

**Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym**



Miłosława Pancerz-Łoś

**Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę
porcelanowych koron protetycznych na ekspresję
cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej
i hodowlach keratynocytów**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kmiec

**Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kmiec

Gdańsk 2014

Składał serdeczne podziękowania:

Mojemu Promotorowi,

Panu Profesorowi Zbigniewowi Kmieciowi,

Kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii GUMed,

za przekazaną mi wiedzę, pomoc, wsparcie i ogromną dozę
życzliwości i cierpliwości.

Panu Profesorowi Jerzemu Łukasiakowi za pomoc merytoryczną
oraz udostępnienie związków chemicznych, bez których niniejsza
praca nie byłaby zrealizowana.

Panu Profesorowi Zdzisławowi Bereznowskiemu, Kierownikowi
Katedry Protetyki GUMed, za umożliwienie mi prowadzenia pracy
naukowej, za życzliwość i nieocenioną pomoc w przygotowaniu
rozprawy do druku.

Doktorowi Michałowi Pikule z Zakładu Immunologii Klinicznej i
Transplantologii GUMed za wprowadzenie mnie w tajniki hodowli
komórkowych.

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Histologii GUMed
za życzliwość i wspaniałą atmosferę pracy naukowo-badawczej.

Spis treści

1.	WSTĘP	6
1.1.	Ogólna charakterystyka stopów dentystycznych stosowanych w wykonawstwie koron	7
1.2.	Właściwości metali wchodzących w skład stopów dentystycznych stosowanych w wykonawstwie koron protetycznych	9
1.3.	Przegląd stopów metali stosowanych w wykonawstwie protez stałych	11
1.4.	Mechanizmy obronne jamy ustnej	13
1.4.1	Nieswoiste mechanizmy obronne	13
1.4.2	Swoiste mechanizmy obronne	13
1.4.3	Mikroflora jamy ustnej	14
1.5.	Środowisko mikrobiologiczne szczeliny dziąsłowej	16
1.6.	Biokompatybilność stopów dentystycznych	18
1.7.	Wpływ zabiegów protetycznych na tkanki przyzębia.....	25
1.8.	Mediatorzy odpowiedzi immunologicznej w obrębie przyzębia i jamy ustnej	25
1.8.1	TNF- α	26
1.8.2	Interleukina 8	28
1.8.3	Interferon gamma.....	29
	Rola cytokin przeciwzapalnych i immunoregulacyjnych.....	30
1.8.4	Interleukina 10	30
1.8.5	Interleukina 12	30
2.	CELE PRACY	32
3.	MATERIAŁ I METODY	33
3.1	Charakterystyka pacjentów	33
3.2	Materiały do hodowli komórkowej.....	37
3.2.1	Aparatura	37
3.2.2	Odczynniki do hodowli komórkowej	37
3.2.3	Suplementy hodowli komórkowej	38
3.2.4	Podłoże hodowlane dla komórek	38
3.2.5	Związki badanych metali użytych do hodowli z keratynocytami.....	38
3.2.6	Sprzęt laboratoryjny.....	38
3.2.7	Oprogramowanie	38
3.3	Metody	39
3.3.1	Oznaczanie zawartości cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej.....	39
3.3.2	Izolacja enzymatyczna keratynocytów	39
3.3.3	Hodowla keratynocytów	40
3.3.4	Pasażowanie komórek.....	40
3.3.5	Ocena wpływu wybranych jonów na morfologię hodowanych keratynocytów	40
3.3.6	Oznaczanie stężenia cytokin metodą Flex Set.....	41
3.3.7	Badania mikrobiologiczne płynu ze szczeliny dziąsłowej	41

3.3.8	Badania w kierunku bakterii beztlenowych.....	42
3.3.9	Badania w kierunku paciorkowców i pałeczek Lactobacillus	43
3.3.10	Badania w kierunku bakterii mikroaerofilnych	43
3.3.11	Badania w kierunku bakterii tlenowych i względnie beztlenowych.....	43
3.2.12	Badania w kierunku grzybów drożdżopodobnych.....	44
3.3.13.	Analiza statystyczna	44
4.	WYNIKI	45
4.1	Stężenie cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej po 1 tygodniu i po 6 miesiącach od zacementowania koron.....	45
4.2.	Wpływ rodzaju stopu metalu na stężenia cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej po zacementowaniu koron	47
4.3.	Wpływ płci na stężenie cytokin u w płynie szczeliny dziąsłowej po zacementowaniu koron	51
4.4	Ocena wpływu rodzaju preparacji na stężenia cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej	54
4.5.	Ocena wpływu lokalizacji anatomicznej koron na stężenie cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej	57
4.6	Ocena wpływu umiejscowienia koron na stężenia cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej	60
4.7	Wpływ jonów metali na sekrecję cytokin przez keratynocyty hodowane w warunkach in vitro	63
4.8	Wpływ jonów metali na morfologię keratynocytów jamy ustnej w hodowlach in vitro	65
4.9	Analiza mikrobiologiczna płynu kieszonki dziąsłowej.....	68
4.9.1	Ocena wpływu stopu na środowisko mikrobiologiczne kieszonki dziąsłowej	71
4.9.2	Analiza występowania wybranych gatunków mikroorganizmów w szczelinach dziąsłowych koron protetycznych na bazie Au, Ni, Co.....	77
4.10	Podsumowanie wyników	79
5.	DYSKUSJA	81
5.1	Korony protetyczne metalowo ceramiczne– możliwe interakcje z tkankami.....	81
5.2.	Wpływ materiału korony na poziomy cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej	85
5.2.1	Czynnik martwicy nowotworów- α	86
5.2.2.	Interleukina-8.....	89
5.2.3.	Interferon gamma.....	91
5.2.4	Interleukina 10	91
5.2.5	Interleukina 12	92
5.3	Wpływ jonów metali na hodowle keratynocytów	93
5.4	Badania mikrobiologiczne.....	96
6.	WNIOSKI	99
7.	STRESZCZENIE.....	100
8.	PIŚMIENNICTWO	102

Spis skrótów i jednostek

Skrót/jednostka	Objaśnienie polskie	Objaśnienie angielskie
ADA	Amerykańskie Towarzystwo Dentystyczne	American Dental Association
EGF	Czynnik wzrostu naskórka	Epidermal Growth Factor
GCF	Płyn szczeliny dziąsłowej	Gingival Crevicular Fluid
HGF	Czynnik wzrostu hepatocytów	Hepatocyte Growth Factor
IgA	Immunoglobulina A	Immunoglobulin A
IL-1, -2	Interleukina 1, 2	Interleukin 1, 2
IFN-γ	Interferon gamma	Interferon gamma
KGF	Czynnik wzrostu Keratynocytów	Keratinocyte Growth Factor
LPS	Lipopolisacharyd	Lipopolisaccharide
MHC	Główny Układ Zgodności Tkankowej	Major Histocompatibility Complex
PBMCs	Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PGE ₂	Prostaglandyna E ₂	Prostaglandin E ₂
Ra	Stopień chropowatości	Roughness average
TGFα	Transformujący czynnik wzrostu alfa	Transforming Growth Factor Alpha
TNF	Czynnik martwicy nowotworów	Tumor Necrosis Factor
U	Jednostka	Unit

1. WSTĘP

Korona protetyczna jest to uzupełnienie stałe, odbudowujące całość lub część korony zęba, umocowane na zębie naturalnym lub wszczepie dentystycznym umożliwiające sprawne funkcjonowanie układu stomatognatycznego przez przywrócenie prawidłowej morfologii i funkcji twardych tkanek w zakresie pojedynczych zębów. Uzupełnienia te mogą być jednolite, wykonane z jednego rodzaju materiału, np. korona pełnoceramiczna wykonana z porcelany lub metalowa wykonana wyłącznie ze stopu metali oraz złożone metalowo-ceramiczne wykonane z obu tych materiałów (Majewski, 2005; Gołębiewska, 2003).

