej stomatologii zostało wykorzystane do odbudowy różnych braków zębowych poprzez zastosowanie tytanowych wszczepów śródkostnych jako filarów protez różnego typu [Rusinek 2008, Czarnobilska 2007].

Liczba wszczepianych implantów, zarówno w Polsce jak i w innych krajach, wzrasta proporcjonalnie do zamożności społeczeństwa i liczby stomatologów przeprowadzających zabiegi implantacji, co skutkuje wielką liczbą obserwacji klinicznych, w tym także bardzo rzadko zróżnicowanymi reakcjami na tytan i jego stopy.

O sukcesie w implantologii decyduje osteo- (osseo-) integracja, czyli bezpośrednie strukturalne i funkcjonalne połączenie między kością, a powierzchnią obciążonego implantu. Materiały takie jak tytan mogą, podobnie jak inne materiały alloplastyczne, wywoływać w organizmie różne reakcje obronne, włącznie z odrzuceniem wszczepu. Proces reakcji wydaje się przebiegać jednak zdecydowanie mniej ostro i intensywnie niż przy transplantach. Materiał uznawany jest za biokompatybilny wówczas, gdy nie wywołuje patologicznych reakcji w tkankach, nie wydziela żadnych substancji dezintegracyjnych, a w przypadku implantów pozwala na narastanie kości bezpośrednio na ich śródkostnej powierzchni [Pryliński 2007, Lijian 2000, Brandt 1998].

2.5. Typy implantacji, wskazania i przeciwwskazania, przyczyny niepowodzeń

Za zjawisko osteointegracji odpowiedzialnych jest szereg czynników związanych zarówno z użytym materiałem, samą techniką zabiegową, a często także stanem tkanek otaczających implant [Ferreira 2009, Olmedo 2007, Olmedo 2003].

Technika implantacji zależna jest od osobniczych warunków zdrowotnych i anatomicznych, stanu układu stomatognatycznego, przewidywanego rozwiązania protetycznego oraz zdolności i wiedzy lekarza. Zależnie od czasu jaki upłynął od ekstrakcji zębów wyróżniamy: implantacje natychmiastowe, natychmiastowe odroczone lub późne. W zależności od rodzaju gojenia wyróżnia się implantacje otwarte (jednoczasowe) lub zamknięte (wieloczasowe). Często podczas inkorporacji wszczepu konieczne jest zastosowanie dodatkowych zabiegów oraz materiałów, które wywierają istotną rolę w procesie gojenia się tkanek oraz osteointegracji [Więckiewicz 2006].

Obecnie za pomocą wszczepów śródkostnych możliwa jest rehabilitacja protetyczna niemalże we wszystkich sytuacjach klinicznych. Zarówno pojedyncze braki w uzębieniu jak i rozległe ubytki a nawet całkowite bezzębie spowodowane różnorodną etiologią (próchnica, choroby przyzębia,

zaburzenia rozwojowe i genetyczne) są z powodzeniem leczone z wykorzystaniem implantów stomatologicznych.

Bezwzględny przeciwwskazaniem do leczenia implantologicznego są ciężkie stany chorobowe nerek, serca (zastawki), nieustabilizowana cukrzyca, uogólniona osteoporoza, alkoholizm, narkomania, nikotynizm oraz okres radioterapii.

Wśród względnych przeciwwskazań najważniejsze to: ogólne choroby przebiegające z obniżeniem odporności, ciąża, długotrwałe leczone choroby układowe, choroby psychiczne, zła higiena jamy ustnej, niechęć pacjenta do współpracy. Wśród miejscowych wymieniść należy: osteopatyczną strukturę kości, niekorzystne warunki anatomiczne z rozległą atrofią podłoża kostnego oraz wynikające z tego złe rokowanie co do przyszłej odbudowy protetycznej opartej na wszczepach. Należy podkreślić, że wiek pacjenta sam w sobie nie stanowi przeciwwskazania do wykonania zabiegu implantologicznego, lecz współistniejące i występujące z upływem lat choroby (polipatologia) [Koczorowski 2010].

Budowa implantów, ich kształt, dobór długości i szerokości, stabilizacja pierwotna, a przede wszystkim rodzaj śródkostnej powierzchni odgrywają także istotną rolę w procesie integracji i mogą mieć wpływ na czasokres ich użyteczności [Stenport 2008, Shan-Hui 2007, Shibli 2005, Paschoal 2003, Shibli 2002, Chen 1998]. Zastosowanie technik rozwijających powierzchnię części śródkostnej wszczepu, umożliwia lepszą proliferację osteoblastów i opłaszczenie implantu przez kość, poprawiając zarówno stabilizację pierwotną jak i wtórną [Koller 2007, Shan-Hui 2007, Singh 2007, Shibli 2002, Li 1997]. Rodzaj materiału użytego na implanty, oraz wysoka odporność na korozję w znacznym stopniu warunkuje wieloletni sukces implantologiczny, a tym samym i protetyczny komfort użytkowy [Gil 2007, Aparicio 2003, McCracken 1999].

2.6. Czysty tytan oraz jego stopy – charakterystyka materiałów implantacyjnych

Tytan wykorzystywany do wytwarzania implantów stomatologicznych występuje w formie czystej (cp – commercially pure) lub w formie stopów z aluminium i wanadem (Titanaloy[®]), przy czym nawet ten pierwszy rodzaj zawiera niewielkie ilości takich pierwiastków jak: tlen, azot, węgiel, wodór. Tlen, którego jest najwięcej, ma istotny wpływ na właściwości czystego tytanu. W zależności od stopnia zawartości tego pierwiastka podzielono go na cztery klasy (tab. 1) [Ada Council On Scientific Affairs 2003, Orlicki 2003, Pohler 2000, McCracken 1999]. Międzynarodowy standard ISO 5832-2 (1999) oraz amerykański ASTM F 67 wyznaczają chemiczne i mechaniczne właściwości czystego tytanu jako materiału implantacyjnego [Pohler 2000, McCracken 1999].

Tytan na rynku dostępny jest w sześciu postaciach, wliczając cztery stopnie czystego tytanu i dwa stopy, z których wykonywane są implanty. Czysty tytan klasy I (cp I), czysty tytan klasy II (cp II), czysty tytan klasy III (cp III), czysty tytan klasy IV (cp IV), Ti_6Al_4V i Ti_6Al_4V (ELI – extra low interstitial), są zróżnicowane w zależności od fizycznych i mechanicznych właściwości (tab. 2) [Pohler 2000, McCracken 1999]. Obiecująco pod względem właściwości fizycznych jak i biokompatybilności przedstawia się nowy stop z niobem – Ti_6Al_7Nb , niezawierający toksycznych jonów wanadu [Srimaneeponga 2008, Fathi 2007, Singh 2007]. Większość obecnie produkowanych implantów dentystycznych, dostępnych na polskim rynku, produkowana jest z czystego tytanu (cp) klasy IV (np. Osteoplast[®], Neoss[®], ITI Straumann[®], BEGO-Semados[®]), często poddanego specjalnie ukierunkowanej technologicznej obróbce w celu zwiększenia wytrzymałości (np. formowany na zimno cp IV – SKY[®], czy cp IV MTA 009 – Nobel Biocare[®]). Tytan klasy I, II, lub III jest obecnie używany rzadko przede wszystkim z powodu małej wytrzymałości mechanicznej.

Jednym z najczęściej stosowanych materiałów tytanowych jest stop α - β Ti_6Al_4V zawierający 6% glinu (Al) i 4% wanadu (V). Stanowi on dobrą kompozycję takich właściwości jak odporność na korozję, wytrzymałość

i elastyczność. Udowodniono, że implanty z tego stopu wykazują lepszą stabilność strukturalną niż wykonane z czystego tytanu i mogą podlegać większym obciążeniom mechanicznym [Singh 2007]. Wielu producentów wykorzystuje ten stop, głównie w postaci ELI (rodzaj stopu Ti_6Al_4V o niższej zawartości pierwiastków międzywęzłowych żelaza, wodoru i tlenu i wynikającej z tego lepszej odporności korozyjnej kosztem wytrzymałości), do wykonania silnie narażonych na siły zgrzyzowe elementów łącznikowych wszczepów, rzadziej do produkcji całych implantów czy ich części środkowej (system ADIN[®]). Często określany jest on również jako tytan klasy V, mylnie sugerując, że mamy do czynienia z czystym tytanem, a nie z jego stopem.

Tabela 1. Skład chemiczny klas czystego tytanu (CP) oraz stopów Ti_6Al_4V (%) [McCracken 1999]

	Cp I	Cp II	Cp III	Cp IV	Ti₆Al₄V	Ti₆Al₄V ELI
N	0,03	0,03	0,03	0,03	0,05	0,05
C	0,10	0,10	0,10	0,10	0,08	0,08
H	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,012
Fe	0,02	0,03	0,03	0,05	0,30	0,10
O	0,18	0,25	0,35	0,40	0,20	0,13
Al	-	-	-	-	5,50–6,75	5,50–6,50
V	-	-	-	-	3,50–4,50	3,50–4,50
Ti	pozostałość	pozostałość	pozostałość	pozostałość	pozostałość	pozostałość

Tabela 2. Zestawienie niektórych właściwości mechanicznych wybranych materiałów stosowanych w implantologii (według ASTM) oraz tkanek twardych u człowieka [McCracken 1999]

Materiał	Moduł sprężystości (GPa)	Wytrzymałość na rozciąganie (MPa)	Granica wytrzymałości (MPa)	Wydłużenie (%)	Gęstość (g/cm ³)
I Ti	102	240	170	24	4,5
Cp II Ti	102	345	275	20	4,5
Cp III Ti	102	450	380	18	4,5
Cp IV Ti	104	550	483	15	4,5
Ti ₆ Al ₄ V ELI	113	860	795	10	4,4
Ti ₆ Al ₄ V	113	930	860	10	4,4
Co-Cr-Mo	240	700	450	8	8,5
stal 316 L	200	965	690	20	7,9
Kość	18	140	bd	1	0,7
Zębina	18,3	52	bd	0	2,2
Szkliwo	84	10	bd	0	3

2.7. Biokompatybilność, oddziaływania tytanu na organizm

Współzależność biokompatybilności i wysokiej wytrzymałości mechanicznej implantów jest głównym kierunkiem badań i rozwoju technologicznego we współczesnej stomatologii. Wytrzymałość i elastyczność determinują użycie danego materiału w odniesieniu do sytuacji klinicznej uwzględniając np. warunki zwarciowo-zgryzowe, parafunkcje i dobór parametrów wszczepu (długość, średnica, kształt) [McCracken 1999]. Zdecydowanie lepszym materiałem w oparciu o te parametry wydaje się być stop Ti₆Al₄V, a nieco gorszym czysty tytan klasy IV.

2.7.1. Korozja biomateriałów

Brak procesów korozyjnych uważany jest za jeden z najważniejszych parametrów odpowiedzialnych za osteointegrację i biozgodność materiałów stosowanych w implantologii [Bedi 2009, Chaturvedi 2009, Singh 2007, Grosogeat 2004, Ionescu 2002, Cortada 2000, Chen 1998]. Do metali posiadających najkorzystniejsze powinowactwo do tkanek ustroju (metale bierne) należą tantal, niob i tytan. Początkowo uważano, że ten ostatni jest odporny na korozję dzięki powierzchniowej warstwie tlenków, które tworzą się na nim prawie natychmiast po obróbce. Wykazano jednak, że mimo pasywnego działania warstwy tlenków pokrywających implant, w jamie ustnej może zachodzić elektrochemiczna i galwaniczna korozja, a tym samym uwalnianie jonów tytanu do otaczających tkanek. Sprzyjają temu reakcje z płynami ustrojowymi oraz ich solami tworząc fosforany oraz zawierające wapń grupy wodorotlenowe.

Tytan, choć uważany za materiał biozgodny, podlega zjawiskom chemicznym, m.in. korozji, jednakże w znacznie mniejszym stopniu niż inne stosowane w medycynie metale. Spośród dwóch typów korozji zarówno korozja chemiczna – sucha jak i korozja elektrochemiczna – mokra, która wymaga obecności wody lub innego płynnego elektrolitu, ma istotne znaczenie w przypadku materiałów stosowanych w stomatologii [Chaturvedi 2009, Adya 2005, Taher 2003]. Materiały tytanowe wykazują różną aktywność korozyjną w zależności od składu chemicznego i pH środowiska, w którym się znajdują [Kinani 2008, Krupa 2004, Ionescu 2002, Strietzel 1998, Johanson 1995].

Wielu autorów uważa, że współistnienie korozji, naprężeń oraz obecność bakterii może wpływać na niepowodzenie w leczeniu implantologicznym [Ferreira 2009, Koczorowski 2007, Shibli 2005]. Na podstawie doniesień z piśmiennictwa opartych na badaniach zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wykazano, że czysty tytan posiada zdecydowanie większą odporność korozyjną i grubszą warstwę pasywacyjną (TiO_2) niż jego stopy [Chaturvedi 2009, Singh 2007, Martin 2006, Adya 2005, Grosogeat 2004, Krupa 2004, Kuphasuk 2001, McCracken 1999, Oda 1996]. Dlatego

w przypadku stopu Ti_6Al_4V istnieje prawdopodobieństwo, że zarówno jony Ti jak i jony toksycznych dla organizmu metali glinu i wanadu mogą uwalniać się do okolicznych tkanek [Singh 2007]. Istnieją zwolennicy stosowania śródkostnych implantów wykonanych wyłącznie z czystego tytanu [Grosogoeat 2004]. Niektórzy wykazują, że obecność makrofagów w przypadku okołowszczepowej reakcji zapalnej (*periimplantitis*) powiązana jest z korozją oraz prowadzi do utraty wszczepu, a jony tytanu hamują wzrost hydroksyapatytów [Olmedo 2008, Olmedo 2007, Olmedo 2003].

Zasadne jest więc stosowanie implantów wykonanych z materiału o maksymalnej biokompatybilności, wysokiej odporności na korozję, przy zachowanej dużej wytrzymałości i elastyczności. Obecna tendencja na rynku wykazuje, że producenci starają się zwiększyć możliwości czystego tytanu klasy IV, który po odpowiedniej obróbce nie będzie wyraźnie ustępować parametrami fizycznymi stopom tytanu zachowując wysoką biogodność i odporność na korozję.

2.7.2. Przebarwienia, metalozy

W wyniku korozji pierwiastki chemiczne przedostają się do środowiska tkankowego w postaci jonów metali lub produktów korozji. Penetrują one do przestrzeni międzykomórkowej lub wnikają do wnętrza komórek, w tym również przez fagocytozę. Lokalne oddziaływanie jonów metali lub produktów korozji materiałów metalowych na tkanki organizmu nazwane zostało przez Nicole'a metalozą [Shan-Hui 2007]. Wynikać może ona z prostej, mechanicznej wędrówki jonów metali – pod wpływem kompresji lub wyporu otaczających implant tkanek, oraz chemicznej – będącej bezpośrednią reakcją jonów metali lub produktów korozji implantu do płynów tkankowych i mazi stawowej. Jest oddziaływaniem fizyko-chemicznym, a biologicznie następuje w wyniku uszkodzenia żywotności tkanek [Marciniak 2005].

Przebiegające bez jakichkolwiek objawów ogólnych oraz nie stwarzające wyraźnego zagrożenia zdrowotnego, przebarwienia błony śluzowej (tzw. tatusze) występują stosunkowo rzadko (ryc. 1). Objawiają się lokalną reakcją tkanki na bliskość wszczepu lub elementu protetycznego

i nagromadzeniem się substancji metalicznej w postaci widocznego, ciemniejszego przebarwienia błony śluzowej [Meleti 2008, Venclikova 2007, Jańczuk 2006, Eley 1979].



Rycina 1. Przebarwienia błony śluzowej wokół elementów protetycznych na podbudowie metalowej.

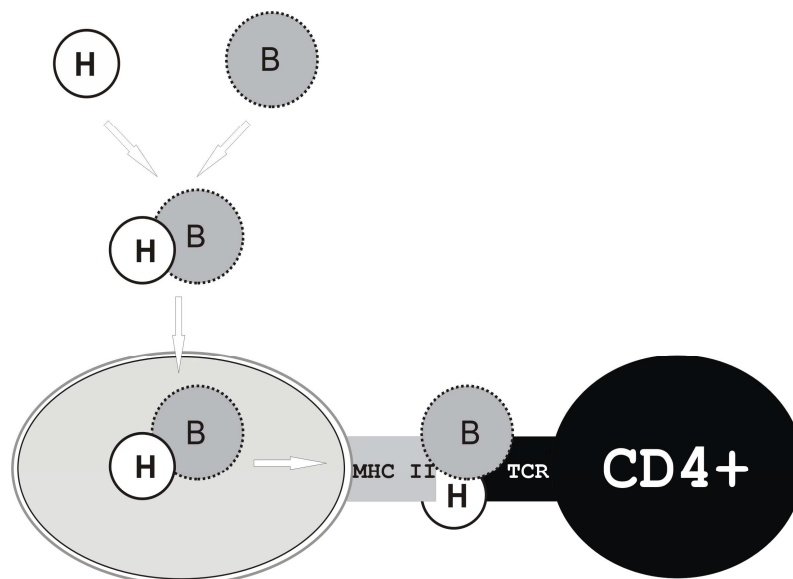
2.7.3. Reakcje alergiczne

Zjawiskiem potencjalnie niekorzystnym powiązaniem z obecnością w organizmie implantów metalowych, są odczyny alergiczne wynikające z procesów korozyjnych i uwalniania się jonów, przy czym najczęściej uczulającymi metalami spotykanymi w praktyce ogólnomedycznej jak i stomatologicznej są nikiel, chrom i kobalt [Stangricka-Mazurek 2006, Muris 2006, Taher 2003, Śpiewak 1993]. Na przestrzeni ponad 40 lat pojawiły się nieliczne opisy przypadków sugerujące uboczne reakcje po zastosowaniu implantów, w tym też wykonanych z czystego tytanu [Rusinek 2008, Pryliński 2007, Tomizawa 2007, Müller 2006, Stejskal 2006, Ungersböck 1994]. W większości przypadków były to odczyny w postaci metaloz lub przetok, często mające postać wyprysków, rumieni, swiądu w rejonie wszczepu

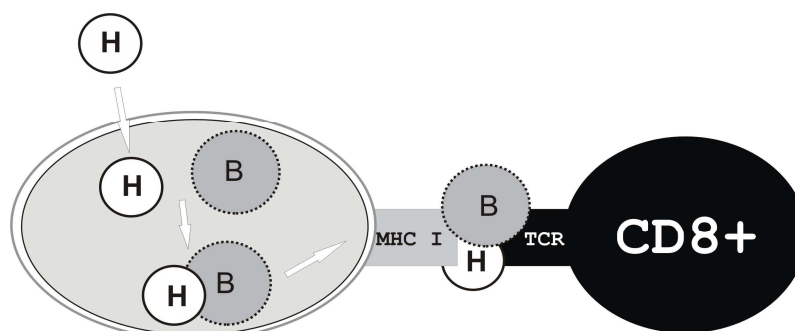
sugerujące alergię [Rusinek 2008, Singh 2007, Urbanek–Brychczyńska 2001].

Reakcje alergiczne typu późnego na metalowe protezy, przebiegają w postaci zapalenia kości lub szpiku bez jakichkolwiek zmian skórnych. Większość tych zjawisk zaobserwowano w przypadku implantów ortopedycznych w wyniku kontaktu z alergenami niklu, chromu i kobaltu, rzadziej natomiast w przypadku tytanu [Singh 2007, Pohler 2007, Müller 2006, Śpiewak 1993]. Istnieje obawa, że problem ten w dobie coraz powszechniej występujących reakcji alergicznych dotyczyć może również tytanowych wszczepów śródkostnych stosowanych w stomatologii. W większości przypadków objawy alergiczne powodują przykre, długofalowe efekty w postaci zmian skórnych, które ustępują po usunięciu alergenu. Uważa się jednakże, iż odczyn ten w układzie stomatognatycznym może być na tyle poważny, że wywołuje komplikacje z odrzuceniem wszczepu włącznie [Śpiewak 2007, Müller 2006]. Podobnie jak w przypadku zabiegów ortopedycznych, choć znacznie rzadziej, pacjenci stomatologiczni po implantacji śródkostnej wykazywać mogą reakcje skórne. U zdrowej bezzębnej pacjentki (z bardzo dobrymi wynikami ogólnymi) obserwowano po implantacji 2 wszczepów stomatologicznych występowanie silnej reakcji alergicznej w postaci egzemy. Zmiany na skórze i błonie śluzowej ustąpiły całkowicie w krótkim okresie po usunięciu wszczepów tytanowych [Egusa 2008, Müller 2006]. Sugerowana nadwrażliwość na tytan może być reakcją organizmu na śladowe ilości innych metali takich jak nikiel, kobalt, pallad, gdyż nierzadko wszczepy deklарowane jako czysto tytanowe zawierają w składzie niewielkie domieszki tych metali [Valentine-Thon 2006, Stejskal 1999]. Brak natomiast jest obecnie naukowo udowodnionego mechanizmu powstania reakcji alergicznych powiązanych z tytanem [Rusinek 2008, Lalor 1990].