Na prawidłowe funkcjonowanie tkanek przyzębia zębów pokrytych koronami protetycznymi istotny wpływ ma rodzaj zastosowanego materiału, kształt konstrukcji protez oraz ich techniczne wykonanie. Ważnym czynnikiem wpływającym na stan zdrowia przyzębia zębów filarowych jest również sposób preparacji zębów. Uzyskanie odpowiedniej przestrzeni dla przyszłej korony oraz jednoznacznej granicy oszlifowania zęba w okolicy przydziąsłowej zapewnienia właściwy kształt korony, jej szczelność brzeżną oraz gładkie przejście ścian korony w powierzchnię obwodową zęba co w efekcie eliminuje czynniki drażniące przyzębie wokół koron protetycznych. Materiały stosowane do wykonywania uzupełnień protetycznych, pozostające w kontakcie z tkankami przyzębia przez wiele lat, nie mogą wywierać ani miejscowo, ani ogólnie szkodliwego wpływu na organizm oraz muszą być odporne na działanie fizycznych i chemicznych czynników środowiska jamy ustnej. Cechą materiałów powinna być więc całkowita biogodność. W środowisku jamy ustnej nie mogą ulegać korozji, rozpuszczaniu, nie wywoływać zaburzeń smaku, reakcji chemicznych lub alergicznych i nie powodować podrażnień błony śluzowej (Dejak i wsp., 2006).

Ceramika dentystyczna jest obojętna dla środowiska jamy ustnej, odporna na działanie płynów ustrojowych, cechuje się niskim przewodnictwem ciepła i dużą wytrzymałością mechaniczną. Ma bardzo dobre właściwości estetyczne, nie podlega zmatowieniu, nie zmienia barwy i jest odporna na odkładanie się płytki nazębnej. Uważana jest za najbardziej biokompatybilny materiał stosowany do wykonywania uzupełnień protetycznych. Badania i opracowania technologiczne ostatniego okresu nad materiałami ceramicznymi zmierzają w kierunku stopniowego eliminowania stopów metali jako materiału dla konstrukcji różnego rodzaju protez zębowych, a w szczególności do zastąpienia go w wykonawstwie koron i mostów protetycznych (Craig i wsp., 2000; Geurtsen, 2002). Stopy dentystyczne stosowane są nadal powszechnie we współczesnej

praktyce. Do wykonywania uzupełnień stałych wykorzystywane są stopy szlachetne na bazie złota i stopy nieszlachetne zawierające w swoim składzie wyłącznie metale nieszlachetne lub też dodatkowo, w niewielkich ilościach, złoto (do 20%). Wiadomym jest, że wszystkie stopy dentystyczne uwalniają jony metali do środowiska jamy ustnej i mają potencjał do reagowania z tkankami jamy ustnej. Ilość i rodzaj metalu uwolnionego do jamy ustnej jest różna i niezależna od składu stopu. Do interakcji stopu dentystycznego z tkankami jamy ustnej dochodzi poprzez różne mechanizmy tj. toksyczność stopu, reakcje alergiczne, interakcje z mikroorganizmami. Podczas gdy wpływ bakterii możemy eliminować przez staranną higienę jamy ustnej to pozostałe mechanizmy są poza możliwością naszej ingerencji i prowadzą do miejscowej, a czasem również i ogólnoustrojowej reakcji na obecność metalu. Z punktu widzenia praktyki lekarskiej ważne jest spostrzeżenie, że procesy powyższe, mimo iż zawsze szkodliwe dla organizmu, nie w każdym przypadku manifestują się zauważalnymi objawami klinicznymi (Majewski, 2005).

Oddziaływanie stopów dentystycznych na środowisko jamy ustnej może niekiedy prowadzić do niepożądanych zmian z udziałem bakterii, nabłonka dziąsła i komórek układu odpornościowego w przyzębiu zębów pokrytych koronami. Wiadomo, że w stanach fizjologicznych komórki nabłonka jamy ustnej wykazują znaczną aktywność sekrecyjną, manifestującą się m.in. produkcją cytokin. Niewiele jest danych na temat mechanizmów prowadzących do rozwoju *gingivitis* czy *periodontitis* spowodowanych przez dentystyczne stopy metali. W procesach tych biorą udział głównie cytokiny zapalne oraz komórki układu odpornościowego. Cytokiny uczestniczą w wielu procesach związanych z różnicowaniem się i aktywacją komórek immunokompetentnych. Migracja komórek zapalnych do miejsc zapalenia jest jednym z kluczowych momentów w inicjacji i przebiegu reakcji zapalnych i może prowadzić do niszczenia komórek. Główną rolę w tym złożonym procesie odgrywają chemokiny, których obecnie zidentyfikowano już ich ponad 50 (Gołąb i wsp., 2013). Podstawowa aktywność biologiczna chemokin koncentruje się na aktywacji i migracji monocytów i granulocytów obojętnochłonnych. Wydzielanie chemokin wzrasta w stanach zapalnych i w dużym stopniu jest indukowane przez prozapalne cytokiny m.in. przez TNF- α (Reddy i wsp., 2011).

1.1. Ogólna charakterystyka stopów dentystycznych stosowanych w wykonawstwie koron

Stopem dentystycznym nazywamy połączenie dwu lub większej liczby pierwiastków chemicznych, które wykazują główne właściwości stanu metalicznego.