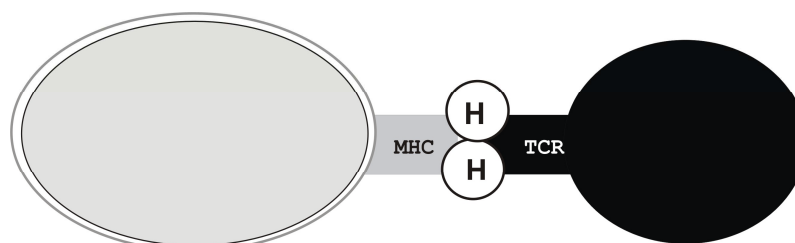
W przypadku podejrzenia o uczulenie na tytan i jego związki, rozważa się, iż uwalniane cząstki/jony jako hapteny łączą się z białkami tkanki i mogą indukować IgE-zależną alergię. Zjawisko to jednak do chwili obecnej nie zostało w piśmiennictwie jednoznacznie potwierdzone [Friedmann 2006].



Rycina 2. Mechanizm reakcji alergicznej na metale. Jony metalu łączą się z białkami pozakomórkowymi, wnikając do komórki prezentującej antygen (APC) i są prezentowane limfocytom Th (CD4+) via TCR; H – jon metalu (haptenu), B – białko pozakomórkowe, MHC II – k [Makuch 2010].



Rycina 3. Jony metalu wnikają do wnętrza komórki APC łącząc się z białkami wewnątrzkomórkowymi i po rozłożeniu w endosomach przedstawione są w kontekście MHC I limfocytom Tc (CD 8+) via TCR; H – jon metalu (haptenu), B – białko wewnątrzkomórkowe, MHC I – k [Makuch 2010].



Rycina 4. Jony metalu aktywują limfocyty T łącząc się bezpośrednio z MHC komórki prezentującej antygen oraz TCR limfocyty T, podobnie jak to się dzieje w przypadku superantygenów; H – jon metalu (haptenu), MHC – kompleks zgodności tkankowej, TCR – receptor [Makuch 2010].

Uważa się, że tytan może alergizować podobnie jak inne metale, np. nikiel, poprzez uwrażliwienie swoiste limfocytów T wywołując IV typ nadwrażliwości. Do zjawiska tego może dochodzić w różny sposób:

- jony metalu łączą się z białkami pozakomórkowymi, wnikając do komórki prezentującej antygen (APC) i są prezentowane limfocytom Th (CD4+) via TCR (ryc. 2),
- jony metalu wnikają do wnętrza komórki APC łączą się z białkami wewnątrzkomórkowymi i po rozłożeniu w endosomach przedstawione są w kontekście MHC I limfocytom Tc (CD 8+) via TCR (ryc. 3),
- jony metalu aktywują limfocyty T łącząc się bezpośrednio z MHC komórki prezentującej antygen oraz TCR limfocytu T, podobnie jak to się dzieje w przypadku superantygenów (ryc. 4) [Rusinek 2008, Czarnobilska 2007, Friedmann 2006, Thomas 2006, Lalor 1990].

Problemy z diagnozowaniem tej szczególnej alergii związane są z brakiem ukierunkowanych na tytan testów. Skórny test płatkowy, często stosowany z powodzeniem w innych rodzajach alergii, nie jest narzędziem odpowiednim w przypadku tytanu i potwierdza się tylko w około 20% przypadków [Śpiewak 2008, Śpiewak 2007, Müller 2006, Stejskal 2006, Śpiewak 1993]. Materiał diagnostyczny słabo przenika w głąb skóry i nie daje odpowiedzi komórkowej, która jest spotykana przy innych alergizujących materiałach stomatologicznych. Reakcja immunologiczna często związana jest z produktami korozji implantu nie występującymi w tej formie w teście. Odpowiedniejszym narzędziem wydaje się być diagnoza *in vitro* próbki krwi na podstawie immunologicznego testu transformacji blastycznej limfocytów (LTT – Lymfocyte Transformation Test). Zoptymalizowana modyfikacja testu – MELISA[®] (Memory Lymphocyte Immuno-Stimulation Assay) ocenia zdolność transformacji blastycznej limfocytów (prolifracji limfocytów) i zdolność zahamowania ich migracji pod wpływem czynnika inicjującego jakim mogą być metale [Rusinek 2008, Pryliński 2007, Venclíkova 2007, Müller 2006, Valentine-Thon 2003, Stejskal 1999]. Sicilia po przebadaniu 35 spośród 1500 pacjentów leczonych implantologicznie zauważyła, że u części z nich występują reakcje na tytanowe wszczepy. Sugeruje konieczność wykonywania testów alergicznych u pacjentów z objawami nadwrażliwości

oraz u tych, gdzie nastąpiło odrzucenie implantu [Sicilia 2008]. Przeprowadzone na szeroką skalę badania z zastosowaniem testu MELISA[®] zarówno dla skórnych jak i nieskórnych uczulających antygenów udowodniły, że duża część populacji krajów rozwiniętych cierpi na nadwrażliwość na metale, przy czym związki tytanu znajdowały się także w tabeli uczulających metalicznych antygenów [Müller 2006, Valentine-Thon 2006, Valentine-Thon 2003, Stejskal 1999]. Valentine-Thon i wsp. testując 700 pacjentów wykazali w 4,2% przypadków reakcję na tlenek tytanu. Odnotowali, że objawy kliniczne korelowały z wynikami testu MELISA[®], a usunięcie materiału tytanowego przywróciło pierwotny stan zdrowia. Müller i Valentine-Thon w innych badaniach wśród 56 testowanych pacjentów odnotowali 37,5% wynik pozytywny. Stwierdzono, iż tytan może wpływać na klinicznie istotną nadwrażliwość ujawnioną u pacjentów poddanych oddziaływaniu protez dentystycznych i wszczepów śródkostnych [Müller 2006]. Obecnie uważa się, że test MELISA[®] jest najbardziej użytecznym, powtarzalnym i wiarygodnym dla identyfikacji i monitorowania wrażliwości na metal u osób wykazujących objawy uczuleniowe.

Alergia na tytan jest na szczęście nadal zjawiskiem rzadkim, a unikalne właściwości czynią z niego wszechstronny, wysoce biozgodny materiał, który zdobywa coraz to nowe strefy zastosowania w medycynie i stomatologii pod warunkiem, że nie zawiera uczulających innych metali pojawiających się w śladowych ilościach w wyniku procesów przetwarzania. Pojawiające się w światowym piśmiennictwie doniesienia o niekorzystnym oddziaływaniu tytanu na organizm ludzki nie pozwalają definitywnie wykluczać mechanizmu immunologicznego ujawniającego się w wyniku kontaktu tkanek ustrojowych z tytanem.

3. CELE PRACY

Obserwowane klinicznie przebarwienia tkanek miękkich przy implantowanych filarach i wykazane we własnych badaniach wstępnych uwalnianie się jonów metali do tkanek kontaktujących się z śródkostnymi wszczepami stanowiły inspirację do bliższego zaznajomienia się z tym tematem.

W związku z powyższym postanowiono przeprowadzić:

- analizę ilościową jonów tytanu w błonie śluzowej pokrywającej dwuetapowe wszczepy śródkostne w okresie ich wgajania (4–6 miesięcy),
- porównanie zawartości tytanu w błonie śluzowej pokrywającej wszczepy śródkostne różnych systemów implantologicznych,
- osobniczą i międzyosobniczą analizę zawartości tytanu w otaczających tkankach,
- próbę określenia zależności między zawartością tytanu w błonie śluzowej a lokalizacją śródkostnych wszczepów oraz płcią i wiekiem pacjentów.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Projekt badawczy realizowano w następujących etapach:

1. Pobranie materiału biologicznego od pacjentów poddanych leczeniu implantologicznemu.
2. Ocena zawartości jonów tytanu w błonie śluzowej pokrywającej dwuetapowe wszczepy śródkostne.
3. Analiza wyników.

4.1. Materiał

W badaniach analizowano błonę śluzową pokrywającą dwuetapowe, śrubowe, śródkostne implanty tytanowe. Implantacje przeprowadzono u 43 pacjentów w tym 25 kobiet i 18 mężczyzn w wieku od 31 do 81 lat (średnia 57). Wszczepiono łącznie 100 implantów z różnych systemów implantologicznych (tab. 28). Zasadniczy materiał biologiczny stanowiła błona śluzowa pobierana z wyrostka zębodołowego szczęki (22) i żuchwy (27) nad śródkostnymi wszczepami.

Próbkę kontrolną stanowiło 21 wycinków błony śluzowej z wyrostka zębodołowego pobieranej podczas implantacji oraz innych zabiegów chirurgicznych u pacjentów nie posiadających w jamie ustnej metalowych uzupełnień (tab. 29). Pacjenci byli kwalifikowani do zabiegu implantacji według ogólnie przyjętych zasad, uwzględniających zarówno warunki miejscowe jak i ogólny stan zdrowia.

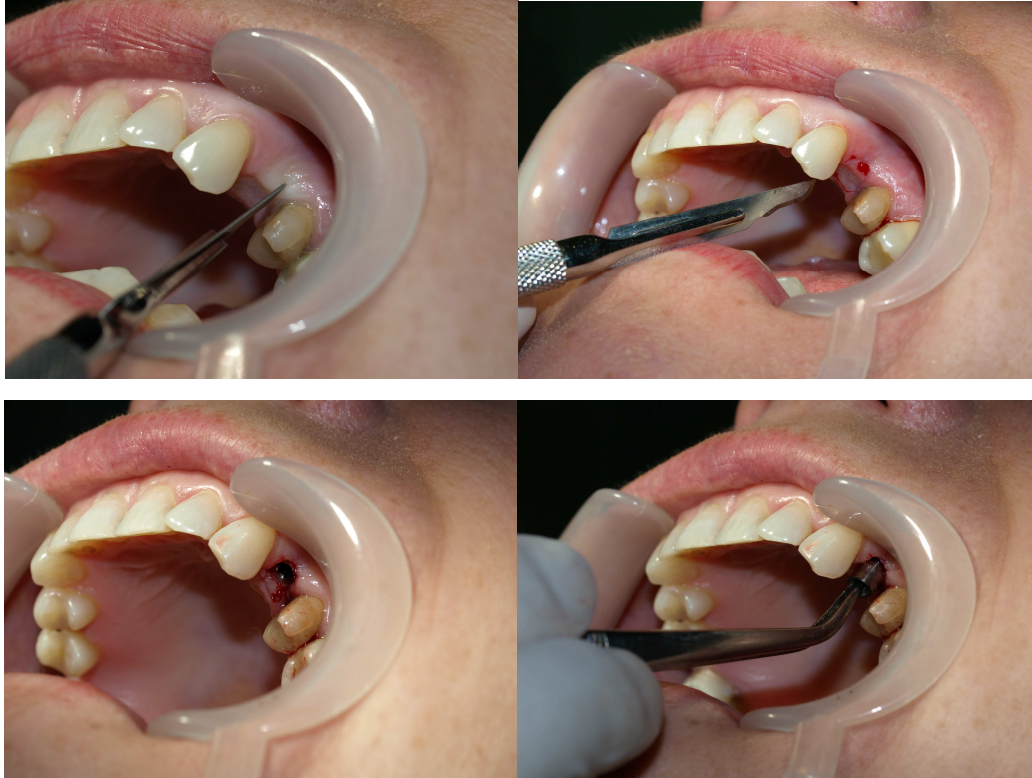
4.1.1. Pobranie materiału biologicznego od pacjentów poddanych wszczepieniu implantów

Materiał badawczy stanowiły wycinki błony śluzowej pobierane od pacjentów zakwalifikowanych do zabiegu implantacji śródkostnej (ryc. 5, 6). Zabiegi implantacji późnej wykonywane były wg klasycznej metody Bränemarka z zastosowaniem dwuetapowych wszczepów stomatologicznych różnych systemów (Osteoplast[®], Neoss[®], Ilerimplant[®], Biomet 3i[®], SKY[®]

i Implant Direct®) [Bränemark 1985]. Na podstawie firmowych metryczek odnotowano, że wszystkie implanty były wykonane z tytanu klasy IV. Po odseparowaniu płata śluzówkowo-okostnowego wykonano łożo kostne i wprowadzono implant, tak by górna krawędź jego platformy znajdowała się na wysokości blaszki zbitej wyrostka zębodołowego. Po zamknięciu części śródkostnej śrubą zaślepiającą i dokładnym zaszyciu rany, wgajanie implantu odbywało się bez kontaktu ze środowiskiem jamy ustnej. Stosowano pozabiegową antybiotykoterapię według ogólnie przyjętych zasad, a pacjenci przeprowadzali zabiegi higieniczne zgodnie z przekazanymi im na piśmie zaleceniami. Po upływie 4-6 miesięcy, czyli okresie osteointegracji, wykonano zabieg odsłonięcia wszczepów, poprzez wycięcie błony śluzowej pokrywającej powierzchnię nośną implantu i umieszczenie w nim śruby gojącej. Odsłonięcia dokonywano przy użyciu skalpela, ostrożnie preparując tkanki miękkie nad wszczepem, aby wykluczyć przedostanie się drobin metali z uszkodzeń mechanicznych do materiału badawczego. Przed dokonaniem wszczepienia części śródkostnej, podczas odpreparowywania płata śluzowego na wyrostku zębodołowym, pobrano wycinek błony śluzowej z okolicy planowanego łoża implantu. Skrawek ten jako materiał kontrolny posłużył do określenia ewentualnej zawartości tytanu w tkankach miękkich nie kontaktujących się wcześniej z implantem. Ponadto wycinki błony śluzowej pobierane z wyrostka zębodołowego podczas innych zabiegów chirurgicznych stanowiły część grupy kontrolnej i pochodziły od pacjentów nie posiadających metalowych uzupełnień protetycznych w jamie ustnej. Bezpośrednio po pobraniu, wycinki zamrażano i przetransportowywano do laboratorium Zakładu Chemii Analitycznej UAM, gdzie dokonano analizy zawartości tytanu w pobranym materiale.

Do pobrania próbki jak i do późniejszego przechowywania stosowano sprzęt i naczynia dokładnie oczyszczone, wytrawione oczyszczonym kwasem, dokładnie wypłukane wodą o wysokim stopniu czystości i wysuszone.

Wszystkie etapy badań przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.



Rycina 5. Pobranie materiału do badań podczas odstąpienia wszczepu (przy użyciu skalpela).



Rycina 6. Pojemnik z badaną próbą.

4.2. Metody badawcze

4.2.1. Analiza zawartości jonów tytanu w błonie śluzowej

Analizę ilościową tytanu w dostarczonym materiale biologicznym wykonano w Zakładzie Chemii Analitycznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

4.2.1.1. Mineralizacja próbek

Proces mineralizacji polega na rozkładzie i utlenieniu związków organicznych zawartych w próbce z przeprowadzeniem składników do roztworu. Mineralizację stosuje się zazwyczaj w celu określenia obecności i ustalenia stężenia pierwiastków śladowych w badanej próbce.

Rodzaj mineralizacji zależy od typu badanej substancji, typu metody stosowanej do późniejszego oznaczania oraz od rodzaju analizowanych pierwiastków. W przypadku analizy ilościowej pierwiastków śladowych, jakim jest m.in. tytan, stosuje się metodę ciśnieniowo-mikrofalową.

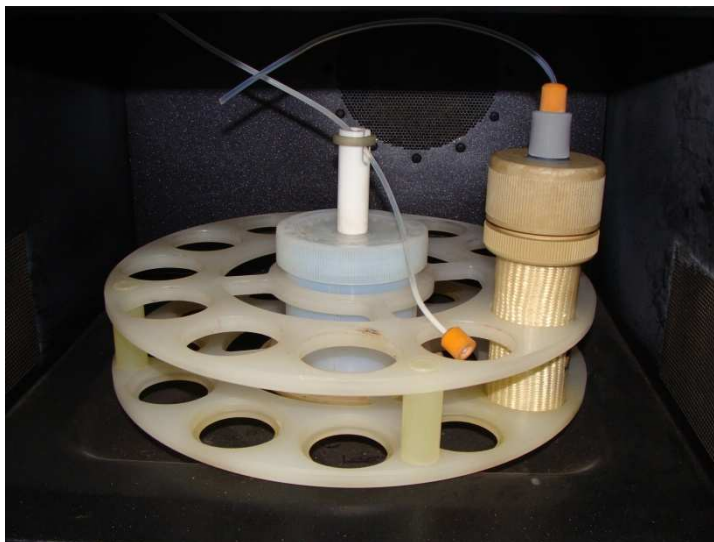
Mineralizacja ciśnieniowo-mikrofalowa to połączenie dwóch metod, tj. mineralizacji ciśnieniowej z wykorzystaniem tzw. „bomby teflonowej” i mineralizacji mikrofalowej.

W mineralizacji ciśnieniowo-mikrofalowej reakcje rozkładu przebiegają w zamkniętym, szczelnym naczyniu teflonowym, zwanym „bombą teflonową”, odpornym na działanie mocnych kwasów i wysokiej temperatury oraz przepuszczalnym dla promieniowania mikrofalowego. „Bomba teflonowa” umieszczona jest dodatkowo w stalowej obudowie ciśnieniowej, do której doprowadzana jest energia mikrofalowa o częstotliwości 2450 MHz, wytwarzana w generatorze mikrofalowym – magnetronie (ryc. 7).

W naczyniu zachodzi reakcja chemiczna badanej próbki z kwasami mineralnymi, która jest wspomagana oddziaływaniem promieniowania elektromagnetycznego. Energia promieniowania mikrofalowego jest bezpośrednio absorbowana przez polarne cząstki (wodę, kwasy nieorganiczne itp.), co stanowi znacznie szybsze i skuteczniejsze źródło energii niż klasyczne ogrzewanie. Wewnętrzne ogrzewanie cząsteczek

próbki powoduje jej rozpad, zwiększając tym samym powierzchnię kontaktu z reagentami i szybkość rozkładu. Powstające, w wyniku wydzielania gazów ciśnienie umożliwia stosowanie wyższych temperatur niż temperatury wrzenia kwasów w układach otwartych, a zatem skraca czas reakcji.

Urządzenia przeznaczone do prowadzenia procesów mineralizacji posiadają specjalne systemy zabezpieczeń przed zbyt wysokim ciśnieniem, miernik temperatury i ciśnienia.



Rycina 7. "Bomba teflonowa" w piecu mikrofalowym.

Otrzymane do analizy próbki zalewano 3 ml 65% HNO_3 i 2 ml H_2O_2 i mineralizowano w piecu mikrofalowym MDS-2000 (ryc. 8).

W ten sam sposób jak próbki badane przygotowano próbkę zerową (ślepa próba). Jest to próbka zawierająca wszystkie odczynniki użyte do mineralizacji, ale pozbawiona jest materiału badanego. Próbki po mineralizacji przenoszono ilościowo do kolbek o pojemności 10 ml, uzupełniano wodą redestylowaną i oznaczano w nich zawartość jonów tytanu wyrażaną w $\mu\text{gTi/g}$ tkanki.



Rycina 8. Piec mikrofalowy MDS-2000.

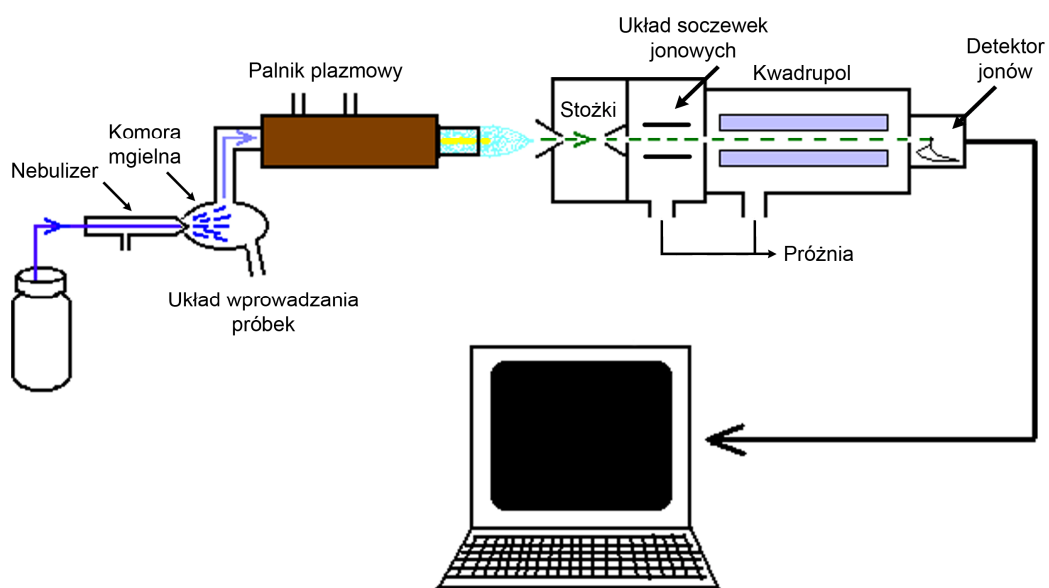
4.2.1.2. Analiza metodą spektrometrii masowej z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-MS)

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) jest metodą analityczną umożliwiającą szybką analizę wielopierwiastkową. Wykorzystuje zjawisko plazmy, czyli silnie zjonizowanego gazu, w którym liczba wolnych elektronów jest równa liczbie jonów dodatnich. Plazma sprzężona indukcyjnie jest generowana w znajdującym się pod ciśnieniem gazie (argonie), który przepływa przez cewki indukcyjne wytwarzając energetyczne pole o dużej częstotliwości.