Niekiedy konieczne staje się dodanie metaloidu lub niemetalu np. węgla, który doprowadza do powstania stopu o określonych właściwościach. Metaloid, nazywany inaczej półmetalem ma właściwości pośrednie między metalami a niemetalami np. arsen lub antymon. Podstawowymi stopami wykorzystywanymi w protetyce stomatologicznej mogą być stopy różnych metali, zarówno stopy metali szlachetnych jak i stopy metali nieszlachetnych. Do metali szlachetnych zaliczamy złoto, platynę, pallad, iryd, ruten. Metalami podstawowymi są srebro, cynk, ind, itp. Mimo, iż w metalurgii srebro jest materiałem szlachetnym, to ze względu na wysoką reaktywność w jamie ustnej oraz śniadzenie nie zostało ono zakwalifikowane przez ADA (Amerykańskie Stowarzyszenie Dentystyczne) do materiałów podstawowych (Craig i wsp. 2000). Wszystkie metale i stopy mają w stanie stałym budowę krystaliczną. Poszczególne atomy, z których zbudowany jest kryształ, układają się w ściśle określonym porządku, tworząc tzw. siatkę przestrzenną. Ukształtowanie tej siatki może mieć układ heksagonalny, tetragonalny, romboidalny itp. Najwięcej metali krystalizuje w układzie regularnym, który może mieć siatkę przestrzenną wyznaczoną przez 14 atomów zlokalizowanych w narożnikach i płaszczyznach ścian kryształu (Combe i wsp., 1997). Ze względu na możliwość rozpuszczenia poszczególnych składników w stopie możemy rozróżnić:

- stopy homogenne, kiedy dodany metal całkowicie rozpuszcza się w metalu podstawowym tworząc jednorodną strukturę
- stopy niehomogenne, dodany metal tworzy odrębne kryształ
- Stopy graniczne, gdy dodane metale łączą się w ściśle określonych ilościach, a pozostałe składniki tworzą eutektykę.

W protetyce stomatologicznej jako materiały podstawowe stosowane są jedynie stopy jednorodne odporne na korozję w jamie ustnej. Wszystkie metale i ich stopy wzmacniają się wskutek obróbki mechanicznej, polegającej na walcowaniu, kuciu itp. W trakcie takiej obróbki nasilają się właściwości tj. twardość i wytrzymałość na rozerwanie, zmniejsza się natomiast plastyczność, przez co z trudem poddaje się dalszej obróbce mechanicznej, a przy użyciu większych sił rozrywa się i pęka. Przy tejże obróbce mechanicznej kryształy ulegają deformacji, wydłużają się i przyjmują kształt wrzecionowaty. Zdeformowanym kryształom można przywrócić poprzednią budowę, a materiałowi jego poprzednią miękkość i plastyczność w procesie zwanym rekrystalizacją, a polegającym na wyżarzeniu stopu (Gołębiewska, 2003).

Ze wszystkich stosowanych podziałów stopów dentystycznych w stomatologii najbardziej rozpowszechnionym jest podział wg ADA:

- stopy wysokoszlachetne - składają się co najmniej w 60% z metali szlachetnych, z czego 40% stanowi złoto
- stopy szlachetne-minimalna zawartość stopów szlachetnych wynosi 25%, jednak nie jest podana ilość złota jaka musi być obecna w tym stopie
- stopy zawierające w swym składzie stopy nieszlachetne-zawierają mniej niż 25% metali szlachetnych, obecność złota w stopie nie jest wymagana (ASSOCIATION ASDAN, 2005).

Podział oraz nazwa stopów zależą od składnika z największym procentowym udziałem w masie stopu. Zawartość procentowa składników metali jest uwarunkowana wymaganymi właściwościami chemicznymi i fizycznymi przy jednoczesnej możliwości uzyskania materiału homogennego i biokompatybilnego (Kordasz i Wolanek 1998; Rosenstiel i wsp., 2002). Stosowane obecnie w Polsce stopy spełniają warunki określone w normach i certyfikatach światowych. Podstawowym celem w leczeniu protetycznym jest zastosowanie takiego rozwiązania uzupełnień protetycznych, które zapewni atraumatyczny kontakt protezy z tkankami przyzębia oraz wykonanie ich z materiałów biokompatybilnych (Spiechowicz i wsp., 2010).

1.2. Właściwości metali wchodzących w skład stopów dentystycznych stosowanych w wykonawstwie koron protetycznych

Czyste metale w zasadzie nie są stosowane jako materiały podstawowe w protetyce klinicznej, głównie ze względu na niskie właściwości wytrzymałościowe. Używane są natomiast w formie stopów metali. Wyjątkiem od tej reguły jest zastosowanie czystego złota do wykonywania podbudowy dla koron protetycznych licowanych porcelaną w technologii „galwanoformingu”.

Ze względu na to, że przedmiotem badań *in vitro* mojej pracy doktorskiej był wpływ wybranych jonów metali wchodzących w skład stopów użytych do wykonania koron protetycznych wykonywanych w grupie badanych pacjentów przedstawiam krótką charakterystykę jedynie tych metali.

1. Złoto (Au) jest metalem szlachetnym o żółtej barwie, po dokładnym wypolerowaniu powierzchni posiada intensywny połysk. Materiał jest bardzo miękki, kowalny, ciągliwy. Posiada wysoką gęstość, ustępującą jedynie metalom z grupy platynowców. Jest biokompatybilne w stosunku do otaczających tkanek, posiada właściwości bakteriostatyczne i nie jest alergenem. Nie poddaje się działaniu kwasów oraz zasad, jest bardzo dobrym

przewodnikiem elektryczności oraz ciepła. Wytrzymałość jak również twardość złota zmienić można poprzez dodanie innych metali np. srebra, platyny, miedzi i palladu. W technice dentystycznej złoto w czystej postaci nie ma większego zastosowania, używa się go do lutowania platyny lub w postaci folii, jako formy do wypalania niskotopliwej porcelany i do wykonywania złotych konstrukcji w technice „galwanoformingu”. Praktycznie złoto używane jest głównie w formie stopów z innymi metalami.

2. Chrom (Cr) metal nieszlachetny, barwy szaroniebieskiej, twardy oraz trudnotopliwy. Cechuje go wysoka odporność na oddziaływanie środowiska jamy ustnej. W formie czystej służy do elektrolitycznego powlekania powierzchni innych metali, zwiększając w ten sposób ich odporność na korozję. Jako składnik stopów nadaje im twardość oraz zwiększa ich odporność chemiczną. Jest głównym składnikiem stopów chromo-kobaltowych oraz chromo-niklowych, wykorzystywanych do produkcji stałych protez, w tym koron i mostów protetycznych. Kontakt z materiałami zawierającymi chrom może prowadzić do wystąpienia reakcji uczuleniowych, ma zdolność penetracji błon komórkowych i przedostawania się do wnętrza komórki,

3. Kobalt (Co) metal nieszlachetny, barwy srebrzystobiałej twardy, ciągliwy, odporny na oddziaływanie na jego powierzchnię czynników chemicznych. Kobalt jest składnikiem stopów chromo-kobaltowych, którym nadaje odpowiednią twardość, wytrzymałość i płynność odlewniczą. Kobalt należy do głównych alergenów kontaktowych. Metal ten rzadko uczula sam, głównie wraz z chromem albo niklem

4. Nikiel (Ni) metal nieszlachetny barwy srebrzystobiałej, twardy, ciągliwy, dający się dobrze polerować. W protetyce nikiel obecny jest w składzie dentystycznego stopu chromo-niklowego oraz w połączeniu ze stopem złota. Badania laboratoryjne dowodzą, że w wyniku dłuższego użytkowania stałego uzupełnienia protetycznego na bazie niklu dochodzi do niekorzystnych zjawisk dla organizmu pacjenta. Nikiel jest najważniejszym alergenem kontaktowym. Uczulenie na ten metal stwierdza się u 17% dorosłych, przy czym u kobiet uczulenia występują cztery razy częściej. Chrom, kobalt i nikiel stanowią 85-92% wagowych większości stopów nieszlachetnych używanych w wykonawstwie uzupełnień protetycznych (Krawczyk, 2006; Dejak i wsp., 2006).