Cewki te zwykle pracują z częstotliwością około 30 MHz i na poziomach energii 1000–2000 W. Uzyskiwana temperatura, w tak wytworzonej plazmie, wynosi od 6000 do 10000 K, umożliwiając wzbudzenie lub zjonizowanie większości badanych analitów. Kwarcowy palnik, w którym tworzy się plazma, składa się z trzech koncentrycznych rurek, przy czym w każdej z nich argon przepływa z innym natężeniem. Otrzymane w ten sposób trzy strumienie argonu tworzą główne składniki plazmy: zewnętrznym kanałem płynie gaz chłodzący oraz pomocniczy, kanałem środkowym – gaz, który zapobiega rozproszeniu lub załamaniu się stożka plazmowego,

natomiast centralnym kanałem wprowadzana jest próbka w postaci aerozolu lub gazu. Jony pochodzące z ICP są zasysane do wnętrza spektrometru masowego, przechodząc przez dwa stożki. Następnie jony te są ogniskowane za pomocą soczewek jonowych i przepływają dalej do właściwego detektora masowego, którym najczęściej jest kwadrupol, zbudowany z czterech symetrycznie ułożonych równoległych prętów. Przeciwległe pręty są ze sobą połączone elektrycznie, do dwóch sąsiednich prętów kwadrupola przyłożone jest napięcie, które jest sumą napięcia stałego i zmiennego. W tak utworzonym polu elektromagnetycznym tylko jony o odpowiednim stosunku ładunku do masy poruszają się w centralnej jego części; pozostałe ulegają rozproszeniu i nie przechodzą przez analizator. Poprzez zmianę napięcia stałego lub zmiennego, a także częstotliwości napięcia przyłączonego do prętów można ustawić analizator w taki sposób, aby przepuszczał tylko jony o określonym zakresie stosunku masy do ładunku (m/z) i z określoną dokładnością. Dzięki niskim kosztom produkcji, prostemu działaniu oraz relatywnie szybkiemu rozdzielaniu jonów ze względu na ich stosunek masy do sygnału są one najczęściej stosowanym analizatorem w technice ICP-MS. Tak rozdzielone jony są następnie zliczane w powielaczu elektronowym.

Zasadniczymi elementami spektrometru ICP-MS są: układ wprowadzania próbek (nebulizer, komora mgielna), palnik plazmowy, stożki, układ soczewek jonowych, analizator mas (kwadrupol), detektor jonów oraz układ pomp wytwarzających próżnię (ryc. 9) [Szopa 2009, Bulska 1999].



Rycina 9. Schemat spektrometru emisyjnego z indukcyjnie sprzężoną plazmą [<http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.htm>].

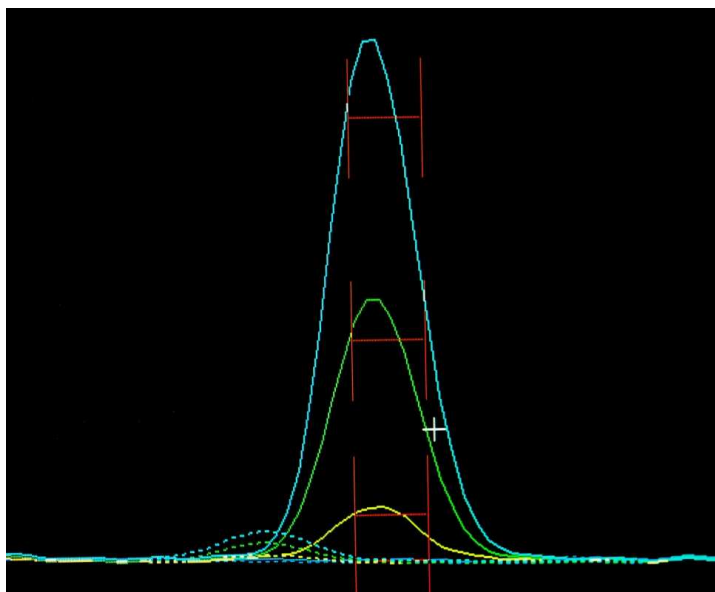
Badania dla potrzeb tej rozprawy zostały wykonane na spektrometrze emisyjnym z indukcyjnie sprzężoną plazmą ICP-MS firmy VARIAN (tab. 32, ryc. 10).



Rycina 10. Spektrometr ICP-MS Varian.

4.2.1.3. Warunki analizy ICP-MS

- moc plazmy – 1 kW,
- przepływ gazu plazmowego – 15 l/min.,
- przepływ gazu wspomagającego – 1,5 l/min.,
- długość fali przy której analizowano Ti – $\lambda = 336,122$ nm.



Rycina 11. Przykładowy sygnał ICP obrazujący piki dla roztworów wzorcowych tytanu.



Rycina 12. Krzywa kalibracyjna dla jonów Ti.

Obliczeń zawartości jonów Ti w badanych próbkach dokonano na podstawie krzywej wzorcowej, przygotowanej w zakresie stężeń od 0,01 do 5,0 $\mu\text{g/ml}$ z materiału referencyjnego o stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$ w identycznych warunkach analitycznych (ryc. 11, 12).

4.3. Analiza statystyczna wyników

Wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej w Katedrze Biostatystyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Ponieważ rozkłady zmiennych nie spełniały warunków normalności zastosowano testy nieparametryczne, gdyż są one mało wrażliwe na obserwacje odstające. Do najpopularniejszych metod nieparametrycznych zaliczamy rangowe metody statystyczne.

Dla porównania dwóch grup, np. kobiety/mężczyźni, szczęka/żuchwa, czy różnych systemów implantologicznych (Osteoplant[®]/pozostałe systemy) stosowano test Manna-Whitney'a.

$$U_1 = R_1 - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2}$$

gdzie

U_1 –wynik testu

R_1 – suma stopni próbki

n_1 – wielkość próby dla próbki 1

[<http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>]

Dla porównania większej liczby systemów implantologicznych zastosowano test Kruskala-Wallisa.

Danymi wejściowymi jest n -elementowa próba statystyczna podzielona na k rozłącznych grup o licznosciach n_1, n_2, \dots, n_k . Zakłada się, że każda grupa jest losowana z innej populacji.

Wykonywane jest rangowanie całej próby (połączone wszystkie grupy),

gdzie

R_{ij} – ranga w całej próbie j -tego elementu z i -tej grupy.

Statystyka testowa Kruskala-Wallisa:

$$T = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k n_i \left(\bar{R}_i - \frac{n+1}{2} \right)^2$$

gdzie

$$\bar{R}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} R_{ij}$$

[<http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>]

Do badania zależności między zmiennymi zastosowano **współczynnik korelacji Spearmana** (zależność od wieku w badanej grupie).

$$r_S = \text{corr}(RX, RY)$$

gdzie:

corr – to klasyczny współczynnik korelacji

RX – to rangi zmiennej X w próbie,

RY – to rangi zmiennej Y w próbie.

Relacje pomiędzy badanymi grupami określone zostały poprzez wyznaczenie za pomocą w/w testów tak zwanego **poziomu istotności P**. Statystyczną istotnością wyniku nazywamy miarę stopnia, do jakiego jest on prawdziwy.

Hipotezy weryfikowano na poziomie 0,05.

[<http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>].

5. WYNIKI BADAŃ

Dla każdej badanej próby oznaczono, po uprzedniej mineralizacji, zawartość tytanu w suchej masie w $\mu\text{g/g}$ metodą Spektrometrii Masowej Sprzężonej Indukcyjnie z Plazmą ICP-MS. Metoda ta charakteryzuje się wysoką czułością w zakresie 1–100 pg/ml, a granica błędu w przypadku oznaczania tytanu wynosi 0,0008 $\mu\text{g/g}$.

Zawartość jonów tytanu w badanych próbkach zawierających wycinki błony śluzowej pobranych z nad wszczepów śródkostnych była zróżnicowana, zarówno w odniesieniu do różnych systemów implantologicznych jak i w obrębie jednego systemu.

Dokonując analizy wyników próbowano znaleźć różne zależności biorąc pod uwagę takie parametry jak:

- użyty system implantologiczny,
- lokalizacja wszczepu (szczeka, żuchwa),
- płeć pacjentów,
- grupę wiekową (wyodrębniono dwie grupy pacjentów: do 60. roku życia i powyżej 60. roku życia).

Przeprowadzono zarówno analizę wyników międzyosobniczą jak i wewnątrzosobniczą. Wyniki materiału właściwego (badanego) porównywano z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej.

5.1. Porównanie wyników dla grupy badanej i grupy kontrolnej

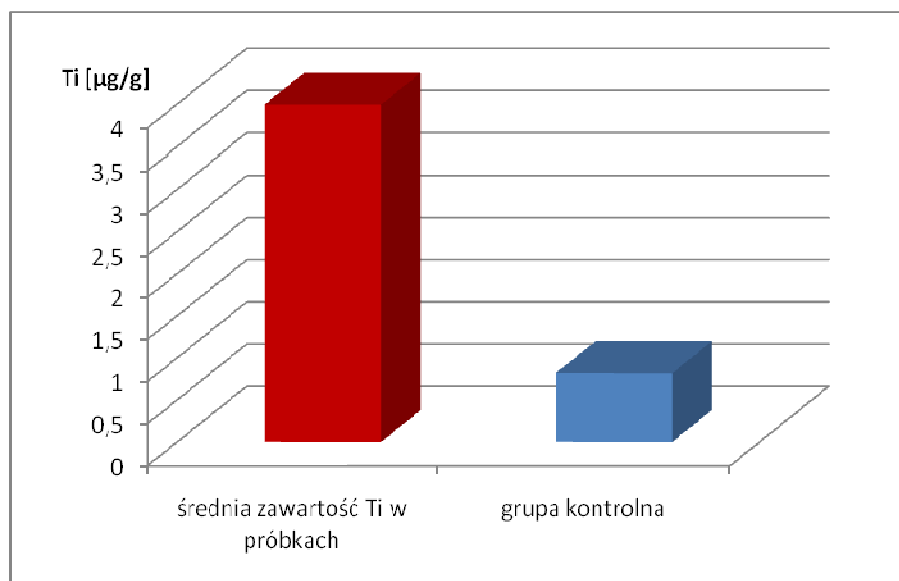
Głównym celem badania było wykazanie, w jakim stopniu następuje migracja jonów tytanu do tkanek miękkich otaczających stomatologiczne implanty śródkostne. Wykazano znacznie zwiększoną zawartość Ti w tkankach błony śluzowej bezpośrednio pokrywającej wszczepy śródkostne wszystkich użytych systemów implantologicznych w stosunku do grupy

kontrolnej, gdzie pobrane tkanki nie miały styczności z implantami i innymi uzupełnieniami metalowymi, a zwłaszcza tytanowymi.

Wyniki uzyskane dla grupy badanej (100 próbek) oraz kontrolnej (21 próbek) porównano (tab. 3, ryc.13) oraz poddano analizie statystycznej (tab. 4, 5, ryc. 14).

Tabela 3. Sumaryczne zestawienie średnich wyników Ti dla grupy badanej i kontrolnej

Grupy poddane badaniu	N	Średnia zawartość Ti [$\mu\text{g/g}$]
Grupa obejmująca tkanki pobrane z nad implantów – grupa badana (różne systemy implantologiczne)	100	3,994
Grupa kontrolna	21	0,818



Rycina 13. Ilustracyjne porównanie wyników średnich wartości uzyskanych od pacjentów poddanych implantacji w odniesieniu do grupy kontrolnej ($P \leq 0,05$).

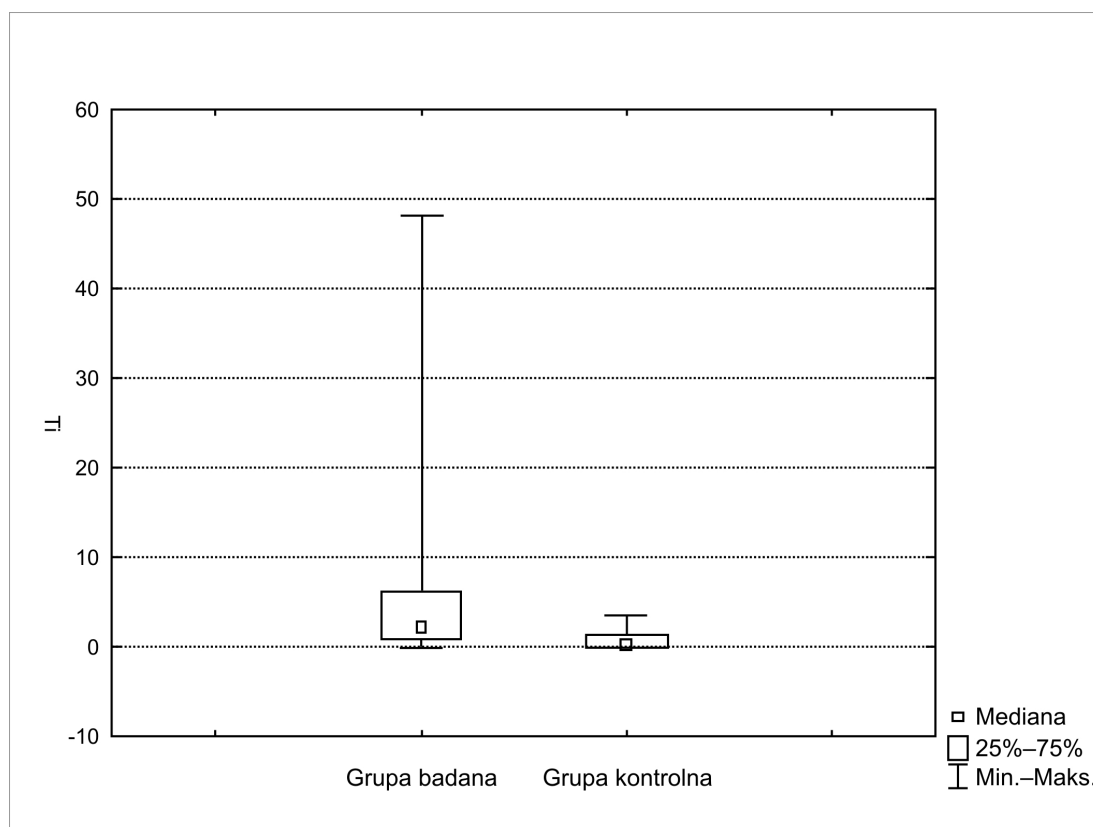
Z analizy testu Manna-Whitney'a wynika, iż pomiędzy badanymi grupami zachodzi istotna różnica statystyczna (poziom istotności P mniejszy od 0,05), co świadczy o uwalnianiu się jonów tytanu do błony śluzowej kontaktującej się z tytanowym wszczepem śródkostnym.

Tabela 4. Poziom istotności (P) dla grupy badanej i kontrolnej

Grupa badana	Grupa kontrolna	Z poprawnych	poziom p	P
100	21	4,67	0,000003	0,000001

Tabela 5. Parametry statystyczne grupy badanej i kontrolnej

	N ważnych	Średnia	Suma	Min.	Maks.	Wariancja	SD	Mediana
Grupa badana	100	3,99	506,79	0,00	122,59	56,47	7,51	2,09
Grupa kontrolna	21	0,82	16,36	0,00	3,66	1,29	1,14	0,12

Rycina 14. Wykres ilustrujący zależność zawartości tytanu w błonie śluzowej pobranej z implantu do zawartości tytanu z grupy kontrolnej ($P \leq 0,000$).

5.2. Porównanie wyników dla poszczególnych systemów implantologicznych

5.2.1. Zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi dla różnych badanych systemów implantologicznych

Dokonano porównania wyników uzyskanych w grupie badanej dla różnych systemów implantologicznych. Ustalono zależność pomiędzy grupami pacjentów, u których implantowano wszczepy systemu Osteoplast[®], Ilerimplant[®], Neoss[®], Biomet 3i[®], SKY[®], Implant Direct[®].

Dla poszczególnych systemów implantologicznych uzyskano następujące wyniki zawartości Ti, które przedstawiono tabelach 6-12:

Tabela 10. Charakterystyka materiału badawczego i zestawienie wyników dla systemu SKY®

Pacjenci	Płeć		Średnia wieku	Liczba implantów w lokalizacji		Średni wynik dla grupy Ti [µg/g]	Wariancja	SD
	K	M		szczeka	żuchwa			
3	3	-	50,00	3	1	2,64	0,53	2,73

Tabela 11. Charakterystyka materiału badawczego i zestawienie wyników dla systemu Implant Direct®

Pacjenci	Płeć		Średnia wieku	Liczba implantów w lokalizacji		Średni wynik dla grupy Ti [µg/g]	Wariancja	SD
	K	M		szczeka	żuchwa			
1	1	-	31,00	1	-	1,44	-	-

Tabela 12. Grupa kontrolna

Pacjenci	Płeć		Średnia wieku	Liczba próbek w lokalizacji		Średni wynik dla grupy Ti [µg/g]	Wariancja	SD
	K	M		szczeka	żuchwa			
20	11	9	45,70	13	8	0,82	1,29	1,14

Tabela 10. Charakterystyka materiału badawczego i zestawienie wyników dla systemu SKY®

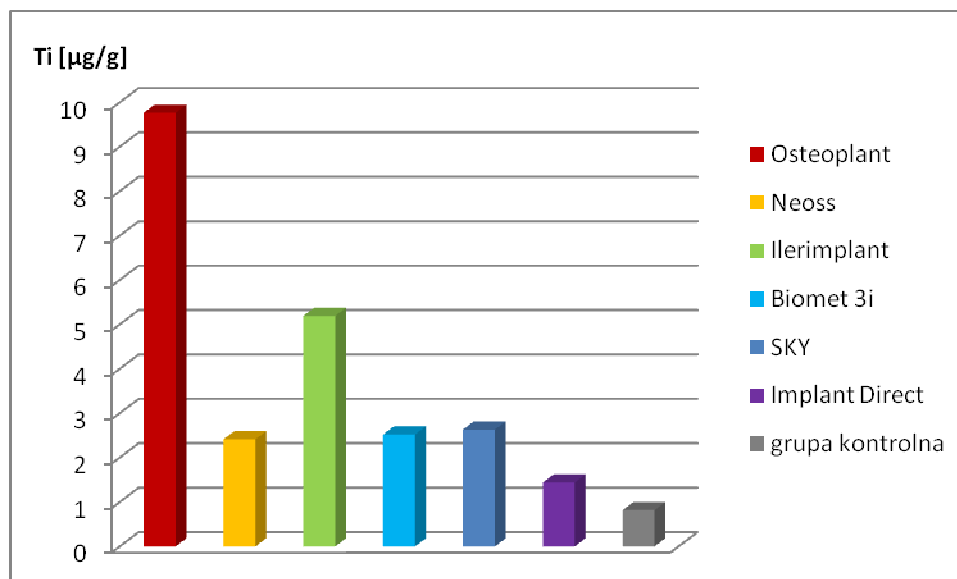
Pacjenci	Płeć		Średnia wieku	Liczba implantów w lokalizacji		Średni wynik dla grupy Ti [µg/g]	Wariancja	SD
	K	M		szczeka	żuchwa			
3	3	-	50,00	3	1	2,64	0,53	2,73

Tabela 11. Charakterystyka materiału badawczego i zestawienie wyników dla systemu Implant Direct®

Pacjenci	Płeć		Średnia wieku	Liczba implantów w lokalizacji		Średni wynik dla grupy Ti [µg/g]	Wariancja	SD
	K	M		szczeka	żuchwa			
1	1	-	31,00	1	-	1,44	-	-

Tabela 12. Grupa kontrolna

Pacjenci	Płeć		Średnia wieku	Liczba próbek w lokalizacji		Średni wynik dla grupy Ti [µg/g]	Wariancja	SD
	K	M		szczeka	żuchwa			
20	11	9	45,70	13	8	0,82	1,29	1,14



Rycina 15. Wykres ilustrujący wartości średnie zawartości tytanu w błonie śluzowej pobranej znad wszczepów sześciu systemów implantologicznych i grupy kontrolnej.

Analiza powyższych wyników wskazuje na zróżnicowane uwalnianie się jonów tytanu zależnie od zastosowanego systemu implantologicznego.

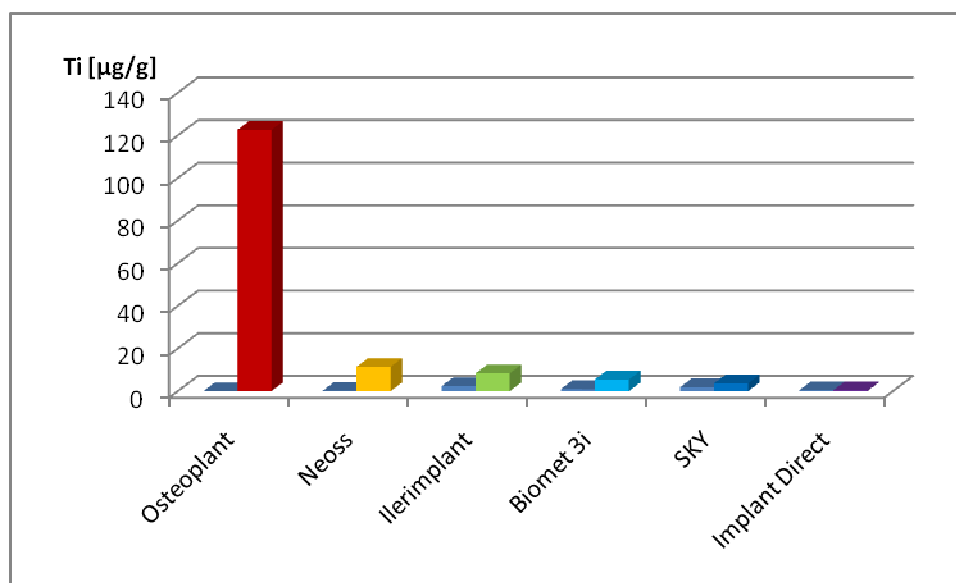
Odotowano najwyższą zawartość tytanu w błonie śluzowej pobranej znad implantów systemu Osteoplast[®], a następnie znad systemu Ilerimplant[®]. Najniższe wartości uzyskano dla pojedynczego wszczepu systemu Implant Direct[®].