Pomimo wysokiej odporności stopów na korozję, w warunkach środowiska jamy ustnej może dojść do wytrącenia jonów niklu, które w sposób drażniący mogą oddziaływać na błonę śluzową kieszonki dziąsłowej i powodować stany zapalne przyzębia. Relatywnie wysoki odsetek pacjentów jest uczulonych na nikiel, dlatego obecność w jamie ustnej stałych uzupełnień protetycznych, takich jak korony czy mosty, właśnie na bazie niklu, może

powodować powstawanie odczynów alergicznych uniemożliwiających dalsze użytkowanie protez (Eliades i Athanasiou, 2002). Zgodnie z dyrektywą Unii Europejskiej z powszechnego użycia wycofane mają zostać materiały zawierające w swym składzie nikiel. Dotychczas znaczna część stopów dentystycznych przeznaczonych do napalania ceramiki wytwarzana była na osnowie niklu. Obecnie na rynku dostępne są nowoczesne biostopy na osnowie kobaltu, zapewniające bezpieczeństwo stosowania dla pacjenta (Wilcoxon i Abrams, 2006; Rao i Biswas, 2009).

1.3. Przegląd stopów metali stosowanych w wykonawstwie protez stałych

1) Stopy chromo-niklowe składają się z niklu (60-82%), chromu (11-20%), molibdenu (2-9%) oraz berylu (0-2%). Stopy te są stosowane do wykonywania koron oraz mostów protetycznych licowanych ceramiką. Stopy Cr-Ni powinny zawierać przynajmniej 20% chromu, aby stop ten był odporny na korozję i tym samym był obojętny biologicznie. Chrom zwiększa odporność stopów na działanie niekorzystnych warunków panujących w jamie ustnej. Powoduje zwiększenie twardości a wraz z molibdenem zwiększa odporność chemiczną. Dzięki obecności chromu w stopie dochodzi do tworzenia tlenków powodujących zwiększenie siłę połączenia porcelany ze stopem. Nikiel zwiększa sprężystość, wytrzymałość i twardość stopów. Niestety może on powodować alergię u części pacjentów doprowadzając do niekorzystnych zjawisk dla organizmu związanych z uwalnianiem jonów do tkanek otaczających i wywołujących elektrometalowy. Dodatek berylu zwiększa siłę wiązania porcelany. Wytrzymałość na złamania, twardość oraz współczynnik sprężystości mogą ulec zmianie przez zmianę procentowej zawartości poszczególnych metali. Temperatura topnienia stopu wynosi 1350 °C, twardość wg skali Brinella wynosi 160 kG/mm², wytrzymałość na rozerwanie 60-190 kG /mm², a ciągliwość 40-60%. Dzięki specjalnym, odpowiednio dobranym narzędziom można jednak dobrze je obrabiać. Twardość tych stopów nie przekracza 200 HV₁₀ (stopień twardości stali wg skali Vickersa dla Obciążenia 10 Kgf).

2) Ze względu na fakt, że wielu ludzi jest uczulonych na nikiel, przed zastosowaniem takiego stopu należy sprawdzić, czy pacjent nie jest uczulony na ten metal.

3) Stopy chromo-kobaltowe składają się z kobaltu (55-64%), chrom (25-34%), molibden (2-9%). Stosuje się je do wykonania podbudowy pod stałe uzupełnienia protetyczne oraz elementów metalowych protez szkieletowych. Pozwala na to ich duża wytrzymałość, twardość i w szczególności sprężystość. Noszą nazwę stellitów. Nazwa

pochodzi od łacińskiego słowa „stelle”, co oznacza gwiazda. W mikrostrukturze tego stopu zauważono bowiem charakterystyczne gwiazdy o ostro zarysowanych kształtach. Kobalt odpowiada za zwiększenie twardości, wytrzymałości oraz płynności stopu. Zwiększa również odporność na działanie czynników chemicznych w jamie ustnej. Wysoka zawartość kobaltu w stopie utrudnia przeprowadzenie wyżarzania zmiękczonego. Temperatura topnienia tego stopu wynosi 1250-1500 °C. Można je odlewać w zakresie temperatur 1300-1600 °C. Twardość wynosi 300-365 kG/mm², wytrzymałość na rozciąganie 78-120 kG/mm², ciągliwość 5-12%. Siła wiązania z porcelaną jest niższa niż w przypadku stopów zawierających nikiel oraz beryl. Stopy chromo-kobaltowe odznaczają się odpornością na działanie wysokich temperatur.

4) Stopy złota. Do prac protetycznych stosuje się stopy złota o zawartości 18-22 karatów określających wagową zawartość czystego złota w stopie. Zastosowanie stopów złota o mniejszej zawartości złota doprowadza do powstania stopu o właściwościach stopów metali nieszlachetnych. Metalami, które mogą być dodawane do stopów złota są zarówno metale szlachetne tj. platyna, pallad iryd lub nieszlachetne tj. srebro miedź czy nikiel. Złoto zwiększa kowalność, ciągliwość oraz odporność na działanie czynników chemicznych. Wytrzymałość, twardość oraz temperaturę topnienia mogą zmienić takie pierwiastki jak platyna, pallad, srebro. Ponadto dodatek palladu w ilości 12% zmienia zabarwienie stopu na białe określane mianem białego złota. Ind, cyna czy żelazo tworzą tlenki odpowiedzialne za połączenie metalu z ceramiką. Stosowane są także stopy złota ze znaczną, bo 15% zawartością niklu, który podnosi sprężystość i twardość stopu- rozjaśniając jego barwę. Jest to tzw. złota stal, która może mieć zastosowanie do sporządzania łuków klamer lub szkieletów protez (Krawczyk, 2006; Begerow, 1999).

Wieloletnie doświadczenie różnych zespołów badawczych, w tym pracowników Katedry Protetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, wskazują iż poza rodzajem materiału duże znaczenie dla ewentualnej indukcji stanu zapalnego ma proces laboratoryjny wykonania korony oraz dopasowanie i zacementowanie korony (Śramkiewicz, 1998; Tejchman, 1968). Doświadczenie to wskazuje, iż podczas pracy z jakimkolwiek stopem należy bezwzględnie przestrzegać zasad opracowanych przez producenta stopu, dotyczących opracowania mechanicznego powierzchni stopu przeznaczonego do licowania ceramiką, piaskowania i oksydacji (pokrywanie tlenkami na skutek działania temperatury) oraz polerowania odsłoniętych powierzchni stopu. Tylko ścisłe przestrzeganie procedur zapewnia prawidłowe połączenie metalu i ceramiki dentystycznej (Bauer i wsp. 2012; Ucar i wsp. 2011).