Zawartość tytanu w błonie śluzowej pobranej znad wszczepów Neoss[®], Biomet 3i[®], SKY[®] jest zbliżona (tab. 13, 30, ryc. 15, 16).

Tabela 6. Zestawienie typów implantów z nad których pobrano wycinki błony śluzowej

System	Liczba pacjentów	Płeć		Miejsce		Etap		Liczba wszczepów	Wyniki (od do)	
		K	M	Szczeka	Żuchwa	I	II		Min	Max
Osteoplast®	24	14	10	10	15	8	24	52	pld*	122,59
Neoss®	10	4	6	7	6	1	10	30	0,14	11,4
Ilirimplant®	3	2	1	0	3	0	3	5	2,4	8,4
Biomet 3i®	3	2	1	2	2	0	3	8	0,99	5,49
SKY®	3	3	0	2	1	2	3	4	1,85	3,66
Implant Direct®	1	1	0	1	0	1	1	1	0,43	0,43

*pld – poniżej limitu detekcji



Rycina 16. Wykres ilustrujący wartości minimalne i maksymalne zawartości Ti w błonie śluzowej pobranej z nad wszczepów z różnych systemów implantologicznych.

Na podstawie testu Kruskala-Wallisa wynika, iż pomiędzy badanymi grupami Osteoplast[®] i Neoss[®] można odnotować istotną różnicę ($P \leq 0,05$). Nie odnotowano natomiast znamiennej różnicy statystycznej porównując między sobą pozostałe systemy implantologiczne (tab. 14, 15, ryc. 17). Te ostatnie wyniki wydają się nie być w pełni miarodajne ze względu na małą liczbę analizowanych próbek i należy je traktować orientacyjnie.

Tabela 7. Zależności (poziom istotności) pomiędzy badanymi próbkami z różnych systemów implantologicznych

	O	I	N	B	S
O		1,00	0,05*	1,00	1,00
I	1,00		0,28	1,00	1,00
N	0,05*	0,28		1,00	1,00
B	1,00	1,00	1,00		1,00
S	1,00	1,00	1,00	1,00	

* odnotowano różnice istotne statystycznie

Tabela 8. Parametry statystyczne dla próbek z różnych systemów implantologicznych

	N ważnych	Średnia	Suma	Min.	Maks.	Wariancja	SD	Mediana
B	8	2,52	20,18	0,99	5,49	2,09	1,45	2,64
I	5	5,19	27,40	2,44	8,40	7,39	2,72	4,02
N	30	2,41	72,37	0,14	11,40	9,11	3,02	2,33
O	52	9,76	500,75	0,00	122,59	341,02	18,46	3,02
S	4	2,63	8,68	1,85	3,66	0,53	0,73	3,20

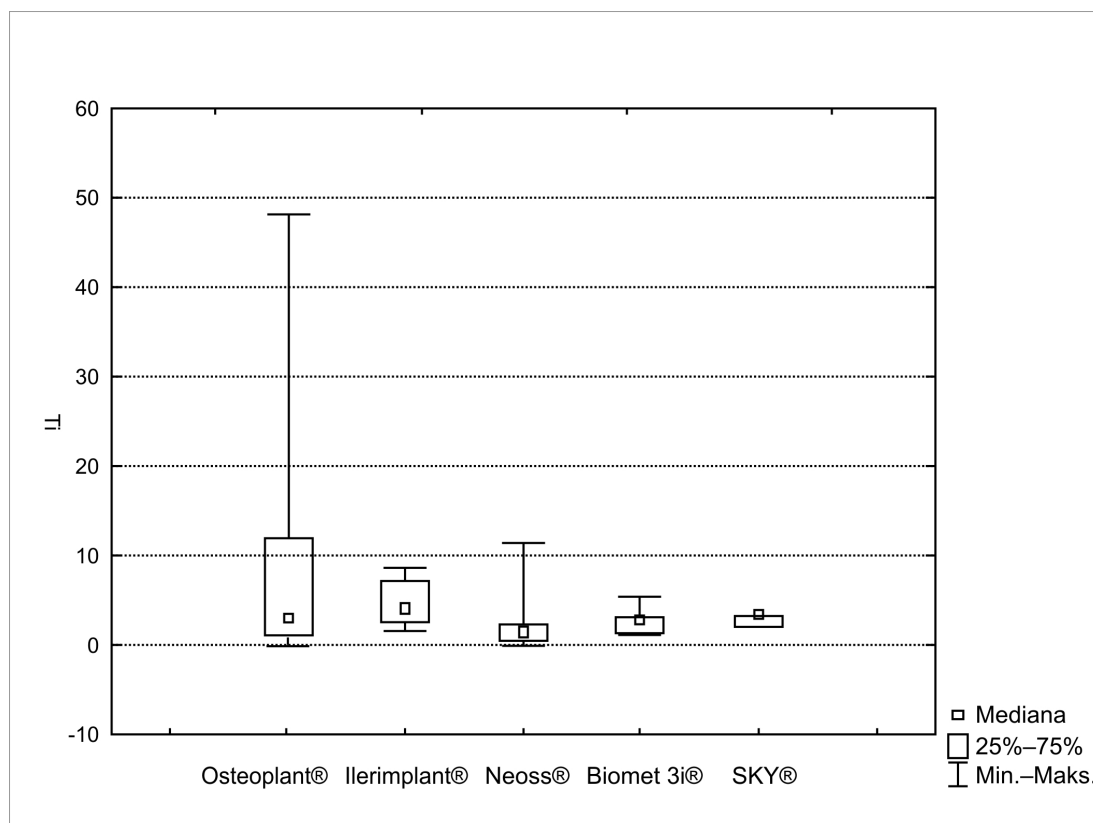
O – Osteoplast[®]

I – Ilerimplant[®]

N – Neoss[®]

S – SKY[®]

B – Biomet 3i[®]



Rycina 17. Zależności statystyczne zawartości Ti w błonie śluzowej pobranej znad wszczepów różnych systemów implantologicznych ($P \leq 0,05$).

Z uwagi na małą liczebność próbek pobranych znad implantów Ilerimplant®, Biomet 3i®, SKY®, Implant Direct® dokonano następujących porównań:

- Osteoplast® – Neoss®
- Osteoplast® – pozostałe systemy implantologiczne (5)
- Wszystkie systemy – grupa kontrolna
- Osteoplast® – grupa kontrolna
- Neoss® – grupa kontrolna

5.2.2. Zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi dla największej grupy systemu implantologicznego – Osteoplast[®], a pozostałymi systemami

Największą grupę badaną stanowiły próbki pobrane od pacjentów, którym implantowano wszczepy systemu Osteoplast[®]. W związku z tym, że pozostałe systemy implantologiczne były stosowane rzadziej i liczba próbek z nad poszczególnych systemów była zróżnicowana i zdecydowanie mniejsza zdecydowano, że stanowiąc będą one jedną grupę porównawczą. Wydaje się zasadne zbadanie czy istnieje statystyczna różnica pomiędzy zawartością tytanu w błonie śluzowej pobranej z nad implantów Osteoplast[®] oraz pozostałych systemów.

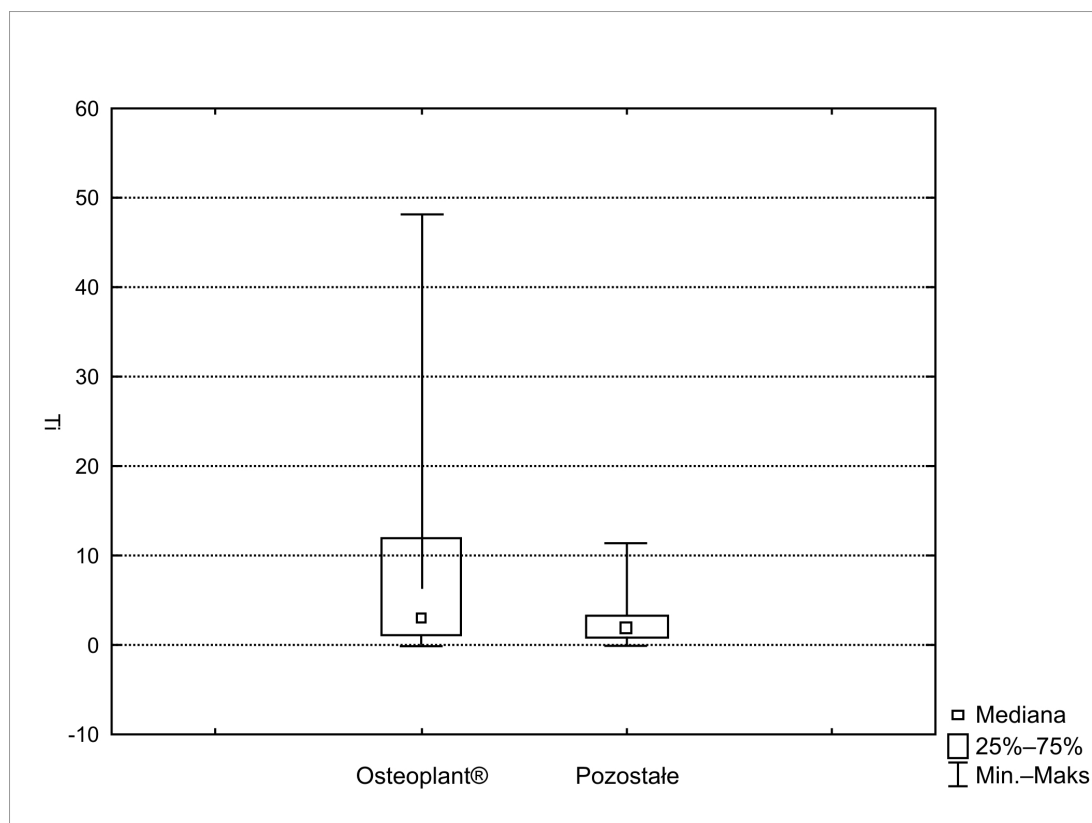
Z porównania wyników dla grupy badanej, przy zastosowaniu testu Manna-Whitney'a wynika, iż pomiędzy grupą Osteoplast[®], a grupą pozostałych pacjentów zaopatrzonych implantami innych systemów, zachodzi istotna różnica statystyczna ($P \leq 0,05$) (tab. 16, 17, ryc. 18). Oznacza to, że migracja jonów Ti z wszczepów Osteoplast[®] jest wyraźnie większa niż w przypadku pozostałych systemów.

Tabela 9. Poziom istotności dla grupy badanej systemu Osteoplast[®] i pozostałych systemów

Osteoplast [®]	Pozostałe systemy.	Z popraw.	poziom p	P
52	48	2,18	0,03	0,03

Tabela 10. Parametry statystyczne dla grupy badanej systemu Osteoplast[®] i pozostałych systemów implantologicznych

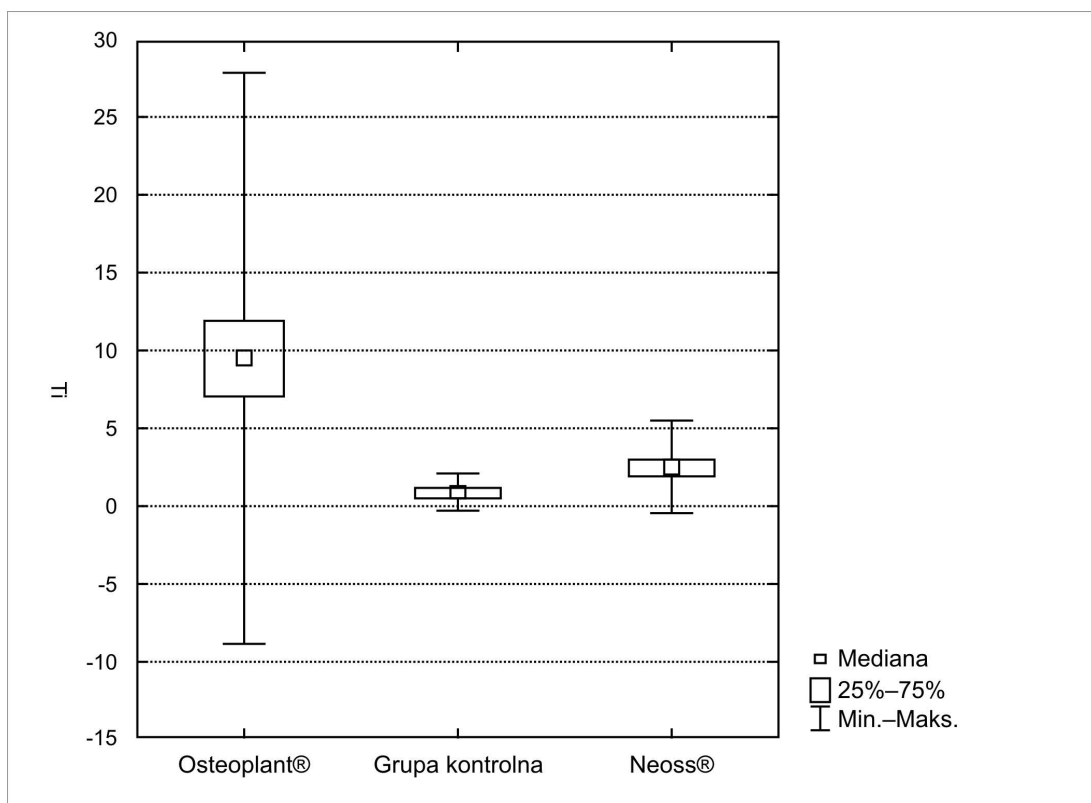
	N ważnych	Średnia	Suma	Min.	Maks.	Wariancja	SD	Mediana
Osteoplast [®]	52	9,76	500,75	0,00	122,59	341,02	18,46	3,02
Pozostałe systemy	48	2,68	128,63	0,00	11,40	7,41	2,72	2,68



Rycina 18. Wykres ilustrujący zależność wyników zawartości Ti w błonie śluzowej pobranej z wsteczów systemu Osteoplast® w odniesieniu do wyników próbek z pozostałych systemów implantologicznych ($P = 0,03$).

Statystycznie istotną różnicę odnotowano także w odniesieniu do dwóch największych grup reprezentujących systemy Osteoplast® i Neoss®, zarówno w stosunku do siebie jak i w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 18, ryc. 19). W badaniu tym wykorzystano test Kruskala-Wallisa.

W przypadku tych dobrze udokumentowanych i licznych grup potwierdzeniu ulega teza, iż po wszczepieniu implantów zwiększa się zawartość tytanu w otaczających je tkankach miękkich, oraz że zróżnicowanie ilościowe zależne być może od zastosowanego systemu implantologicznego.



Rycina 19. Wykres ilustrujący zależności statystyczne wyników zawartości Ti pomiędzy najliczniejszymi grupami, tzn. Osteoplast® i Neoss® oraz grupą kontrolną ($P \leq 0,05$).

Tabela 11. Analiza statystyczna dla grupy badanej systemu Osteoplast®, Neoss® i grupy kontrolnej

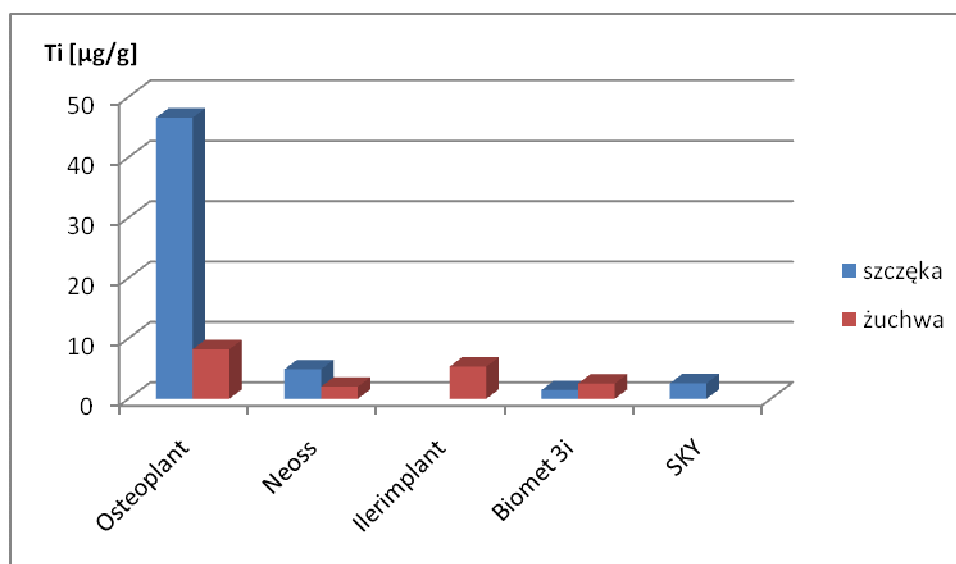
	Osteoplast®	Grupa kontrolna	Neoss®
Osteoplast®		0,00	0,05
Grupa kontrolna	0,00		0,02
Neoss®	0,05	0,02	

5.2.3. Porównanie wyników zawartości tytanu u pacjentów, którym wszczepiano większą liczbę implantów (analiza wewnątrzsobnicza)

W badaniach uczestniczyła grupa pacjentów poddanych leczeniu implantologicznemu, u których wszczepiono kilka śródkostnych implantów. Uzyskano odmienne wyniki dla próbek pobranych od tego samego pacjenta zarówno z odległych jak i bliskich siebie lokalizacji wszczepów (tab. 19, 31, ryc. 20).

Tabela 12. Zestawienie wyników dla różnych lokalizacji wszczepów u pacjentów posiadających więcej niż dwa implanty

System	Średnia Ti	
	szczeka	żuchwa
Osteoplast®	46,58	8,21
Neoss®	4,90	2,02
Ilerimplant®	-	5,34
Biomet 3i®	1,44	2,54
SKY®	2,57	-



Rycina 20. Wykres ilustrujący średnie wyniki zawartości Ti dla różnych systemów implantologicznych u pacjentów poddanych analizie wewnątrzsobniczej.

Analizując wyniki uzyskane u pacjentów, którzy zostali zaopatrzeni w większą liczbę implantów nie odnotowano znamiennej różnicy pomiędzy poszczególnymi próbkami pobranymi od tego samego pacjenta. Analiza wewnątrzsobnicza nie jest charakterystyczna zarówno w aspekcie porównywalnych wyników dla jednego pacjenta jak i spodziewanych różnic w zależności od lokalizacji (szczeka – żuchwa, okolica przednia lub boczna wyrostka zębodołowego). O zawartości tytanu w błonie śluzowej pobranej z nad wszczepów śródkostnych od tego samego pacjenta, nie decydują zatem czynniki charakterystyczne dla całej grupy lecz każdy wszczep powinien być rozpatrywany jednostkowo.

5.2.4. Porównanie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej w zależności od lokalizacji wszczepu

Próba znalezienia zależności pomiędzy grupą pacjentów, u których implantowano wszczepy w żuchwie, a grupą pacjentów, których implantowano w szczękę została przeprowadzona w oparciu o wyniki zestawione w tabelach 20, 21.

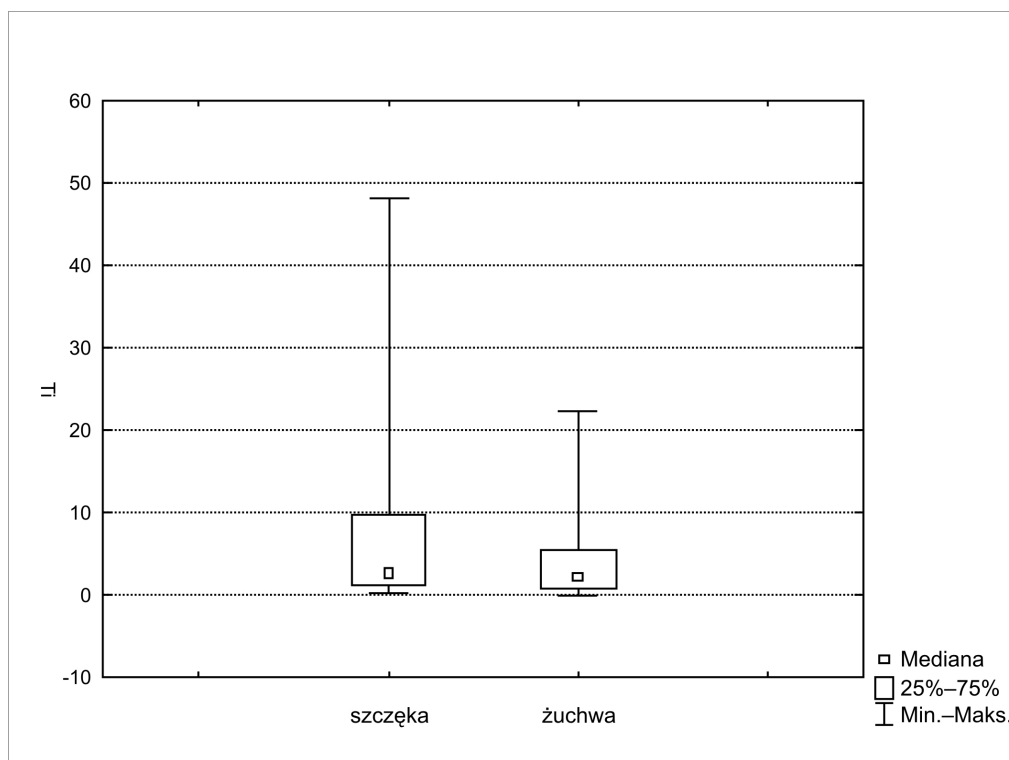
Na podstawie testu Manna-Whitney'a odnotowano, iż lokalizacja wszczepu (żuchwa, szczeka) nie ma znaczenia dla uwalniania się jonów tytanu i jego zawartości w błonie śluzowej ($P \geq 0,05$) (ryc. 21).

Tabela 13. Poziom istotności dla grupy badanej zależnej od lokalizacji

Szczeka	Żuchwa	Z popraw.	Poziom p	P
58	42	1,12	0,26	0,27

Tabela 14. Parametry statystyczne dla grupy badanej w zależności od lokalizacji implantów

	N ważnych	Średnia	Suma	Min.	Maks.	Wariancja	SD	Mediana
Żuchwa	58	3,87	224,73	0,00	22,40	25,98	5,10	2,07
Szczeka	42	6,88	282,06	0,16	48,10	95,91	9,79	2,40



Rycina 21. Wykres ilustrujący zawartości Ti w błonie śluzowej w zależności od lokalizacji wszczepów (szczeka/żuchwa) ($P \geq 0,05$).

Przyjęta hipoteza, że zwilżanie błony śluzowej przez ślinę w obrębie wyrostka zębodołowego i jej buforowa rola może mieć wpływ na zawartość tytanu w warstwie tkanki pokrywającej wgajający się wszczep, nie znalazła potwierdzenia.

Nie stwierdzono także, iż grubość błony śluzowej (cieńsza w bezzębnym wyrostku w żuchwie, a grubsza w szczęce) może też mieć znaczenie dla kumulacji jonów tytanu.

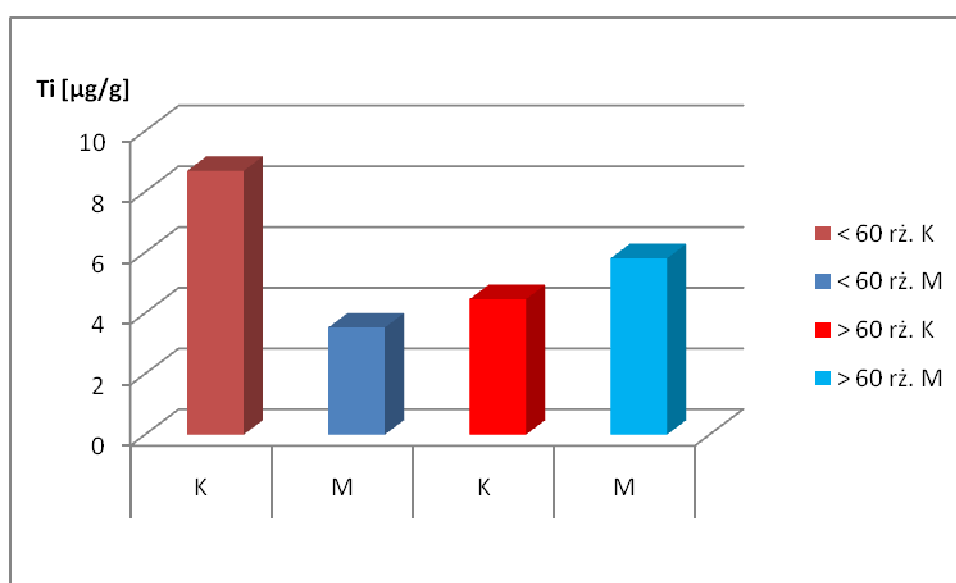
5.2.5. Porównanie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej w zależności od wieku pacjenta

Wycinki błony śluzowej poddane badaniu na zawartość tytanu były pobierane od pacjentów w różnym wieku. Podzielono ich na dwie reprezentatywne grupy: młodszą do 60 roku życia (26 pacjentów) i starszą po 60 roku życia (17 pacjentów). Według WHO osoby powyżej 60 rż. traktowane są jako pacjenci w wieku starym [Koczorowski 2010].

Tabela 15. Zestawienie średnich wartości uzyskanych dla grup pacjentów przed i po 60 roku życia

Pacjenci	Płeć	Liczba	Wartości Ti		
			min	max	średnia
Do 60 rż.	K	16	pld*	122,59	8,69
	M	10	0,14	20,80	3,53
Po 60 rż.	K	9	pld*	48,10	4,46
	M	8	0,27	22,40	5,81

*pld – poniżej limitu detekcji



Rycina 22. Wykres ilustrujący średnią zawartość Ti w błonie śluzowej u reprezentantów dwóch grup wiekowych.

Na podstawie testu Spearmana wynika, iż brak jest zależności pomiędzy otrzymanymi wynikami w odniesieniu do wieku pacjentów. Współczynnik korelacji w tym przypadku wynosił 0,003, a współczynnik istotności był bliski 1 (tab. 23).

Tabela 16. Analiza statystyczna zależności zawartości Ti w błonie śluzowej w zależności od wieku zaopatrzonych w implanty pacjentów

	N ważnych	Współczynnik korelacji	t(N-2)	P
Ti/wiek	100	0,003	0,04	0,97

Nie odnotowano charakterystycznych wyników dla poszczególnych grup wiekowych. Najwyższe średnie zawartości Ti w błonie śluzowej pobranej z nad implantów uzyskano dla grupy kobiet poniżej 60 roku życia oraz mężczyzn po 60 rż. (tab. 22, ryc. 22).

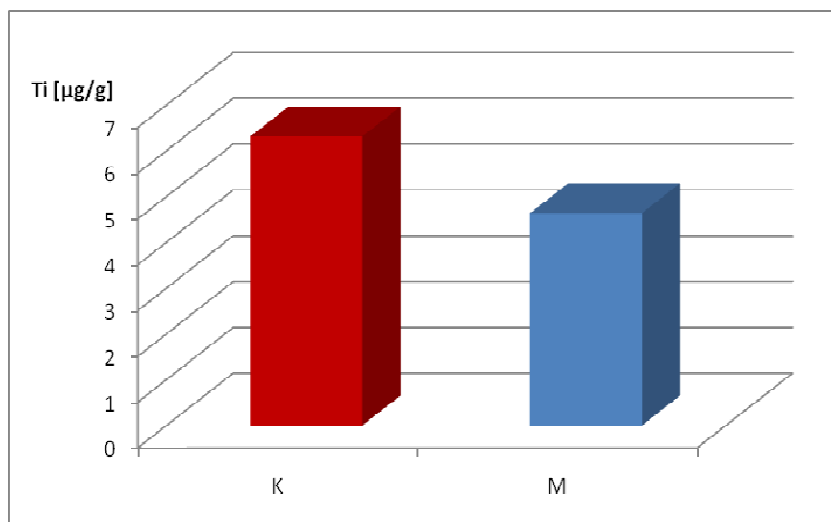
Wynika z tego, że uwalnianie się tytanu z implantów śródkostnych do tkanek nie jest związane z wiekiem pacjenta. Nie jest on więc czynnikiem mającym związek z mniejszą lub większą korozją i migracją jonów tego metalu do otaczających implant tkanek.

5.2.6. Porównanie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej w zależności od płci pacjenta

Kolejnym czynnikiem rozpatrywanym w analizie była zależność otrzymanych wyników od płci pacjentów. Wśród badanych osób przeważały kobiety, którym wszczepiono łącznie 58 implantów.

Tabela 17. Średnia zawartość tytanu w tkankach dla badanych grup kobiet i mężczyzn

Pacjenci	Liczba	Średnia wieku	Liczba implantów w lokalizacji		System implantologiczny (ilość wszczepów)						Średni wynik dla grupy Ti [µg/g]
			szczeka	żuchwa	O	N	I	B	S	ID	
K	25	55,12	27	31	30	13	3	7	4	1	6,31
M	18	57,39	10	32	22	17	2	1	0	0	4,64



Rycina 23. Wykres ilustrujący wartości średnie zawartości Ti w błonie śluzowej w zależności od płci.

Tabela 18. Wartości minimalne i maksymalne zawartości tytanu w tkankach dla badanych grup kobiet i mężczyzn

Pacjenci	Liczba	Wiek		Miejsce implantacji			System implantologiczny						Wynik dla grupy Ti [µg/g]	
		min	max	szczeka	żuchwa	szczeka i żuchwa	O	N	I	B	S	ID	min	max
K	25	31	81	11	10	4	14	4	2	2	3	1	0,00	122,59
M	18	32	80	5	11	2	10	6	1	1	0	0	0,14	22,40

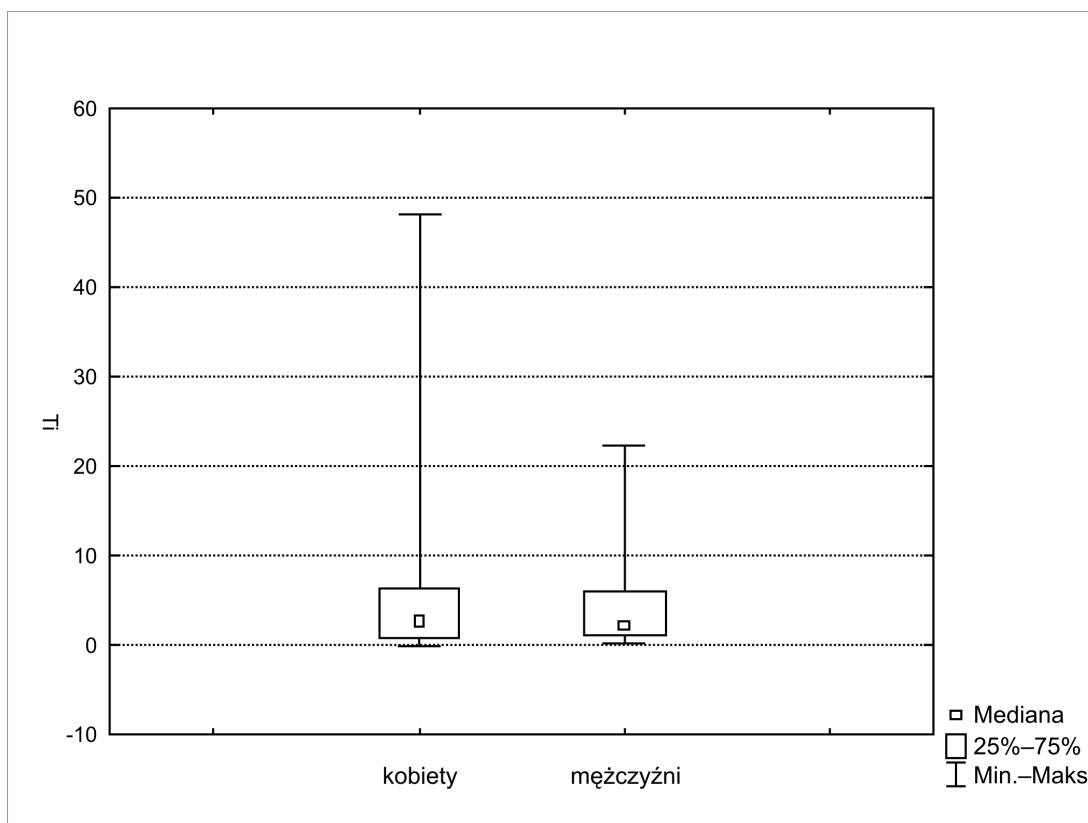
Wyniki uzyskane dla obu grup badanych były zbliżone, jakkolwiek średnia zawartość tytanu była nieco wyższa, lecz niezamiennie, w grupie kobiet. U kobiet jak i mężczyzn implantowano wszczepy różnych systemów zarówno w szczękę jak i żuchwie. Porównywalna była też liczba wszczepów oraz średnia wieku obu populacji (tab. 24, 25, ryc. 23).

Tabela 19. Parametry statystyczne dla badanych grup kobiet i mężczyzn

	N ważnych	Średnia	Suma	Min.	Maks.	Wariancja	SD	Mediana
K	58	6,31	365,98	0,00	122,59	73,07	8,55	2,33
M	42	4,64	194,88	0,14	22,40	35,44	5,95	1,92

Tabela 20. Poziom istotności badanych grup kobiet i mężczyzn

Kobiety	Mężczyźni	Z popraw.	poziom p	P
58	42	0,25	0,80	0,81

Rycina 24. Wykres zależności pomiędzy zawartością Ti a płcią badanych ($P \geq 0,05$).

Na podstawie testu Manna-Whitney'a nie odnotowano istotnej różnicy statystycznej ($P \geq 0,05$) pomiędzy zawartością tytanu w wycinkach błony śluzowej pobranych u kobiet i mężczyzn (tab. 26, 27, ryc. 24). Uzyskane wyniki nie są charakterystyczne dla żadnej grupy, z czego wynika, iż płeć nie jest czynnikiem odgrywającym istotną rolę w uwalnianiu się jonów tytanu z wgajających się implantów do pokrywającej je błony śluzowej.

6. DYSKUSJA

Celem pracy była ocena zawartości tytanu w błonie śluzowej pokrywającej dwuetapowe wszczepy śródkostne wybranych systemów implantologicznych (Osteoplast[®], Neoss[®], Ilerimplant[®], SKY[®], Implant Direct[®], Biomet 3i[®]) oraz próba powiązania uwalniania się tego pierwiastka do tkanek miękkich w zależności od różnych czynników. Zwrócono uwagę na celowość powyższego badania z uwagi na potencjalnie niekorzystny wpływ tytanu na organizm ludzki w określonych sytuacjach klinicznych.

Środowisko, w którym znajdują się wprowadzane tytanowe implanty, jest wysoce specyficzne. W reakcjach organizmu na implant lub na uwalniane z niego jony uczestniczą czynniki biochemiczne, biomechaniczne i bioelektryczne [Marciniak 2001].

W leczeniu często spotkać się można z nieokreślonymi niepowodzeniami lub powikłaniami pooperacyjnymi. Są one bardzo złożone i powinny uwzględniać takie elementy składowe jak:

- jakość wszczepionego materiału,
- jakość biomechaniczna implantu,
- rodzaj techniki operacyjnej,
- metoda usprawniania rekonstruowanych tkanek,
- czynniki osobnicze.

Prace doświadczalne w zakresie biotolerancji tytanu i innych wykorzystywanych w implantologii surowców przeprowadzane były na materiale, który stanowiły tkanki twarde, zazwyczaj pobierane od zwierząt hodowlanych [Olmedo 2008, Pongnarisorn 2007, Frisken 2002, Berglundh 1991, Berglundh 1992].

Mało jest natomiast danych w piśmiennictwie o badaniach dotyczących reakcji tkanek człowieka, a zwłaszcza tkanek miękkich, na implantowane wszczepy tytanowe. Zdecydowana większość prac doświadczalnych w tym kierunku dotyczyła badań ortopedycznych, gdzie po implantacji metalowych, w tym też tytanowych wszczepów (endoprotez),

obserwowano specyficzną odpowiedź organizmu, włącznie z odrzuceniem wszczepu [von Schroeder 1996].

Zawartość tytanu w tkankach miękkich otaczających tytanowy wszczep zmierzili Jörgenson i inni. Wykazali, że tkanki bezpośrednio kontaktujące się z tytanową płytką stosowaną do osteosyntezy kości czaszki u czterech przebadanych pacjentów zawierają zróżnicowaną zawartość tytanu wahającą się od 7,92 do 31,80 $\mu\text{g/g}$ suchej masy. Analizy tej dokonali wykorzystując bardzo precyzyjną metodę jaką jest atomowa spektrofotometria absorpcyjna (AAS). Mikroskop elektronowy uwidoczniał jedynie pojedyncze skupisko tytanu w otaczających tkankach [Jörgenson 1997].

Podobne badania przeprowadzano w odniesieniu do implantów stomatologicznych. Tu zdecydowanie mniejsza liczba dotyczy badań *in vivo*, a autorzy nie mierzyli ilości uwalniania się tytanu do okolicznych tkanek, a głównie skupiali się nad możliwą drogą odpowiedzi komórkowej i immunologicznej organizmu na stomatologiczny wszczep tytanowy [Egusa 2008, Thomas 2006].

Obecnie naukowcy są zgodni coraz częściej, że tytan nie jest całkowicie biozgodny i w określonych warunkach w mniejszym lub większym stopniu ulega zjawiskom korozji. Adya oraz Chaturvedi w obszernych pracach przeglądowych opisują uwalnianie się jonów tytanu z implantów stomatologicznych w wyniku poszczególnych typów korozji jakie mogą zachodzić w żywych tkankach. Wskazują oni, że tytan, tak jak inne metale, może ulegać korozji elektrochemicznej i galwanicznej, często powiązanej z pH środowiska, w którym się znajduje. Zwiększone stężenie fluoru powoduje spadek pH niszcząc ochronną warstwę tlenków na powierzchni implantów [Chaturvedi 2009, Adya 2005]. Badania nad zależnością korozji najczęściej stosowanych biometali od pH środowiska zostały przedstawione też przez Okazaki'ego [Okazaki 2005]. Autorzy sugerują, że wzrost korozji może prowadzić do zaburzeń osteointegracji, a także do zmian w tkankach miękkich. Wyróżniają też zjawisko tzw. mikrobiologicznie zależnej korozji, gdzie uwalnianie jonów związane jest z obecnością specyficznej flory bakteryjnej. To zjawisko nie zostało jednakże dostatecznie udokumentowane

i nie jest znany mechanizm oddziaływania enzymatycznego produktów bytowania bakterii w otoczeniu implantowanych materiałów. Natomiast przypuszcza się, że za rozpad korozyjny może być odpowiedzialny m.in. *Streptococcus mutans* i *Actinomyces viscosus* [Chaturvedi 2009, Adya 2005, Laurent 2001, Wilson 1997]

Wprowadzony do organizmu implant, podlegający korozji, również pobudza lub hamuje czynność białek enzymatycznych, decydując o procesach metabolicznych i immunologicznych. W zależności od jakości i ilości uwalnianych pierwiastków mogą pojawiać się zmiany patomorfologiczne w różnych tkankach lub narządach. Należy mieć świadomość, że zjawisko dyfuzji biopierwiastków do otaczających tkanek może mieć charakter nie tylko miejscowy, lecz również ogólny. Analizowanie tego, jedynie jako procesu biochemicznego ze skutkami elektrofizjologicznymi byłoby zbyt wielkim uproszczeniem. Rozważać należy także korelację pomiędzy zespołem właściwości fizykochemicznych implantu, a środowiskiem biologicznym ze wszystkimi skutkami typowymi dla procesów bioelektronicznych [Ciupik 2005].

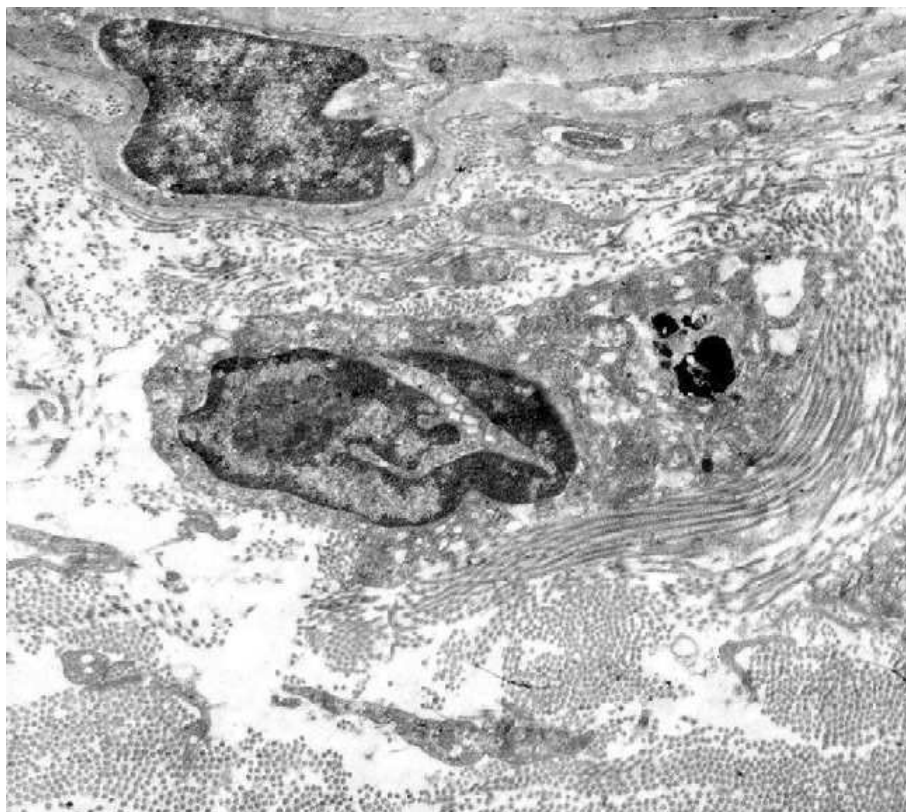
Podstawowymi reakcjami, którym poświęcono w piśmiennictwie dużo uwagi, były reakcje toksyczne. Prace Venable'a i Stuck'a oraz Frank'a i Zitter'a pozwoliły ustalić szereg toksyczności metali. W szeregu tym: kobalt, magnez, żelazo i jego stopy, uznano za toksyczne, cynk, srebro, cer, nikiel, związki aluminium i niektóre gatunki stali określono jako średnio toksyczne, a złoto, tytan, stale V2A i V4A przyporządkowano do grupy metali nietoksycznych. Frank i Zitter wydzielili także w obrazie klinicznym korozji i metalozy trzy charakterystyczne przebiegi:

- cichy: inicjacja korozji rozpoczyna się bezpośrednio po implantacji, a rozwój korozji nie powoduje wyraźnych zmian patomorfologicznych w otaczających tkankach,
- ostry: szybka inicjacja korozji, a dalszy jej rozwój rozpoczyna zmiany w tkankach wykrywalne spektralnie i histologicznie,
- dyskretny: zmiany tkankowe ujawniają się dopiero po usunięciu implantu [Frank 1977, Venable 1937].