1.4 Mechanizmy obronne jamy ustnej

1.4.1 Nieswoiste mechanizmy obronne

Do nieswoistych mechanizmów obronnych należą:

- ciągłość błony śluzowej i szkliwa, które stanowią fizyczną barierę i chronią przed penetracją drobnoustrojów lub ich antygenów
- złuszczenie komórek nabłonkowych a wraz z nimi przylegających bakterii
- ruchy języka i policzków oczyszczające powierzchnie zębów
- obecność fizjologicznej mikroflory zapobiegającej kolonizacji jamy ustnej przez patogenne gatunki
- działanie śliny

Podwójna funkcja obronna śliny polega na:

- stałym przepływie, przez co utrudniona jest kolonizacja przez drobnoustroje
- działaniu wielu substancji bakteriobójczych.

W trakcie połykania śliny bakterie mogą być wychwycone przez mucyny (glikoproteiny śliny o silnych właściwościach adhezyjnych) i zagregowane w większe kompleksy, łatwiejsze są do połknięcia.

Do substancji przeciwbakteryjnych zawartych w ślinie należą: lizozym, laktoferryna, apolaktoferryna, układ sialoperoksydazowy, histatyny, stateryna, bakteriocyny. Działanie jednego z najważniejszych enzymów, jakim jest lizozym polega na rozszczepianiu peptydoglikanu w ścianie komórkowej bakterii, przez co wzmacnia działanie lityczne kwaśnego odczynu śliny.

Ważnym elementem obrony przeciwbakteryjnej jest obecność komórek fagocytujących, przede wszystkim granulocytów wielojądrzastych i makrofagów.

Badania laboratoryjne wykazują, że składniki śliny wpływają na adhezję drobnoustrojów do powierzchni zębów. Białka bogate w prolinę powodują lepsze przyleganie do hydroksypapatytu szkliwa bakterii *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella loescheii* czy *P. melaninogenica*, a stateryna umożliwia adhezję *Actinomyces viscosus* (Feferskov i Kidd, 2006, Sawicki, 2009).

1.4.2 Swoiste mechanizmy obronne

Główną rolę odgrywają tu przeciwciała, dominującą immunoglobuliną występującą w ślinie jest IgA. Jej funkcja polega na zlepianiu bakterii występujących w

jamie ustnej oraz hamowaniu przylegania drobnoustrojów do komórek nabłonka i szkliwa. W warunkach fizjologicznych praktycznie niemożliwy jest stan absolutnego braku płytki bakteryjnej. Najczęściej jednak mechanizmy obronne gospodarza radzą sobie doskonale z niewielką ilością tej płytki, składającej się głównie z beztlenowców względnych, przeważnie Gram-dodatnich. Wiadomo, że płytka tworzy się głównie dzięki bakteryjnemu enzymowi – glukozylo-transferazie uwalnianemu ze *Streptococcus mutans*, a mającemu zdolności adhezyjne. Flora bakteryjna śliny zdolna jest również do wytwarzania hydrolaz glikozydowych, które rozkładają glikoproteiny śliny. Uwolnione cukry, zwiększają lepkość śliny, ułatwiają precypitację bakterii. Ilość i skład płytki bakteryjnej zależą od rodzaju diety, lokalizacji w jamie ustnej, osobniczego składu bakteryjnego śliny, warstwy odłożonej płytki, działania oczyszczającego języka, policzków oraz zabiegów higienicznych. W ciągu pierwszych dwu dni przeważają w płytce bakterie Gram-dodatnie, ale w miarę rozwoju zapalenia pojawia się coraz więcej form Gram-ujemnych (Samaranayake, 2004).

1.4.3 Mikroflora jamy ustnej

Jak oszacowano, w ludzkim organizmie zawartych jest w przybliżeniu 10^{14} komórek, z czego tylko 10% z nich stanowią komórki organizmu ludzkiego, bowiem reszta (90%) to komórki drobnoustrojów. Te mikroorganizmy stanowią stałą, rezydentną mikroflorę. Zasiedlanie organizmu człowieka przez mikroorganizmy rozpoczyna się w momencie jego narodzin lub tuż po narodzinach, a mikroflora zróżnicowana i w miarę stabilna wtedy pozostaje w równowadze z makroorganizmem (homeostaza). W jamie ustnej może występować od 300 do 500 gatunków lub rodzajów bakterii. Podstawowym czynnikiem kolonizacji tkanek twardych i miękkich jamy ustnej przez drobnoustroje i tworzeniem płytki nazębnej są zjawiska adhezji, uwarunkowane obecnością na powierzchni bakterii specyficznych struktur – tzw. adhezyn, reagujących z komplementarnymi receptorami powierzchni tkanek gospodarza. U wielu bakterii Gram-ujemnych rolę adhezyn pełnią fimbrie. Gatunki nie posiadające zdolności adhezji do tkanek wiążą się z powierzchnią innych bakterii (zjawisko koagregacji). Zewnątrzkomórkowe struktury bakteryjne zwane pęcherzykami błonowymi, mogą spełniać rolę mediatorów koagregacji. Ważną rolę w kolonizacji bakteryjnej pełnią lepkie zewnątrzkomórkowe lepkie polisacharydy, a także oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy różnoimiennie naładowanymi cząsteczkami tkanek i drobnoustrojów (Hultin i wsp. 2002).

Skład mikroflory fizjologicznej jest zróżnicowany, zależny od miejsca jamy

ustnej. Szczelina dziąsłowa wykazuje również w tym zakresie swoją specyfikę. Stężenie tlenu jest tutaj mniejsze i miejsce to jest wypełnione płynem dziąsłowym zawierającym czynniki obronne humoralne i komórkowe, białka i glikoproteiny, które są substancjami odżywczymi dla drobnoustrojów. Stwierdza się tu więcej gatunków drobnoustrojów niż w innych miejscach, ale ogólna liczba bakterii jest niższa (Mager i wsp., 2003). Chociaż szczelina dziąsłowa stanowi niewielką część środowiska jamy ustnej, bakterie kolonizujące ten obszar mogą odgrywać zasadniczą rolę w inicjowaniu i rozwoju chorób dziąseł i przyzębia.

W szczelinie dziąsłowej zdrowych osobników występują głównie bakterie Gram-dodatnie i względne beztlenowe oraz bakterie mikroaerofilne. Drobnoustroje z rodzajów *Actinomyces* i *Streptococcus* stanowią około 40% wszystkich izolowanych bakterii. Najczęściej stwierdza się obecność *Streptococcus oralis*, *Streptococcus milleri* (zwłaszcza *S. anginosus*), *Actinomyces meyeri*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Rothia dentocariosa*, *Campylobacter rectus*. W niewielkich liczbach są obecne bezwzględne beztlenowce, takie jak *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium spp.*, *Veillonellasp.*, bardzo rzadko *Porphyromonas gingivalis*. Wartość pH płynu dziąsłowego wynosi 6,9. W zależności od częstości spożywania węglowodanów, wskutek metabolizmu bakterii, pH może obniżyć się do 5,0. W takich okolicznościach bakterie kwasolubne rozmnażają się bardzo dobrze (np. pałeczki kwasu mlekowego), podczas gdy inne są eliminowane przez hamowanie kompetycyjne. Natomiast w wyniku trawienia białek jego pH wzrasta do 7,4-7,8, które sprzyja namnażaniu się jednego z głównych patogenów zapalenia przyzębia, pałeczek z gatunku *Porphyromonas gingivalis* (do Nascimento i wsp., 2011).