W przypadku tytanu nie wykazano szkodliwego, toksycznego oddziaływania na organizm ludzki. Jednakże badania dowodzą, że niekiedy, szczególnie po zastosowaniu dużych protez ortopedycznych, następowała kumulacja tytanu w odległych od miejsca implantacji organach, takich jak śledziona, wątroba, płuca, nerki czy węzły chłonne [Urban 2000, Schliephake 1993]. Podobne wyniki kumulacji tytanu w organizmie uzyskał Frisken. Po wszczepieniu owcom tytanowych wszczepów wykazano podwyższoną zawartość tego pierwiastka (od 2,2 do 9,4 razy większą niż w grupie kontrolnej) w płucach i regionalnych węzłach chłonnych, szczególnie w przypadkach braku integracji [Frisken 2002]. Przeciwną hipotezę przedstawia Bianco. W oparciu o badania przeprowadzone na królikach określił, że jony tytanu uwalniane ze zintegrowanych z kością implantów kumulują się jedynie w okolicznych tkankach i nie wpływają na osteointegrację [Bianco 1996a, Bianco 1996b].

W chwili obecnej uważa się, że jedynym negatywnym skutkiem, zachodzącym jednak nadal bardzo rzadko, związanym z korozją tytanu i uwalnianiem się jonów tego metalu do organizmu, może być reakcja alergiczna.

Gregor Voggenreiter i współpracownicy wykazali, że tkanki otaczające wszczep zawierają tytan w różnej postaci. Jony tytanu uwalniane w wyniku biokorozji mogą występować w postaci wolnej, jednakże częściej wiążą się ze specyficznymi białkami, co ułatwia ich fagocytozę przez makrofagi. Za pomocą mikroskopu transmisyjnego wykonano zdjęcia makrofagów, które wyizolowano z tkanki przylegającej do wszczepu, zawierające cząsteczki tytanu w swoich lizosomach (ryc. 25). Świadczy to zarówno o uwalnianiu się tego pierwiastka z implantu jak i występowaniu reakcji immunologicznej i migracji makrofagów do okolicy okołowszczepowej [Voggenreiter 2003].



Rycina 25. Obraz z elektronowego mikroskopu transmisyjnego przedstawiający drobiny tytanu w fagolizosomach makrofaga (powiększenie 6000x) [Voggenreiter 2003].

Współczesne badania potwierdzają występowanie reakcji immunologicznej jako odpowiedzi na ciało obce jakim okazuje się być implant tytanowy.

Wykazano zarówno w mikroskopii elektronowej jak i immunohistochemicznie zwiększoną liczbę zarówno makrofagów, limfocytów jak i komórek prezentujących antygen w pobliżu wszczepu.

Zwiększona liczba komórek Langerhansa oraz limfocytów T w tkankach może świadczyć o rozpoznawaniu tytanowego wszczepu przez układ immunologiczny gospodarza. Stanowią one składowe układu odpornościowego. Komórki Langerhansa za pomocą cząsteczek MHC klasy II prezentują antygeny limfocytom T i mogą odpowiadać za procesy tolerancji lub też indukować procesy odpornościowe [Miller 2001, Büdinger 2000].

Wzrasta liczba doniesień współczesnego piśmiennictwa związanego z problemem reakcji alergicznej na stosowane obecnie biomateriały metalowe, w tym też na tytan. O istnieniu tego procesu świadczy występowanie limfocytów T, w populacji CD4 i CD 8 w okolicy

okołowszczepowej oraz specyficznych limfocytów w krwi obwodowej wykrywanych przez test transformacji blastycznej limfocytów (LTT) [Langford 2002, Chan 2009]. Swoista odpowiedź komórkowa na metale zależy od komórek CD4 i CD25 oraz ich oddziaływania na drodze interakcji komórkowej. Występowanie objawów alergicznych związane jest z brakiem odpowiedzi komórek CD4 i CD8 na subpopulację limfocytów T regulatorowych CD4, CD25 [Cavani 2003, Cavani 2008].

Część autorów sugeruje występowanie reakcji alergicznych w powiązaniu z możliwością korozji tytanowych elementów, takich jak: stymulatory serca, endoprotezy, płytki do zespożeń chirurgicznych, czy w końcu implanty stomatologiczne. Prace te dotyczą zarówno implantów stosowanych w stomatologii jak i ortopedii czy chirurgii [Thomas 2006]. Holgers i inni opisują przypadek mężczyzny, u którego wystąpiła silna reakcja skórna po implantacji tytanowego aparatu słuchowego. W badaniu morfologicznym i immunohistochemicznym w tkankach miękkich wokół tytanowego elementu wykryto silną reakcję zapalną w postaci nagromadzenia limfocytów, makrofagów i komórek prezentujących antygen [Holgers 1994].

Jedne z pierwszych doniesień na ten temat dotyczących stomatologii ukazały się już w latach 90-tych. Mitchell opisuje przypadek przerostu dziąsła nad wszczepionym implantem stomatologicznym, sugerując etiologię alergiczną [Mitchell 1990]. Ta nadal rzadka odpowiedź organizmu na najbardziej biogodny ze stosowanych obecnie biomateriałów metalicznych doczekała się nawet swoistej nazwy. Von Schroeder i inni wprowadzili pojęcie „titanemia” opisując odpowiedź immunologiczną na tytanowe elementy stosowane przy artroplastyce stawu kolanowego [von Schroeder 1996].

Hallab i inni wyznaczają podstawowe tezy dotyczące nadwrażliwości na metalowe implanty stosowane w ortopedii:

- Wszystkie metale w kontakcie z układem biologicznym ulegają korozji, która prowadzi do powstania jonów tych metali, mogących aktywować układ immunologiczny poprzez formowanie kompleksów z endogennymi białkami.

- Produkty rozpadu implantów mogą być powiązane z występowaniem zapalenia skóry, pokrzywką i zapaleniem naczyń. Jeśli skórne wykładniki alergii wystąpią po wszczepieniu metalowego implantu wymagane jest potwierdzenie alergii. Nie ma obecnie przyjętych uogólnionych standardów potwierdzających reakcje alergiczne na implanty metalowe.
- Występowanie alergii skórnej u pacjentów, którym wszczepiono implanty metalowe jest zdecydowanie większe niż u reszty populacji, zwłaszcza w przypadku niepowodzenia implantologicznego.
- Wyjaśnienie zjawisk dotyczących nadwrażliwości i odpowiedzi humoralnej na metalowe wszczepy pozwoli zminimalizować ryzyko powikłań.
- W chwili obecnej nie jest znany mechanizm powiązania reakcji nadwrażliwości na metal z odrzuceniem wszczepu [Hallab 2001].

W celu zobrazowania korozji biometali wielu badaczy wykorzystuje elektronowy mikroskop transmisyjny (ang: Transmission Electron Microscope), który pozwala na wykonanie zdjęć komórek zawierających cząstki metali, w tym również tytanu [Wilson 1997, Bordji 1996, Larsson 1996].

Aby ocenić zawartość jonów tytanu w otaczających wszczep tkankach wykorzystuje się też różne metody analityczne.

Optyczna spektrometria emisyjna jest jedną z najstarszych stosowanych technik analitycznych zarówno w laboratoriach badawczych jak i przemysłowych. Swoją pozycję zawdzięcza dwóm zasadniczym cechom, a mianowicie możliwości analizowania wielu składników równocześnie przy zachowaniu dużej szybkości oznaczeń. Z biegiem czasu dzięki doskonaleniu się aparatury spektralnej uzyskiwano coraz to większe możliwości analityczne, które mogły wyjść naprzeciw powszechnym oczekiwaniom zarówno w odniesieniu do precyzji jak i dokładności oznaczeń. Jednym z ważniejszych elementów układu pomiarowego jest źródło wzbudzenia. Stosuje się różnorodne źródła wzbudzenia takie jak plazma prądu stałego (DCP) plazma mikrofalowa (MIP) oraz plazma indukcyjnie sprzężona (ICP) [Bulska 1999].

W podjętych badaniach do ilościowego oznaczania zawartości jonów tytanu w otaczających wszczep tkankach zastosowano spektrometrię masową z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-MS). Została ona wybrana jako metoda badawcza dlatego, że jest ona w chwili obecnej prawdopodobnie najbardziej dokładną metodą określania ilościowego pierwiastków śladowych. Wysoka czułość w zakresie 1–100 pg/ml i możliwość wyizolowania pierwiastków z tkanek (po uprzedniej mineralizacji) stawia ją jako metodę z wyboru przy tego typu analizach. Metody spektrometrii masowej były wykorzystywane w wielu przeprowadzanych badaniach zawartości tytanu i innych metali, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. ICP-MS jako najdokładniejszy rodzaj tej analizy znalazł się też w metodyce prac badawczych związanych z uwalnianiem tytanu w wyniku korozji do tkanek [Yamazoe 2010, Faccioni 2003].

Wśród innych metod analitycznych pomocnych w wykrywaniu metali w organizmie należy wymienić atomową spektrometrię absorpcyjną (AAS), spektroskopię rentgenowską z rozpraszaniem energii (EDS), oraz rentgenowską spektroskopię fotoelektronową (XPS).

Atomowa spektrometria absorpcyjna (ASA lub AAS – Atomic Absorption Spectrometry) – jest techniką analityczną umożliwiającą oznaczenie pierwiastków chemicznych w próbkach ciekłych, stałych i gazowych. Wykorzystywana jest głównie do detekcji ilościowej metali. Zasada pomiaru opiera się na zjawisku absorpcji promieniowania o specyficznej długości fali przez wolne atomy metali. Charakteryzuje ją wysoka selektywność, niska granica detekcji rzędu tysięcznych części (ppb) oraz możliwość analizowania do 70 pierwiastków [Bulska 1999].

Spektroskopia rentgenowska z rozpraszaniem energii (EDS lub EDX – Energy-dispersive X-ray spectroscopy) jest techniką analityczną używaną do oznaczeń ilościowych jak i jakościowych. Wykorzystuje ona zjawisko promieniowania rentgenowskiego, gdzie tzw. promieniowanie charakterystyczne, cechujące się ściśle określoną długością fali i wartością energii zależnymi tylko od jakości pierwiastków zawartych w próbce, pozwala na bardzo dokładne określenie składu chemicznego w mikroobszarze struktury badanego materiału. Udowodniono skuteczność tej metody

w pracach dotyczących uwalniania się tytanu do tkanek [Venclíkova 2007, Jonas 2001]. Olmedo za jej pomocą oznacza Ti w tkankach miękkich pokrywających powierzchnie nieprzyjętych implantów [Olmedo 2003]. Stwierdzono obecność tytanu w makrofagach na powierzchni wszczepów i stworzono hipotezę o zależności niepowodzenia implantacji i występowania odpowiedzi immunologicznej od korozji implantu. Pobudzone w wyniku fagocytozy tytanu w lizosomach makrofagi uwalniają mediatory zapalne. Aktywują one osteoklasty, co prowadzi do resorpcji kości.

Podobną metodą wykorzystującą promieniowanie rentgenowskie w analizie spektrometrycznej jest rentgenowska spektroskopia fotoelektronowa (X-ray photoelectron spectroscopy – XPS). Może być ona używana do określenia ilościowego i jakościowego składu chemicznego na powierzchni od 1 do 10 nm. Za pomocą XPS można badać w sposób niedestrukcyjny, zarówno powierzchnie ciał stałych, jak i zaadsorbowane na nich substancje.

Powyższe metody nie znalazły jednak zastosowania w niniejszej pracy. Pozwalają one na analizę składu pierwiastkowego na niewielkim obszarze ściśle przylegającym lub będącym powierzchnią badanej próbki. Pomimo tego, że błona śluzowa pokrywająca implant była z nim w bezpośrednim kontakcie, jest to za duża odległość, mogąca nie spełnić warunków rzetelnej analizy.

W podjętej pracy przeprowadzono ocenę zawartości tytanu w błonie śluzowej pokrywającej dwuetapowe wszczepy śródkostne wybranych systemów implantologicznych. Materiał badawczy, wycinki błony śluzowej pobierane podczas odsłaniania implantów, jest zarówno odpowiedni pod względem metodyki określenia stopnia uwalniania się substancji (w tym wypadku tytanu) z implantów jak i możliwości prostego i łatwo dostępnego badania. Nie obciążając dodatkowo pacjenta (zabieg wykonywany jest standardowo w leczeniu implantoprotetycznym przy klasycznym zamkniętym wgajaniu się wszczepów) uzyskujemy doskonały i porównywalny materiał. Dodatkową zaletą tej metody może być możliwość stosowania jej przez różne ośrodki na dużej liczbie pacjentów i porównanie wyników dotyczących odmiennych populacji i sytuacji klinicznych (różne systemy implantologiczne,

czas obecności implantów w organizmie, specyficzna anatomia, zastosowane dodatkowe zabiegi i rozwiązania współczesnej implantologii). Ponieważ badania dotyczące analizy ilościowej tytanu w błonie śluzowej pokrywającej wgajające się implanty nie były dotychczas publikowane, stąd możliwości polemiki z cytowanymi autorami są w tym zakresie bardzo ograniczone.

W prezentowanej pracy wykazano znacznie zwiększoną zawartość tytanu w tkankach miękkich pokrywających stomatologiczny implant śródkostny. Porównanie wyników całej grupy badanej do grupy kontrolnej, gdzie błona śluzowa pobrana z wyrostka zębodołowego nie miała kontaktu z jakimkolwiek uzupełnieniem metalowym wykazały znamienne statystycznie wzrost w tej pierwszej sięgający często kilkudziesięciu procent. Po wstępnych analizach ustalono, że wyniki zawartości Ti w błonie śluzowej pobieranej zarówno przed implantacją jak i od osób poddanych innym zabiegom chirurgicznym są zbliżone. Uznano, że mogą stanowić jedną homogenną grupę kontrolną. Średnia zawartość tytanu w tej grupie jest bliska zeru, wynosi 0,81 $\mu\text{g/g}$ i odbiega znacząco od wyników osiąganych dla pozostałych próbek badanych. Zarówno tkanka pobierana przed implantacją jak i w przypadkach chirurgicznych niezwiązanych z implantologią była wycinana z wyrostka zębodołowego jamy ustnej. Pozwoliło to osiągnąć dostateczną liczbę próbek potrzebną do analizy statystycznej, trudną przy badaniach na materiale ludzkim.

W badaniach uzyskano odmienne wyniki dla poszczególnych próbek. Zasadniczą różnicę odnotowano pomiędzy grupą kontrolną a badaną, a także uzyskano odmienne wyniki charakterystyczne dla różnych systemów implantologicznych. Wskazuje to na zróżnicowane uwalnianie się jonów tytanu w zależności od zastosowanego systemu implantologicznego.

Najwyższe wartości odnotowano w przypadku systemu Osteoplant[®] oraz Ilerimplant[®]. Najniższe uzyskano dla wszczepów systemu Implant Direct[®]. Analizy te potwierdzają tezę, że uwalnianie się jonów tytanu do okolicznych tkanek zależy od kształtu i rodzaju implantu, jego powierzchni aktywnej, czyli od zastosowania danego systemu implantologicznego. Badania nad uwalnianiem się jonów tytanu z różnych implantów posiadających odmienne

powierzchnie do tkanek okołowszczepowych były przeprowadzane zazwyczaj na tkankach twardych zwierząt oraz *in vitro* [Bordji 1996, Larsson 1996]. Franchi i inni wszczepili implanty o czterech różnych powierzchniach czynnych w kości długie owcy. Odnotowali odmienne wyniki zawartości Ti na powierzchni implantów i w tkance pokrywającej wszczep. Wykazali, iż uwalnianie się jonów i reakcja okołowszczepowa zależna jest od użytego systemu implantologicznego [Franchi 2004].

Przedstawione wyniki wskazują, że jedynie ten aspekt jest istotny statystycznie. Wyniki dla grupy Osteoplast[®] były znacznie podwyższone w stosunku do innych użytych w tym zestawieniu jak i w stosunku do grupy kontrolnej. Nie znaleziono wyraźnych zależności pomiędzy uwalnianiem się jonów tytanu, a takimi parametrami jak wiek, płeć pacjentów czy lokalizacja wszczepu. Jednakże należy mieć świadomość ograniczonych możliwości, które nie pozwoliły na przeprowadzenie badań na szerszą skalę. Być może, analiza dużej populacji wykaże statystyczne różnice nie potwierdzone obecnie. Zauważono wyższe średnie zawartości Ti w błonie śluzowej pobranej z nad implantów grupy kobiet poniżej 60 roku życia oraz mężczyzn po 60 rż.

W analizie wewnątrzsobniczej, u pacjentów, którym wprowadzono do kości większą liczbę implantów, zaobserwowano niecharakterystyczne wyniki, odmienne zarówno wewnątrz grupy jak i pomiędzy nimi. Również w tym wypadku przebadanie szerszej populacji może wykazać nie potwierdzone obecnie zależności.

7. WNIOSKI

Przeprowadzone w ramach tej rozprawy badania błony śluzowej pokrywającej śródkostne wszczepy tytanowe pozwoliły na sformułowanie poniższych wniosków:

1. Zauważa się zróżnicowaną zawartość tytanu w błonie śluzowej bezpośrednio pokrywającej tytanowe implanty stomatologiczne po okresie osteointegracji (4–6 miesięcy).
2. Uwalnianie się jonów tytanu do okolicznych tkanek w jamie ustnej wydaje się być uzależnione od rodzaju zastosowanego systemu implantologicznego.
3. Zawartość jonów tytanu w błonie śluzowej pokrywającej śródkostne wszczepy nie jest uzależniona od płci, wieku i lokalizacji implantacji.
4. Wewnątrzsobnicza analiza ilościowa tytanu w otaczających implant tkankach wskazuje na jego zróżnicowaną zawartość, co sugerować może zależność uwalniania się jonów tytanu od wielu innych miejscowych czynników.

8. STRESZCZENIE

Tytan, ze względu na swoje właściwości uważany jest powszechnie za najlepszy materiał implantologiczny. Wysoce biozgodny, odporny na korozję i obojętny alergicznie, wykorzystywany jest od wielu lat w medycynie, w tym także w implantologii stomatologicznej. Wszczyepy tytanowe mogą jednak wywoływać w organizmie nie tylko miejscowe reakcje bio- i elektrochemiczne, ale również oddziaływać na cały organizm. Doniesienia z piśmiennictwa światowego o przypadkach alergii na ten pierwiastek, oraz hipotezy o korelacji niepowodzenia leczenia implantologicznego z ilością i jakością uwalnianych w wyniku korozji związków poddają w wątpliwość pełną biozgodność tytanu. Interesujące jest potwierdzenie czy istnieją procesy mikrokorozyjne w jamie ustnej i przenikanie jonów tytanowych do otaczających wszczyepy tkanek, oraz określenie wpływu tego zjawiska na organizm ludzki zarówno miejscowego jak i ogólnego.

Celem pracy była ocena zawartości tytanu w błonie śluzowej pokrywającej dwuetapowe stomatologiczne wszczyepy śródkostne w okresie ich wgajania (4–6 miesięcy).

Materiał badawczy stanowiły wycinki błony śluzowej o średnicy około 4 mm pobierane przy odsłanianiu dwuetapowych implantów systemów Osteoplant[®], Neoss[®], Ilerimplant[®], SKY[®], Implant Direct[®], Biomet 3i[®] po 4–6-miesięcznym okresie wgajania.

Poddane analizie próbki oceniano pod względem uwalniania się tytanu z różnych systemów implantologicznych, zależności od lokalizacji implantów oraz od płci i wieku pacjentów. Przeprowadzono też analizę osobniczą i międzyosobniczą. Analizę ilościową próbek przeprowadzono w Zakładzie Chemii Analitycznej UAM Poznań na spektrometrze emisyjnym z indukcyjnie sprzężoną plazmą ICP-MS firmy VARIAN[®].

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano zróżnicowaną zawartość tytanu w błonie śluzowej pokrywającej wgajające się wszczyepy. Ilości stwierdzonego pierwiastka wahały się w granicach od 0,00 µg/g do 122,59 µg/g.

Zaobserwowano korelację pomiędzy ilością jonów Ti w tkankach miękkich otaczających śródkostny wszczep, a zastosowanym systemem implantologicznym. Najwyższe wyniki odnotowano w przypadku próbek z nad implantów systemu Osteoplast[®]. Nie odnotowano natomiast zależności uwalniania się jonów tytanu od takich potencjalnych czynników jak wiek pacjentów, płeć, czy lokalizacja wszczepów. Zbadana zależność wewnątrzsobnicza nie wykazała ujednoczonych wyników dla pacjentów, którym wszczepiono większą liczbę implantów.