Aby zatem zachować prawidłowe warunki w jamie ustnej ważne jest uzyskanie prawidłowej integracji protez z tkankami własnymi zęba i przyzębia, stwarzając korzystne warunki oczyszczania tych powierzchni. Płytką nazębną, będącą w bezpośrednim kontakcie ze zdrowym dziąsłem, może już po kilku dniach doprowadzić do stanu zapalnego. Zapalenie to jest wynikiem brzeźnego, przewlekłego zapalenia nie występującego jednak tylko pod wpływem działania drobnoustrojów. Mechanizm powstawania zapalenia tłumaczony jest również inaczej: płytka wytwarza enzymy bakteryjne, które rozluźniają substancję wiążącą komórki nabłonka pokrywającego. Ze względu na wzrost przepuszczalności, części składowe płytki o wysokiej wadze molekularnej, jak np. antygeny, endotoksyny, z bakteryjnej błony lipopolisacharydowej mogą również przenikać przez nabłonek. Substancje chemotaktyczne, wytwarzane bezpośrednio w płytce lub wtórnie w podnabłonkowej tkance

łącznej, przyciągają komórki zapalne bezpośrednio do tego miejsca. Komórki te posiadają w swoich lizosomach substancje trawiące białka tkanek, przez co mogą osłabiać tkankę łączną i doprowadzać do nieodwracalnych zmian (Hannig, 1999).

1.5 Środowisko mikrobiologiczne szczeliny dziąsłowej

Dziąsło (*gingiva*) stanowi część błony śluzowej, która otacza szyjkę anatomiczną zęba oraz pokrywa wyrostek zębodołowy. Dziąsło dzieli się na dziąsło wolne (*gingiva marginalis*) oraz dziąsło właściwe (*gingiva propria*). Dziąsło wolne obejmuje część położoną odwierzchołkowo w stosunku do szyjki zęba, która graniczy ze szkliwem oraz brodawki dziąsłowe. Dziąsło przyrośnięte leży dowierzchołkowo od granicy szkliwno-cementowej i przylega do okostnej wyrostków zębodołowych (Kmieć, 2006; Zabel, 2001).

Dziąsło wolne jest to najbardziej brzeżnie przebiegające wąskie pasmo, które otacza przyszyjkową część szkliwa. Jego szerokość wynosi od 0,5 do 2,0 mm, wysokość zwiększa się z wiekiem od 1,1 mm u dzieci do 1,6 mm u osób dorosłych. Brzeg dziąsła wolnego jest oddzielony od powierzchni zęba płytkim uchyłkiem zwanym rowkiem dziąsłowym lub szczeliną dziąsłową (*sulcus gingivalis*). Szczelinę dziąsłową pokrywa nabłonek wielowarstwowy płaski nierogowaciejący. Dno szczeliny stanowi przyczep nabłonkowy lub nabłonek łączący, który stanowi niezrogowaciały nabłonek o szczególnych cechach, nazywany nabłonkiem łączącym Gottlieba. Przyczep nabłonkowy wytworzony jest przez komórki nabłonka łączącego dziąsło z powierzchnią szkliwa poprzez specjalny rodzaj błony podstawnej.

Nabłonek łączący przylega do szkliwa na długości 1-2 mm, otaczając ząb w postaci mankietu od dna szczeliny dziąsłowej do granicy szkliwno-cementowej. Jego cechą szczególną jest obecność tzw. wewnętrznej błony podstawnej, która przylega ściśle do szkliwa. Natomiast na zewnętrznej błonie podstawnej, która jest położona od strony blaszki właściwej błony śluzowej, spoczywają stale dzielące się sześcienne komórki warstwy podstawnej nabłonka łączącego (Sawicki, 2009). Nabłonek ten spoczywa na błonie podstawnej o budowie zbliżonej do błony podstawnej naskórka. Liczba warstw komórek i wynikająca z niej grubość nabłonka zależy od rejonu jamy ustnej.

Nabłonek jamy ustnej ulega stosunkowo szybkiej odnowie (całkowita wymiana komórek co 5-8 dni), kontrolowanej przez lokalnie wydzielane i obecne w ślinie czynniki wzrostu, głównie EGF i TGF α . Jego zróżnicowanie w kierunku odmiany rogowaciejącej lub nierogowaciejącej jest uzależnione od produkcji przez fibroblasty blaszki właściwej, czynnika wzrostu keratynocytów (KGF) oraz czynnika wzrostu hepatocytów (HGF), a także

od słabo jeszcze poznanych mechanizmów wzajemnych oddziaływań blaszki właściwej i nabłonka. Szybsze gojenie się uszkodzeń błony śluzowej jamy ustnej niż skóry, przy jednoczesnym ograniczeniu bliznowacenia jest związane z aktywnością czynników wzrostowych produkowanych przez nabłonek oraz z fenotypową odmiennością fibroblastów obu obszarów – fibroblasty obecne w błonie śluzowej jamy ustnej produkują mniej włókien kolagenowych i wydzielają czynniki wzrostowe. Warto zauważyć, że nabłonek łączący nie jest odporny na urazy mechaniczne, ponieważ nawet najmniejsze fizyczne naruszenie dna szczeliny dziąsłowej prowadzi do jego rozerwania (Wolf i wsp., 2006).

Tkanka łączna przylegająca do złącza nabłonkowego i do nabłonka wyściełającego szczelinę dziąsłową pełni ważną rolę w funkcjach obronnych organizmu. W warunkach zdrowia zawiera dużą liczbę granulocytów, a także limfocytów oraz komórek prezentujących antygeny (monocyty/makrofagi, komórki Langerhansa i komórki dendrytyczne), co stanowi wyraz miejscowego odczynu zapalnego o charakterze obronnym. W warunkach prawidłowych krwinki białe, a szczególnie granulocyty obojętnochłonne segmentowane, stale migrują poprzez nabłonek łączący do światła szczeliny dziąsłowej. Granulocyty opuszczają światło naczyń w obrębie splotu żylnego graniczącego z zewnętrzną błoną podstawną nabłonka łączącego, a po przeciśnięciu się przez względnie szerokie przestrzenie międzykomórkowe opuszczają nabłonek na dnie szczeliny dziąsłowej i przechodzą do światła jamy ustnej. Wykazano, że neutrofile wyznakowane trytem, radioaktywnym izotopem wodoru, po podaniu dożylnym pojawiają się po 20-30 minutach w dnie szczeliny dziąsłowej. Obliczono, że przez nabłonek do szczeliny dziąsłowej migruje około 30000 neutrofili w ciągu jednej minuty. 85 % migrujących granulocytów zdolnych jest do fagocytozy. W zdrowym dziąśle jednojądrzaste komórki krwi mogą stanowić aż 64 % objętości nabłonka. W jego obrębie wykazano silną ekspresję alfa-defensyn, naturalnych peptydów antybakteryjnych i przeciwgrzybiczych, które wytwarzane są przez neutrofile i komórki nabłonkowe. Komórki te, a także makrofagi wytwarzają interleukinę -8, silny czynnik chemotaktyczny dla granulocytów obojętnochłonnych, a także inne cytokiny prozapalne tj. IL-1 alfa, IL-1 beta oraz TNF- α (Gołąb i wsp., 2013).

Nabłonek jest obustronnie przepuszczalny dla cząsteczek mniejszych od krwinek białych. Z zewnątrz do nabłonka wnikają duże cząsteczki albumin, a także występujące w płytce nazębnej antygeny i endotoksyny bakteryjne. Szczelina dziąsłowa, a powstająca w warunkach patologicznych kieszonka dziąsłowa opłukiwana jest przez płyn przesiąkający od strony blaszki właściwej błony śluzowej dziąsła. Płyn oczyszcza szczelinę na drodze mechanicznej oraz spełnia funkcję obronną m.in. ze względu na zawarte w nim przeciwciała,

cytokiny oraz defensyny. Ilość płynu w kieszonce zwiększa się podczas działania czynników drażniących oraz w zapaleniu przyzębia (Kmieć, 2006).

1.6 Biokompatybilność stopów dentystycznych

Na odpowiedź biologiczną organizmu mają wpływ nie tylko elektrochemiczne właściwości stosowanych stopów, ale również ich powierzchnia, która może przyczyniać się do odkładania większej ilości płytki bakteryjnej. Spowodowane jest to ich wysoką energią powierzchniową. Dla przykładu można podać, że energia powierzchniowa szkliva wynosi 46,1 % dyn/cm, akrylu 41,2 dyn/cm, zaś stopu chromo-kobaltowego 1000 dyn/cm. W związku z powyższym, elementy metalowe wymagają bardziej starannego opracowania i wypolerowania niż inne elementy uzupełnień protetycznych (McGinley i wsp., 2011a). Zwiększona ilość płytki bakteryjnej może zwiększać reakcję zapalną w otaczających tkankach. Przeprowadzone doświadczenia dowodzą, że mikroorganizmy tj. *Streptococcus oralis*, *Actinomyces viscosus* i *Candida albicans* wykazują większą adhezję do stopów Cr-Co, w momencie kiedy stopy te są tylko wypiaszkowane w porównaniu z tymi samymi stopami wypiaszkowanymi i wypolerowanymi (Taylor i wsp., 1998).

W innych badaniach przeprowadzonych *in vivo*, stwierdzono że wczesne formowanie płytki bakteryjnej nie zależy od rodzaju użytego stopu, ale od miejsca jej odkładania, czyli od umiejscowienia uzupełnienia protetycznego. Większą ilość bakterii zaobserwowano po stronie policzkowej, aniżeli wewnątrzustnie (Lang, 1995). W odróżnieniu, Steinberg podaje, że różne typy bakterii mają inne właściwości adhezyjne do różnorodnych stopów (Steinberg i wsp. 1998). Poza tym duże znaczenie odgrywają indywidualne czynniki biologiczne. Zauważono, że adhezja niektórych gatunków bakterii tj. *S. mutans* zależy również od miejscowych czynników występujących w jamie ustnej. Jest również wiadome, że fizyko-chemiczne właściwości powierzchni użytego stopu, tj. hydrofobowość i potencjał zeta mają ogromne znaczenie dla adhezji niektórych bakterii np. *Streptococcus sanguis* i *Streptococcus mutans* (Satou i wsp. 1988). Potencjał oksydoredukcyjny (redoks) środowiska jest różny w obrębie jamy ustnej. Na przykład, potencjał ten po 7 dniach podczas rozwoju płytki zmniejsza się z początkowego wynoszącego + 200 mV (na wysokim stopniu utleniania) do – 141 mV (na niskim stopniu redukcji). Tak duże różnice sprzyjają rozwojowi różnych grup bakterii. Również adhezja bakteryjnego LPS uwalnianego z *E. coli* czy *Porphyromonas gingivalis* zależy od rodzaju

użytego stopu a nie od rodzaju powierzchni. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Kohal i wsp. polegającym na wykonaniu koron o normalnych wymiarach i przekonturowanych, analiza DNA wykazała, że w każdej grupie dominują takie rodzaje bakterii jak *P. intermedia*, *T. denticola* oraz *C. showae* w porównaniu z grupą kontrolną (Kohal i wsp., 2004). Jednak te same rodzaje bakterii występowały w zwiększonej ilości wokół koron przekonturowanych w porównaniu z grupą kontrolną oraz z grupą, u której wykonano korony o normalnych wymiarach (Kohal i wsp., 2004; Kancyper i Koka, 2001).

Ważnym czynnikiem w prawidłowym funkcjonowaniu przyzębia zębów pokrytych koronami protetycznymi jest rodzaj użytego materiału jak również szczegółowe i dokładne techniczne wykonanie uzupełnienia protetycznego. Wiadome jest, iż uzupełnienia protetyczne na bazie metali szlachetnych są bardziej odporne na korozję aniżeli stopy metali nieszlachetnych. Wiąże się to z większą trudnością w utlenianiu się takich pierwiastków jak złoto czy platyna. Stwierdzono również, że jony metali są systematycznie uwalniane do okolicznych tkanek krótko po zacementowaniu. W przeprowadzonych badaniach zauważono uwalnianie jonów platyny do moczu bezpośrednio po zacementowaniu oraz w trzy miesiące po oddaniu uzupełnień protetycznych (Begerow, 1999). Nie stwierdzono natomiast wzrostu stężenia jonów złota czy palladu. Stwierdzono natomiast dużą koncentrację jonów niklu i chromu w okolicy implantowanych stopów, które były systematycznie uwalniane do tkanek (Traisnel i wsp., 1990).

Ważnym czynnikiem dla prawidłowej funkcji przyzębia jest dokładne polerowanie w trakcie technicznego wykonania. Niezależnie od użytego materiału niedokładności powodować mogą drażnienie mechaniczne, zaleganie resztek pokarmowych, utrudnienie oczyszczania czy zwiększoną adhezję mikroorganizmów (McGinley i wsp., 2011b). Dowiedziono znacznych różnic w odporności na korozję i zmatowienie (przebarwienie) podstawowych stopów metali, co jest istotne przy planowaniu leczenia, w tych przypadkach, kiedy zachodzi konieczność wprowadzenia do jamy ustnej uzupełnień protetycznych wykonanych z różnych stopów metali (Hędzalek i wsp., 1998). Powszechnie uważa się, że tytan i jego stopy cechuje najwyższa odporność korozyjna w wielu środowiskach, w tym także w środowisku tkanek i płynów ustrojowych. Nadzwyczaj wysoką odporność na korozję posiadają stopy tytanu, zwłaszcza z niobem i tantalem – metalami o wysokiej, porównywalnej z tytanem, odporności korozyjnej (Starosvetsky i wsp., 2001; McMahon i wsp., 2012). Stwierdzono również, że stopy jednofazowe (jednorodne) są bardziej odporne na korozję i zmatowienie w porównaniu ze stopami wielofazowymi. Jednofazowe stopy o dużej zawartości metali szlachetnych (powyżej 75%) cechuje wysoka