Śladowe ilości tytanu w błonie śluzowej pokrywającej wszczepy w okresie osteointegracji świadczą o miejscowych biologiczno-chemicznych procesach zachodzących w tkankach otaczających implanty.

9. ABSTRACT

Due to its properties, titanium is commonly considered the best implantological material. Being highly biocompatible, resistant to corrosion and unable to cause allergy, it has been used in medicine, including dental implantology, for many years. Titanium implants may, however, not only evoke local bio- and electrochemical reactions but also affect the whole organism. Worldwide reports of cases of allergy to this element and hypotheses about the correlation between failures in implantological treatment and the quantity and quality of the compounds released as a result of corrosion have questioned total biocompatibility of titanium. It seems interesting to find out whether or not micro-corrosion processes and permeation of titanium ions into tissues surrounding the implant take place as well as to determine the local and general influence of this phenomenon on the human organism.

The aim of this study was to evaluate the content of titanium in the mucosa covering two-stage intraosseous dental implants during their healing period (4-6 months).

The research material consisted of segments of mucosa of 4 mm in diameter taken during the exposure of the two-stage implants of the following systems: Osteoplast[®], Neoss[®], Ilerimplant[®], SKY[®], Implant Direct[®], Biomet 3i[®] after 4–6 months of the healing period. The analyzed samples were assessed in terms of titanium release from different implantological systems, dependence on implant location and the sex and age of patients. Individual and inter-individual analyses were also conducted.

The quantitative analysis of the samples was conducted in the Department of Analytical Chemistry of Adam Mickiewicz University in Poznan on an inductively coupled plasma emission spectrometer ICP-MS produced by VARIAN[®].

A diverse content of titanium in the mucosa covering the healing implants was demonstrated as a result of the study. The quantity of the element ranged from 0.00 µg/g to 122.59 µg/g. A correlation between the number of Ti ions in the soft tissues surrounding the intraosseous implant

and the implantological system in use was observed. The highest results were noted for the samples from above the implants of the Osteopant[®] system. However, no dependence of the titanium ions release on such potential factors as the age and sex of the patients or implant location was observed. The investigated intra-individual correlation did not show uniform results for the patients who had had a larger number of implants inserted.

Trace quantities of titanium in the mucosa covering the implants during their osteointegration period, prove local biological and chemical processes taking place in the tissues surrounding the implants.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Ada Council On Scientific Affairs: Titanium applications in dentistry. J. Am. Dent. Assoc. 2003, 134, 347-349
2. **Adya N., Alam M., Ravindranath T., Mubeen A., Saluja B.:** Corrosion in titanium dental implants: literature review. J. Ind. Prosthodont. Soc. 2005, 5, 3, 126-131
3. **Aparicio C., Gila F.J., Fonseca C., Barbosa M., Planell J.A.:** Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. Biomaterials. 2003, 24 (2), 263–273
4. **Bedi R.S., Beving D.E., Zanello L.P., Yan Y.:** Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants. Acta Biomaterialia. 2009, 5 (8), 3265-3271
5. **Berg E.:** Dentists' opinions on aspects of cast titanium restorations. J. Dent. 1997, 25 (2), 113-117
6. **Berglundh T., Lindhe J., Ericsson I., Marinello C.P., Liljenberg B., Thomsen P.:** The soft tissue barrier at implants and teeth. Clin. Oral Implants Res. 1991; 2 (2): 81-90
7. **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
8. **Bianco P.D., Ducheyne P., Cuckler J.M.:** Local accumulation of titanium released from a titanium implant in the absence of wear. J. Biomed. Mater. Res. 1996; 31 (2): 227-34
9. **Bianco P.D., Ducheyne P., Cuckler J.M.:** Titanium serum and urine levels in rabbits with a titanium implant in the absence of wear. Biomaterials. 1996; 17 (20): 1937-42
10. **Bordji K., Jouzeau J.Y., Mainard D., Payan E., Netter P., Rie K.T., Stucky T., Hage-Alis M.:** Cytocompatibility of Ti-6Al4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. Biomaterials. 1996, 17 (9), 929–940
11. **Brandt H.H.:** „Wprowadzenie do implantologii”. Materiały implantacyjne. Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner. Wrocław 1998, 27-33
12. **Bränemark P. I., Zarb G., Albrektson:** Tissue-Integrated Prosthesis Osseointegration in Clinical Dentistry. Quintessence, Chicago, London, Berlin, 1985
13. **Brune D.:** Metal release from dental biomaterials. Biomaterials 1986, 7 (3): 163–175
14. **Bulska E., Pyrżyńska K. (praca zbiorowa):** „Zastosowanie metod spektrometrii atomowej w przemyśle i ochronie środowiska”. Sekcja wydawnicza IChF PAN. Warszawa 1999

15. **Büdinge L., Hertl M.:** Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy*. 2000; 55 (2): 108-115
16. **Cavani A., Nasorri F., Ottaviani Ch., Sebastiani S., De Pità O., Girolomoni G.:** Human CD25+ Regulatory T Cells Maintain Immune Tolerance to Nickel in Healthy, Nonallergic Individuals. *J. Immunology*. 2003, 171 (11), 5760-5768
17. **Cavani A.:** Immune regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis and contact sensitization. *Chem Immunol Allergy*, 2008, 94, 93-100
18. **Chan E.P.H., Mhawi A., Clode P., Saunders M., Filgueira L.:** Effects of titanium (IV) ions on human monocyte-derived dendritic cells. *Metallomics*. 2009, 1 (2), 166–174
19. **Chaturvedi T.P.:** An overview of the corrosion aspect of dental (titanium and its alloys). *Indian J. Dent. Res.* 2009, 20 (1), 91-98
20. **Chen G., Wen X., Zhang N.:** Corrosion resistance and ion dissolution of titanium with different surface microroughness. *BioMedical Mater. Eng.* 1998, 8 (2), 61–74
21. **Ciupik L.F., Zarzycki D.:** „Spondyloimplantologia zaawansowanego leczenia kręgosłupa systemem DERO”. Polska Grupa DERO, Stowarzyszenie Studiów i Leczenia Kręgosłupa. Zielona Góra 2005, 37-46
22. **Cortada M., Giner L.L., Costa S., Gil F.J., Rodriáquez D., Planell J.A.:** Galvanic corrosion behavior of titanium implants coupled to dental alloys. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2000, 11 (5), 287-293
23. **Czarnobilska E., Obtulowicz K., Wsołek K., Piętowska J., Śpiewak R.:** Mechanizmy alergii na nikiel. *Przegl. Lek.* 2007, 64, 502-505
24. **Czarnobilska E., Obtulowicz K., Wsołek K., Piętowska J., Śpiewak R.:** Mechanizmy alergii na nikiel. *Przegl. Lek.* 2007, 64, 7–8
25. **Dutkiewicz J., Maziarz W., Kuśnierz J., Jaworska L.:** Nanokrystaliczny tytan i jego stopy – wytwarzanie i własności. *Inżyn. Stomat.- Biomateriały*. 2007, 4, 1, 2-6
26. **Eley B.M.:** The fate of amalgam implanted in soft tissues – an experimental study. *J. Dent. Res.* 1979; 58 (3): 1146-1152
27. **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 (5), 344-347
28. **Faccioni F., Franceschetti P., Cerpelloni M., Fracasso M.E.:** In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 2003, 124 (6), 687-693
29. **Fathi M.H., Mortazavi V.:** Tantalum, Niobium and Titanium Coatings for Biocompatibility. Improvement of Dental Implants. *Dent. Res. J.* 2007, 4 (2), 74-82
30. **Ferreira S.B., Figueiredo C.M., Almeida A.L., Assis G.F., Dionísio T.J., Santos C.F.:** Clinical, Histological, and Microbiological Findings in Peri-Implant Disease: A Pilot Study. *Implant Dent.* 2009, 18 (4), 334-344

31. **Franchi M., Bacchelli B., Martini D., Pasquale V.D., Orsini E., Ottani V., Fini M., Giavaresi G., Giardino R., Ruggeri A.:** Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants. *Biomaterials*, 2004, 25 (12), 2239-2246
32. **Frank E., Zitter H.:** *Metallische Implantate in der Knochenchirurgie*. Springer Verlag, Wien - New York 1977
33. **Friedmann P.C.:** Contact sensitization and allergic contact dermatitis: immunobiological mechanism. *Toxicol. Lett.* 2006, 162, 49-54
34. **Friskén KW, Dandie GW, Lugowski S, Jordan G.:** A study of titanium release into body organs following the insertion of single threaded screw implants into the mandibles of sheep. *Aust. Dent. J.* 2002; 47 (3): 214-217
35. **Gil F.J., Planell J.A., Padros A., Aparicio C.:** The effect of shot blasting and heat treatment on the fatigue behavior of titanium for dental implant applications. *Dent. Mater.* 2007, 23 (4), 486–491
36. **Grosogoeat 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. *Biomed. Mater. Eng.* 2004, 14 (3), 323–331
37. **Hallab N., Merritt K., Jacobs J.J.:** Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2001, 83A (3), 428–436
38. **Hench L.L.:** Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*. 1998, 19 (16), 1419-1423
39. **Holgers K.M., Thomsen P., Tjellström A.:** Persistent irritation of the soft tissue around an osseointegrated titanium implant. Case report. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 1994, 28 (3), 225-230
40. **Ionescu D., Popescu B., Demetrescu I.:** The Kinetic Parameters In Electrochemical Behaviour Of Titanium In Artificial Saliva. <http://www.chimie.unibuc.ro/biblioteca/anale/2002a/77-83.pdf>
41. **Jańczuk Z., Banach J.:** Local argyrosis of oral mucosa or amalgam tattoo. A problem in diagnosis and treatment. *Adv. Med. Sci.* 2006, 51 Suppl 1, 62-65
42. **Johanson B.I., Bergman B.:** Corrosion of titanium and amalgam couples: Effect of fluoride, area size, surface preparation and fabrication procedures. *Dent. Mater.* 1995, 11 (1), 41-46
43. **Jonas L., Fulda G., Radeck C., Henkel K.O., Holzhüter G., Mathieu H.J.:** Biodegradation of titanium implants after long-time insertion used for the treatment of fractured upper and lower jaws through osteosynthesis: element analysis by electron microscopy and EDX or EELS. *Ultrastruct. Pathol.* 2001; 25 (5), 375-83
44. **Jorgenson S., Mayer M.H., Ellenbogen R.G, Centeno J.A., Johnson F.B., Mullick F.G., Manson P.N.:** Detection of Titanium in Human Tissues after Craniofacial Surgery. *Plasti. Reconstr. Surg.* 1997, 99 (4), 976-979
45. **Kinani L., Najih R., Chtaini A.:** Corrosion Inhibition of Titanium in Artificial Saliva Containing Fluoride. *Leonardo J. Sci.* 2008, 12, 243-250

46. **Kmieć Z.:** Histologia i cytofizjologia zęba i jamy ustnej. Działo. Elsevier Urban&Partner. Wrocław 2006, 82–92
47. **Koczorowski R., Hemerling M., Szponar E., Wiśniewska–Spychała B.:** A study of bacterial flora of intrabony pockets after the loss of implants caused by periimplantitis. Polish J. Environ. Stud. 2007, 16 (6C), 124–129
48. **Koczorowski R.W.:** “Geroprotetyka. Rekonstrukcje narządu żucia u osób starszych”. Med Tour Press International. Otwock 2010
49. **Koller G., Cook R.J., Thompson I.D., Watson T.F., Di Silvio L.:** Surface modification of titanium implants using bioactive glasses with air abrasion technologies. J. Mater. Sci: Mater. Med. 2007, 18 (12), 2291–2296
50. **Krupa D., Baszkiewicz J., Kozubowski J.A., Lewandowska-Szumieł M., Barcz A., Sobczak J.W., Biliński A., Rajchel A.:** Effect of calcium and phosphorus ion implantation on the corrosion resistance and biocompatibility of titanium. Biomed. Mater. Eng. 2004, 14 (4), 525–536
51. **Kuphasuk C., Oshida Y., Andres C.J., Hovijitra S.T., Barco M.T., Brown D.T.:** Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys. J Prosthet. Dent. 2001, 85 (2), 195-202
52. **Lalor P.A., Gray A.B., Wright S., Railton G.T., Freeman M.A., Revell P.A.:** Contact sensitivity to titanium in a hip prosthesis? Contact Dermatitis. 1990, 23 (3), 193-194
53. **Langford R.J., Frame J.W.:** Surface analysis of titanium maxillofacial plates and screws retrieved from patients. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2002; 31 (5): 511-518
54. **Larsson C., Thomsen P., Aronsson B.O., Rodahl M., Lausmaa J., Kasemo B., Ericson L.E.:** Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. Biomaterials. 1996. 17 (6), 605–618
55. **Laurent F., Grosogeat B., Reclaru L., Dalard F., Lissac M.:** Comparison of corrosion behaviour in presence of oral bacteria. Biomaterials. 2001, 22 (16), 2273-2282
56. **Li J., Liao H., Fartash B., Hermansson L., Johnsson T.:** Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth. Biomaterials. 1997, 18 (9), 691-696
57. **Lijian Z., Ti-Sheng C., Wei W., Lei C.:** Study of commercially pure titanium implants bone integration mechanism. Eur. J. Plast. Surg. 2000, 23, 301–304
58. **Makuch K., Koczorowski R.:** Biokompatybilność tytanu oraz jego stopów wykorzystywanych w stomatologii. Dent. Med. Probl. 2010, 7 (1), 81–88
59. **Marciniak J., Paszenda Z.:** „Biotolerancja biomateriałów metalicznych. Spondyloimplantologia zaawansowanego leczenia kręgosłupa systemem DERO”. Polska Grupa DERO, Stowarzyszenie Studiów i Leczenia Kręgosłupa. Zielona Góra 2005
60. **Marciniak J.:** Problemy stosowania biomateriałów metalicznych w chirurgii urazowo-ortopedycznej. Kwart. Ortop. 2001, 1, 8-15

61. **Martin E., Manceur A., Polizu S., Savadogo O., Wuc M.H., Yahia L.:** Corrosion behaviour of a beta-titanium alloy. *Biomed. Mater. Eng.* 2006, 16 (3), 171–182
62. **McCracken M.:** Dental Implant Materials: Commercially Pure Titanium and Titanium Alloys. *J. Prosthodont.* 1999, 8 (1), 40-43
63. **Meleti M, Vescovi P, Mooi WJ, van der Waal I.** Pigmented lesions of the oral mucosa and perioral tissues: a flow-chart for the diagnosis and some recommendations for the management. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod.* 2008, 105 (5), 606-616
64. **Miller A., Jędrzejczak W.W.:** Komórki dendrytyczne w immunoterapii. *Postępy biologii komórki.* 2001, 28, 51-68
65. **Mitchell D.L., Synnott S.A., VanDercreek J.A.:** Tissue reaction involving an intraoral skin graft and CP titanium abutments: a clinical report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1990, 5 (1), 79-84
66. **Müller K., Valentine-Thon E.:** Hypersensitivity to titanium: Clinical and laboratory evidence. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006, 27 (Suppl 1), 31–35
67. **Muris J., Feilzer A.J.:** Micro analysis of metals in dental restorations as part of a diagnostic approach in metal allergies. *Neuroendocrinol. Lett.* 2006, 27 (Suppl 1), 49–52
68. **Oda Y., Okabe T.:** Effect of corrosion on the strength of soldered titanium and Ti–6Al–4V alloy. *Dent. Mater.* 1996, 12 (3), 167–172
69. **Okazaki Y., Gotoh E.:** Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials.* 2005, 26, (1), 11-21
70. **Olmedo D., Fernández M.M., Guglielmotti M.B., Cabrini R.L.:** Macrophages Related to Dental Implant Failure. *Implant Dent.* 2003, 12 (1), 75–80
71. **Olmedo D.G., Duffo G., Cabrini R.L., Guglielmotti M.B.:** Local effect of titanium implant corrosion: an experimental study in rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2008, 37 (11), 1032–1038
72. **Olmedo D.G., Michanié E., Olvi L., Santini-Araujo E., Cabrini R.L.:** Malignant Fibrous Histiocytoma Associated With Coxofemoral arthrodesis. *Tumori.* 2007, 93 (5), 504-507
73. **Orlicki R., Kłaptocz B.:** Tytan i jego stopy - właściwości, zastosowanie w stomatologii oraz sposoby przetwarzania. *Inżyn. Stomat.- Biomateriały.* 2003, I, 1, 3-8
74. **Paschoal A.L., Vanâncio E.C., de Campos Franceschini Canale L., da Silva O.L., Huerta-Vilca D., de Jesus Motheo A.:** Metallic Biomaterials TiN-Coated: Corrosion Analysis and Biocompatibility. *Artif. Organs.* 2003, 27 (5), 461-464
75. **Pohler O.E.M.:** Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury Int. J. Care Injured.* 2000, 31, 7-13

76. **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 Implants Res.* 2007, 18 (1), 114–125
77. **Pryliński M., Limanowska-Shaw H.:** Właściwości tytanu i problem nadwrażliwości na ten metal. *Implantoprotetyka.* 2007, VII, 4, 50-52
78. **Roberts H.W., Berzins D.W., Moore B.K., Charlton D.G.:** Metal-Ceramic Alloys in Dentistry: A Review, *J. Prosthodont.* 2009, 18 (2), 188-194
79. **Rusinek B., Stobiecka A., Obtulowicz K.:** Alergia na tytan i implanty. *Alergologia. Immunologia.* 2008, 5 (1), 5–7
80. **Schliephake H., Reiss G., Urban R., Neukam F.W., Guckel S.:** Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible: an experimental study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1993, 8 (5), 502–511
81. **Shan-Hui H., Bai-Shuan L., Wen-Hung L., Heng-Chieh Ch., Shih-Ching H., Shih-Shyong Ch.:** Characterization and biocompatibility of a titanium dental implant with a laser irradiated and dual-acid etched surface. *Biomed. Mater. Eng.* 2007, 17 (1), 53–68
82. **Shibli D., Beutner R., Robler S., Worch H.:** Electrochemical behavior of titanium-based materials - are there relations to biocompatibility. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2002, 13 (12), 1215–1220
83. **Shibli J.A., Marcantonio E., d'Avila S., Guastaldi A.C., Marcantonio E.:** Analysis of Failed Commercially Pure Titanium Dental Implants: A Scanning Electron Microscopy and Energy-Dispersive Spectrometer X-Ray Study. *J. Periodontol.* 2005, 76 (7), 1092–1099
84. **Sicilia A., Cuesta S., Coma G., Arregui I., Guisasola C., Ruiz E., Maestro A.:** Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19 (8): 823-835
85. **Singh R., Dahotre N.B.:** Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007, 18 (5), 725–751
86. **Srimaneeponga V., Yoneyamab T., Kobayashic E., Doid H., Hanawad T.:** Comparative study on torsional strength, ductility and fracture characteristics of laser-welded $\alpha+\beta$ Ti-6Al-7Nb alloy, CP Titanium and Co-Cr alloy dental castings. *Dent. Mater.* 2008, 24 (6), 839–845
87. **Stangricka-Mazurek A., Szponar E.:** Występowanie liszaja płaskiego jamy ustnej a obecność wypełnień amalgamatowych. *Dent. Forum.* 2006, 2, 39-42
88. **Stejskal V., Hudecek R., Stejskal J., Sterzl I.:** Diagnosis and treatment of metal-induced side-effects. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006, 27 (Suppl 1), 7–16
89. **Stejskal V.D.M., Danersund A., Lindvall A., Hudecek R., Nordman V., Yaqob A., Mayer W., Bieger W., Lindh U.:** Metal-specific lymphocytes: biomarkers of sensitivity in man. *Neuro Endocrinol. Letters.* 1999, 20 (5), 289–298
90. **Stenport V.F., Johansson C.B.:** Evaluations of Bone Tissue Integration to Pure and Alloyed Titanium Implants. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2008, 10, (3), 191-199
91. **Strietzel R., Hösch A., Kalbleisch H., Buch D.:** *In vitro* corrosion of titanium. *Biomaterials.* 1998, 19 (16), 1495-1499

92. **Szopa S., Jabłońska M.** ICP-MS w analizie próbek środowiskowych. Zastosowanie spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie – cz. I *Laboratorium* 2009, 11-12, 26-30
93. **Śpiewak R., Brewczyński P.**: Powikłania po stabilizacji płytą metalową złamania kości udowej u chorej z alergią kontaktową na chrom, nikiel i kobalt. *Pol. Tyg. Lek.* 1993, XLVIII, 29–30
94. **Śpiewak R.**: Alergia kontaktowa – diagnostyka i postępowanie. *Alergia, Astma, Immunologia.* 2007, 12 (3), 109–127
95. **Śpiewak R.**: Patch Testing for Contact Allergy and Allergic Contact Dermatitis. *The Open Allergy Journal.* 2008, 1, 42–51
96. **Taher N.M., Al Jabab A.S.**: Galvanic corrosion behavior of implant suprastructure dental alloys. *Dent. Mater.* 2003, 19 (1), 54-59
97. **Thomas P., Bandl W.D., 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 (4), 199-202
98. **Tomizawa Y., Hanawa T.**: Corrosion of Pure Titanium Sternal Wire. *Ann. Thorac. Surg.* 2007, 84 (3), 1012–1014
99. **Ungersböck A., Perren S.M., Pohler O.**: Comparison of the tissue reaction to implants made of a beta titanium alloy and pure titanium. Experimental study on rabbits. *J. Mater. Sc.: Materials in Medicine.* 1994, 5, 11, 788–792
100. **Urban R.M, Jacobs J.J, Tomlinson M.J, Gavrilovic J., Black J.**: Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J. Bone Joint Surg.* 2000, 82-A (4), 57–76
101. **Urbanek–Brychczyńska M.**: Ilościowa ocena uwalniania jonów metali ciężkich ze stopów dentystycznych. *Rozprawa doktorska.* Poznań 2001
102. **Valentine-Thon E., Müller K., Guzzi G., Kreisel S., Ohnsorge P., Sandkamp M.**: LTT-MELISA[®] is clinically relevant for detecting and monitoring metal sensitivity. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2006,27(Suppl 1),17–24
103. **Valentine-Thon E., Schiwara H. W.**: Validity of MELISA[®] for metal sensitivity testing. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2003, 24 (1/2), 57–64
104. **Venable Ch.S., Stuck W.G., Beach A.**: The Effects on Bone of the Presence of Metals; Based Upon Electrolysis. *Ann. Surg.* 1937, 105 (6), 917-938
105. **Venclíkova Z, Benada O, Bártova J, Joska L, Mrklas L.** Metallic pigmentation of human teeth and gingiva: morphological and immunological aspects. *Dent. Mater J.* 2007, 26 (1), 96-104
106. **Voggenreiter G, Leiting S, Brauer H, Leiting P, Majetschak M, Bardenheuer M, Obertacke U.**: Immuno-inflammatory tissue reaction to stainless-steel and titanium plates used for internal fixation of long bones. *Biomaterials.* 2003, 24 (2), 247-254
107. **Von Schroeder H.P., Smith D.C., Gross A.E., Pilliar R.M., Kandel R.A., Chernecky R., Lugowski S.J.**: Titanemia from total knee arthroplasty. A case resulting from a failed patellar component. *J. Arthroplasty.* 1996, 11 (5), 620-625

-
108. **Welander M, Abrahamsson I, Linder E, Liljenberg B, Berglundh T.** Soft tissue healing at titanium implants coated with type I collagen. An experimental study in dogs. *J. Clin. Periodontol.* 2007, 34 (5), 452-458
 109. **Więckiewicz W., Zeńczak-Więckiewicz D., Mazurec J.** Nowa propozycja implantacji śródkostnej z możliwością odbudowy protetycznej w dwanaście tygodni. *Dent. Forum.* 2006, 2, 43 – 49.
 110. **Wilson M., Patel H., Kpendema H., Noart J.H., Hunt N.P. Mordant N.J** Corrosion of intraoral magnets by multi-species biofilms in the presence and absence of sucrose. *Biomaterials.* 1997, 18, 53-57
 111. **Yamazoe M.:** Study of corrosion of combinations of titanium/Ti-6Al-4V implants and dental alloys. *Dent. Mater. J.* 2010, 29 (5), 542–553
 112. <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>
 113. <http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.htm>

11. SPIS RYCIN

Rycina 1. Przebarwienia błony śluzowej wokół elementów protetycznych na podbudowie metalowej.	18
Rycina 2. Mechanizm reakcji alergicznej na metale. Jony metalu łączą się z białkami pozakomórkowymi, wnikając do komórki prezentującej antygen (APC) i są prezentowane limfocytom Th (CD4+) via TCR; H – jon metalu (hapten), B – białko pozakomórkowe, MHC II – k [Makuch 2010].	20
Rycina 3. Jony metalu wnikają do wnętrza komórki APC łącząc się z białkami wewnątrzkomórkowymi i po rozłożeniu w endosomach przedstawione są w kontekście MHC I limfocytom Tc (CD 8+) via TCR; H – jon metalu (hapten), B – białko wewnątrzkomórkowe, MHC I – k [Makuch 2010].	20
Rycina 4. Jony metalu aktywują limfocyty T łącząc się bezpośrednio z MHC komórki prezentującej antygen oraz TCR limfocytu T, podobnie jak to się dzieje w przypadku superantygenów; H – jon metalu (hapten), MHC – kompleks zgodności tkankowej, TCR – receptor [Makuch 2010].	20
Rycina 5. Pobranie materiału do badań podczas odsłonięcia wszczepu (przy użyciu skalpela).	26
Rycina 6. Pojemnik z badaną próbą.	26
Rycina 7. "Bomba teflonowa" w piecu mikrofalowym.	28
Rycina 8. Piec mikrofalowy MDS-2000.	29
Rycina 9. Schemat spektrometru emisyjnego z indukcyjnie sprzężoną plazmą [http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.htm]. ..	31
Rycina 10. Spektrometr ICP–MS Varian.	31
Rycina 11. Przykładowy sygnał ICP obrazujący piki dla roztworów wzorcowych tytanu.	32
Rycina 12. Krzywa kalibracyjna dla jonów Ti.	32
Rycina 13. Ilustracyjne porównanie wyników średnich wartości uzyskanych od pacjentów poddanych implantacji w odniesieniu do grupy kontrolnej ($P \leq 0,05$).	36
Rycina 14. Wykres ilustrujący zależność zawartości tytanu w błonie śluzowej pobranej znad implantu do zawartości tytanu z grupy kontrolnej ($P \leq 0,000$).	37
Rycina 15. Wykres ilustrujący wartości średnie zawartości tytanu w błonie śluzowej pobranej znad wszczepów sześciu systemów implantologicznych i grupy kontrolnej.	41
Rycina 16. Wykres ilustrujący wartości minimalne i maksymalne zawartości Ti w błonie śluzowej pobranej znad wszczepów z różnych systemów implantologicznych.	42
Rycina 17. Zależności statystyczne zawartości Ti w błonie śluzowej pobranej znad wszczepów różnych systemów implantologicznych ($P \leq 0,05$).	44

Rycina 18. Wykres ilustrujący zależność wyników zawartości Ti w błonie śluzowej pobranej z nad wszczepów systemu Osteoplast® w odniesieniu do wyników próbek z pozostałych systemów implantologicznych ($P = 0,03$).....	46
Rycina 19. Wykres ilustrujący zależności statystyczne wyników zawartości Ti pomiędzy najliczniejszymi grupami, tzn. Osteoplast® i Neoss® oraz grupą kontrolną ($P \leq 0,05$).....	47
Rycina 20. Wykres ilustrujący średnie wyniki zawartości Ti dla różnych systemów implantologicznych u pacjentów poddanych analizie wewnątrzsobniczej.	48
Rycina 21. Wykres ilustrujący zawartości Ti w błonie śluzowej w zależności od lokalizacji wszczepów (szczeka/żuchwa) ($P \geq 0,05$).....	50
Rycina 22. Wykres ilustrujący średnią zawartość Ti w błonie śluzowej u reprezentantów dwóch grup wiekowych.....	51
Rycina 23. Wykres ilustrujący wartości średnie zawartości Ti w błonie śluzowej w zależności od płci.....	53
Rycina 24. Wykres zależności pomiędzy zawartością Ti a płcią badanych ($P \geq 0,05$).....	54
Rycina 25. Obraz z elektronowego mikroskopu transmisyjnego przedstawiający drobiny tytanu w fagolizosomach makrofaga (powiększenie 6000x) [Voggenreiter 2003].	59

12. SPIS TABEL

Tabela 1. Skład chemiczny klas czystego tytanu (CP) oraz stopów Ti ₆ Al ₄ V (%) [McCracken 1999].....	14
Tabela 2. Zestawienie niektórych właściwości mechanicznych wybranych materiałów stosowanych w implantologii (według ASTM) oraz tkanek twardych u człowieka [McCracken 1999].....	15
Tabela 3. Sumaryczne zestawienie średnich wyników Ti dla grupy badanej i kontrolnej	36
Tabela 4. Poziom istotności (P) dla grupy badanej i kontrolnej	37
Tabela 5. Parametry statystyczne grupy badanej i kontrolnej	37
Tabela 6. Zestawienie typów implantów z nad których pobrano wycinki błony śluzowej	42
Tabela 7. Zależności (poziom istotności) pomiędzy badanymi próbkami z różnych systemów implantologicznych	43
Tabela 8. Parametry statystyczne dla próbek z różnych systemów implantologicznych	43
Tabela 9. Poziom istotności dla grupy badanej systemu Osteoplast® i pozostałych systemów	45
Tabela 10. Parametry statystyczne dla grupy badanej systemu Osteoplast® i pozostałych systemów implantologicznych	45
Tabela 11. Analiza statystyczna dla grupy badanej systemu Osteoplast®, Neoss® i grupy kontrolnej	47
Tabela 12. Zestawienie wyników dla różnych lokalizacji wszczepów u pacjentów posiadających więcej niż dwa implanty	48
Tabela 13. Poziom istotności dla grupy badanej zależnej od lokalizacji	49
Tabela 14. Parametry statystyczne dla grupy badanej w zależności od lokalizacji implantów.....	49
Tabela 15. Zestawienie średnich wartości uzyskanych dla grup pacjentów przed i po 60 roku życia.....	51
Tabela 16. Analiza statystyczna zależności zawartości Ti w błonie śluzowej w zależności od wieku zaopatrzonych w implanty pacjentów	52
Tabela 17. Średnia zawartość tytanu w tkankach dla badanych grup kobiet i mężczyzn	52
Tabela 18. Wartości minimalne i maksymalne zawartości tytanu w tkankach dla badanych grup kobiet i mężczyzn.....	53
Tabela 19. Parametry statystyczne dla badanych grup kobiet i mężczyzn	53
Tabela 20. Poziom istotności badanych grup kobiet i mężczyzn.....	54
Tabela 21. Zestawienie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej z nad implantów – grupa badana.....	83

Tabela 22. Zestawienie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej znad implantów – grupa kontrolna.....	86
Tabela 23. Zestawienie typów implantów znad których pobrano wycinki błony śluzowej	87
Tabela 24. Zestawienie wyników dla różnych lokalizacji wszczepów u pacjentów posiadających więcej niż dwa implanty	87
Tabela 25. Dokładne parametry analizy ICP-MS.....	89

13. DOKUMENTACJA

Tabela 21. Zestawienie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej znad implantów – grupa badana

Lp.	Pacjent	Płeć	Wiek	System	Miejsce	Ti [$\mu\text{g/g}$]
1	AB	K	56	Osteoplast [®]	szczęka	120
2	BA	K	46	Ilerimplant [®]	żuchwa	4,60
3	BN	M	80	Neoss [®]	żuchwa	1) 1,80 2) 5,90
4	AB	M	52	Ilerimplant [®]	żuchwa	1) 2,40 2) 8,40
5	BA	K	56	Osteoplast [®]	szczęka	24,40
6	AB	M	62	Osteoplast [®]	żuchwa	1) 22,40 2) 21,60
7	AB	K	76	Osteoplast [®]	szczęka	4,7
8	IŻ	K.	66	Osteoplast [®]	szczęka	1) 6,60 2) 12,90 3) 28,90 4) 20,50
9	ET	M	60	Neoss [®]	żuchwa 1) 45 2) 47	1) 2,30 2) 6,20
10	MW	K	60	Osteoplast [®]	szczęka	1) 0,40 2) 0,30 3) 48,10*
11	AT	M	32	Osteoplast [®]	żuchwa 1) 36 2) 37 3) 46	1) 20,80 2) 12,70 3) 5,00
12	ET	K	67	Osteoplast [®]	żuchwa 1) 35 2) 36	1) pld 2) 3,60
13	AR	K	40	Osteoplast [®]	żuchwa 1) 31 2) 32 3) 41 4) 42	1) 9,70 2) 2,00 3) 8,90 4) 13,50
14	BS	K	52	Osteoplast [®]	szczęka 1) 11 2) 12 3) 14 żuchwa 4) 36 5) 35 6) 46	1) 1,00 2) 122,59 3) 19,50 4) 1,50 5) 6,10 6) 1,40

15	GP	M	32	Osteoplast [®]	szczęka	1,00
16	EK	K	42	Osteoplast [®]	żuchwa 45	2,60
17	WP	M	56	Osteoplast [®]	żuchwa 47	0,20*
18	JG	M	66	Neoss [®]	szczęka	11,40
19	PK	M	68	Osteoplast [®]	szczęka	17,20
20	WW	M	34	Osteoplast [®]	żuchwa 46	0,90
21	SA	M	55	Osteoplast [®]	żuchwa 1) 34 2) 36 3) 41 4) 44 5) 46	1) 5,91 2) 0,29 3) 1,02 4) 0,68 5) 0,49
22	MD	K	62	Neoss [®]	żuchwa 1) 47 2) 45 3) 46 4) 36	1) 0,39 2) 0,65 3) 0,43 4) 1,31
23	SZ	M	62	Osteoplast [®]	żuchwa 31	5,9*
24	KI	K	47	Osteoplast [®]	żuchwa 46	2,26
25	KK	M	66	Osteoplast [®]	żuchwa 1) 33 2) 35 3) 37 4) 43 5) 46	1) 4,38 2) 3,02 3) 6,94 4) 1,34 5) 1,77
26	HN	K	81	Neoss [®]	szczęka 1) 24 2) 25	1) 11,07 2) 6,94
27	JK	M	57	Neoss [®]	szczęka 1) 22 2) 24 3) 25 żuchwa 4) 45 5) 47	1) 0,39 2) 1,17 3) 1,29 4) 1,34 5) 0,14
28	TZ	K	72	Neoss [®]	szczęka 1) 11 2) 23 3) 24 4) 25	1) 0,86 2) 0,20 3) 4,76 4) 0,16
29	PG-B	M	64	Osteoplast [®]	żuchwa 1) 45 2) 35	1) 0,44 2) 1,26
30	SE	K	61	Ilerimplant [®]	żuchwa	1) 7,12 2) 3,44

31	HT	K	58	Neoss [®]	szczęka 1) 25 żuchwa 2) 36 3) 47	1) 0,62 2) 0,26 3) 1,17
32	BW	M	56	Neoss [®]	szczęka 1) 24 żuchwa 2) 32 3) 36 4) 44 5) 46	1) 1,92 2) 0,73 3) 1,80 4) 2,73 5) 2,25
33	JP	K	48	Osteoplast [®]	żuchwa 1) 37 2) 36 3) 46	1) 6,27 2) 0,47 3) pld
34	ST	M	76	Neoss [®]	szczęka1) 11 2) 13	1) 1,92 2) 0,27
35	SA	K	64	Biomet 3i [®]	szczęka 1) 24 żuchwa 2) 35 3) 45	1) 1,44 2) 3,12 3) 1,14
36	ER	K	49	Biomet 3i [®]	żuchwa 1) 34 2) 35 3) 46 4) 47	1) 2,56 2) 0,99 3) 5,49 4) 2,73
37	BC	K	65	SKY [®] (szczęka) Osteoplast [®] (żuchwa)	szczęka 1) 15 2) 26 żuchwa 3) 36	1) 3,28 2) 1,85 3) 2,09
38	DK	K	50	SKY [®]	szczęka	3,35
39	KM	K	31	Implant Direct [®]	szczęka	1,44
40	WC	M	55	Biomet 3i [®]	szczęka	2,71
41	KK	K	53	Osteoplast [®]	szczęka	0,88
42	MK	K	41	Osteoplast [®]	szczęka	0,50
43	MD	K	35	SKY [®]	żuchwa	2,05

* próbka z nieprzyjętego wszczepu
pld – poniżej limitu detekcji

Tabela 22. Zestawienie wyników zawartości tytanu w błonie śluzowej znad implantów – grupa kontrolna

Lp.	Pacjent	Płeć	Wiek	Miejsce	Ti [µg/g]
1	BA	M	54	szczęka	1) 2,90 2) 3,00
2	IZ	K	66	szczęka	1,20
3	BC	K	65	żuchwa	0,08
4	GP	M	32	szczęka	1,60
5	DI	K	63	szczęka	pld.
6	SA	M	55	żuchwa	pld
7	KM	K	31	szczęka	0,43
8	GW	M	57	żuchwa	1,60
9	AP	K	51	żuchwa	0,07
10	DK	K	50	szczęka	3,66
11	AU	K	59	żuchwa	0,08
12	OM	M	32	szczęka	0,16
13	LM	K	53	żuchwa	pld
14	ML	K	35	szczęka	pld
15	BS	M	36	żuchwa	0,39
16	MS	M	47	szczęka	0,05
17	MK	K	52	szczęka	0,03
18	SM	M	19	żuchwa	0,12
19	RM	K	32	szczęka	0,09
20	GD	M	25	szczęka	0,98

pld – poniżej limitu detekcji

Tabela 23. Zestawienie typów implantów z których pobrano wycinki błony śluzowej

System	Liczba pacjentów	Płeć		Miejsce		Liczba wszczepów	Średni wynik dla grupy Ti [ug/g]
		K	M	Szczęka	Żuchwa		
Osteoplant [®]	24	14	10	10	15	52	9,76
Neoss [®]	10	4	6	7	6	30	2,41
Ilerimplant [®]	3	2	1	0	3	5	5,19
Biomet 3i [®]	3	2	1	2	2	8	2,52
SKY [®]	3	3	0	2	1	4	2,63
Implant Direct [®]	1	1	0	1	0	1	1,44
Grupa kontrolna	21	11	9	13	8	21	0,81

Tabela 24. Zestawienie wyników dla różnych lokalizacji wszczepów u pacjentów posiadających więcej niż dwa implanty

	Szczęka			Żuchwa		
	1-3	4-7	Średnia	1-3	4-7	Średnia
Osteoplant					22,40 21,60	22,00
		6,60 12,90 28,90 20,50	17,23			
		0,40 0,40 48,10*	16,30			
					20,80 12,70 5,00	12,83
					pld 3,60	3,60
				9,70 2,00 8,90 13,50		8,53
		1,00 122,59	19,50	106,20	1,50 6,10 1,40	3,00
				1,02	5,91 0,29 0,68 0,49	1,62
				4,38 1,34	3,02 6,91 1,77	19,19

					0,44 1,26	0,85
					6,27 0,47 płd.	2,25
			46,58			8,21
Neoss				1,80	5,90	3,85
					2,30 6,20	4,25
					0,39 0,65 0,43 1,31	0,70
		11,07 6,94	9,01			
	0,39	1,17 1,29	10,95		1,34 0,14	0,74
	0,86 0,20	4,76 0,16	1,50			
		0,62			0,26 1,17	0,72
		1,92	1,92	0,73	1,8 2,73 2,25	1,88
	1,92 0,27		1,10			
		4,90			2,02	
Ilerimplant					2,40 8,40	5,40
				7,12 3,44		5,28
						5,34
Biomet 3i		1,44	1,44		3,12 1,14	2,13
					2,56 0,99 5,49 2,73	2,94
			1,44			2,54
SKY		3,28 1,85	2,57			
			2,57			

płd – poniżej limitu detekcji

Tabela 25. Dokładne parametry analizy ICP-MS

Parametry metody	
RF (power) [kW]	1,20
Przepływ plazmy [L min ⁻¹]	15,0
Przepływ nebulizera [L min ⁻¹]	0,9
Osiągnięta wysokość [mm]	12
Częstotliwość pompy	15
Czas płukania [s]	10
Przepływ pomocniczy [L min ⁻¹]	1,50
Czas odczytu [s]	5,0
Stabilizacja instrumentu [s]	15
Czas opóźnienia próbki [s]	30
Pierwiastek– emisja[nm]	Ti – 336,122

14. ZAŁĄCZNIK

INFORMACJA O BADANIU

Fragment błony śluzowej pobrany od Pani/Pana podczas odsłaniania wszczepu, po 4–6-miesięcznym okresie osteointegracji, stanowi materiał badawczy do pracy doktorskiej. Pobranie wycinka mieści się w ramach przyjętych procedur przed- i poimplantacyjnych (nie jest dodatkowym zabiegiem).

ZGODA NA UDZIAŁ W BADANIACH

.....
(imię i nazwisko pacjenta)

wyrażam zgodę na udział w badaniach naukowych przeprowadzonych przez lek. stom. Krzysztofa Makucha w oparciu o pobrane ode mnie wycinek błony śluzowej

Data

Podpis pacjenta



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznań

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

Uchwała nr 537/10

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); 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 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2003, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małych dzieci (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2000r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniami klinicznymi produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 17 czerwca 2010 r.

**rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:
prof. UM dr hab. Ryszard Koczorowski**

**w sprawie prowadzenia badań w
Klinice Gerostomatologii UM w Poznaniu**

Główny badacz: lek. stom. Krzysztof Makuch

**Członkowie zespołu
badawczego: prof. UM dr hab. Ryszard Koczorowski
prof. dr hab. Wiesław Wasiak
dr Iwona Rykowska**

**Temat badań: "Ocena stopnia migracji i wpływu tytanu pochodzącego
z implantów stomatologicznych na stan otaczających je tkanek
miękkich".**

**Komisja wyraziła zgodę na zmianę tematu badania na:
„Analiza zawartości tytanu w błonie śluzowej pokrywającej dwuetapowe tytanowe
wszczepy śródkostne w okresie ich wgajania”.**

**potwierdza się zgodność
z oryginałem**

13.12.2010

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
61-701 Poznań, ul. Fredry 10
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax (+48 61) 854 61 07

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej pt.: „**Analiza zawartości tytanu w błonie śluzowej pokrywającej dwuetapowe tytanowe wszczepy śródkostne w okresie ich wgajania**”.

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk medycznych, a złożona przeze mnie dyskietka/płytą CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko – **Krzysztof Makuch**

Data, podpis.....