odporność korozyjna, aczkolwiek i one ulegają korozji. W dziąsłach sąsiadujących z metalowymi koronami i wkładami można wykryć jony metali, nawet jony złota. Względy ekonomiczne przyczyniły się do poszukiwania stopów o niskiej zawartości metali szlachetnych. Ze zmniejszeniem się zawartości metali szlachetnych w stopach obniża się jednak ich odporność korozyjna. Opracowane i coraz powszechniej stosowane stopy o niskiej zawartości metali szlachetnych (najczęściej stopy na bazie srebra i palladu oraz miedzi i palladu) cechuje niższa odporność korozyjna od stopów o dużej zawartości metali szlachetnych. Aczkolwiek wykazano, że pallad tak jak i złoto podnosi odporność korozyjną stopów i stopy zawierające nie mniej niż 40% palladu i co najmniej 40% złota oraz stopy o zawartości 78–82% palladu, charakteryzuje wysoka, zbliżona do stopów o dużej zawartości złota (powyżej 75%), odporność korozyjna. Stopy te, wykazują niewielkie tendencje do uwalniania (w postaci jonów) złota i palladu, uwalniając głównie srebro, miedź i inne dodatki stopowe (Krawczyk 2006; Wirz i Steinemann, 1987). Względy ekonomiczne zadecydowały również o wprowadzeniu do praktyki klinicznej stopów metali nieszlachetnych (stopy Cr-Ni i Cr-Co), jako alternatywy dla stopów metali szlachetnych. Jednak stopy te, tak jak stopy na bazie srebra i palladu, ze względu na wielofazową, dendrytyczną budowę krystalitu, wykazują stosunkowo niską odporność korozyjną. Niską odporność korozyjną przypisuje się przede wszystkim stopom Cr-Ni, aczkolwiek wyniki licznych badań dowodzą znacznych różnic w odporności na korozję poszczególnych stopów Cr-Ni oraz Cr-Co i niektóre ze stopów Cr-Ni wykazują wyższą odporność korozyjną od stopów Cr-Co. Segregacja dendrytyczna, jak również rozkład na różne fazy w stopie, przyczynia się do miejscowych różnic w chemicznym składzie krystalitu, co ułatwia zmatowienie i korozję stopu przez powstawanie mikroogniw galwanicznych (Wirz i Diedrichs, 2002).

Duże ryzyko wystąpienia korozji niesie z sobą wprowadzenie do jamy ustnej uzupełnień protetycznych wykonanych z różnych stopów metali. Powstające wówczas ogniwo galwaniczne jest przyczyną korozji elektrochemicznej, której szybkość będzie zależała od różnicy potencjałów elektrodowych użytych metali. Stwierdzono duże różnice potencjałów pomiędzy, znajdującymi się w jamie ustnej uzupełnieniami ze stopów o dużej zawartości złota a amalgamatem (500 mV), czy stopami o niskiej zawartości tego metalu oraz stopami metali nieszlachetnych (200–600 mV) (Wirz i Jungo, 1996).

Metale i podstawowe stopy metali w warunkach jamy ustnej nie wykazują szkodliwego działania dopóki pozostają odpornymi na korozję. Jednak, jak już wspomniano, wyjątkowo silne właściwości korozyjne środowiska biologicznego sprawiają, że żaden z

podstawowych stopów metali nie jest w stanie oprzeć się korozji. Procesowi niszczenia korozyjnego towarzyszy przenikanie do otoczenia, odpowiedzialnych za szkodliwe działanie stopów, produktów korozji i/lub jonów metali. Jony metali, uwolnione w trakcie korozji z metalowych konstrukcji protez, dostają się do przewodu pokarmowego, gromadzą się w żołądku, wątrobie, śledzionie, nerkach, kościach i błonie śluzowej. Jony metali, uwalniane z implantów metalicznych, gromadzą się w otaczających tkankach osiągając często bardzo wysokie stężenia (np. w tkankach przylegających bezpośrednio koron Cr-Co stężenie kobaltu wzrasta 300 do 6000 razy). Po przekroczeniu krytycznego stężenia, różnego dla poszczególnych metali, występują reakcje toksyczne oraz alergiczne. Stopień szkodliwego działania metalowych konstrukcji protetycznych zależy głównie od ilości uwolnionych produktów korozji i/lub jonów metali (pozostających w bezpośrednim związku z podatnością uzupełnień na korozję, ich wielkością jak i warunkami w jakich się one znajdują – m.in. obecność innego metalu w jamie ustnej, wielkość pH) oraz od stopnia ich szkodliwego (toksycznego) działania (Majewski i wsp., 1999; Vahey i wsp., 1995).

W badaniach doświadczalnych wykazano szkodliwe działanie podstawowych stopów metali. Wyniki badań klinicznych dowiodły także szkodliwego działania konstrukcji protetycznych wykonanych z podstawowych stopów metali. W stomatologii najczęściej mamy do czynienia z miejscową toksycznością metali i ich stopów. U jednego na 300 leczonych protetycznie pacjentów, obserwuje się wystąpienie skutków ubocznych, będących reakcją na zastosowane materiały, w tym często (27%) na stopy metali. Najczęściej obserwowanymi skutkami ubocznymi są: rumień, obrzęki, hyperplazja i bóle ze strony błony śluzowej jamy ustnej, dziąseł i warg w miejscu kontaktu z uzupełnieniem protetycznym, a także suchość w jamie ustnej, zaburzenia smaku, czy przebarwienia zębów i błony śluzowej. Rzadziej występują zmiany liszajowe jak i reakcje niespecyficzne oraz odczyny skórne, a nawet martwica kości i miękkich tkanek jamy ustnej. Część metali, a przede wszystkim nikiel, chrom, kobalt czy molibden wykazuje działanie alergizujące (Raap i wsp., 2012). Uważa się, że wśród wielu stopów metali stosowanych klinicznie, stopy Cr-Ni i Cr-Co cechuje najwyższy stopień szkodliwego działania, znacznie wyższy niż stopów metali szlachetnych. Potwierdzają to również obserwacje kliniczne stanu dziąseł będących w kontakcie z koronami wykonanymi ze stopów Cr-Ni w porównaniu ze stopami metali szlachetnych. Zatem każdy z podstawowych stopów metali, przed wprowadzeniem do praktyki klinicznej, powinien przejść szczegółowe badania określające również jego właściwości biologiczne (Schmalz i Garhammer, 2002a; Geurtsen, 2002).

Tylko w oparciu o doświadczenie praktyczne można odrzucić niektóre ze stopów

metali z uwagi na ich nieprzydatność w protetyce. Rzetelna ocena stopnia szkodliwego działania stopów metali jest jednak stosunkowo trudna. Opracowywane w wielu krajach przedmiotowe normy oraz międzynarodowe specyfikacje (ISO, FDI) nie zawierały wymagań dotyczących oceny biologicznej materiałów stomatologicznych, co sprawiało, że ocenę biologiczną i kliniczną przeprowadzano często po ich wprowadzeniu do praktyki klinicznej. Biologicznej standaryzacji przeszkadza niewystarczająca wiedza na temat mechanizmów oddziaływania materiałów na tkanki, a powszechnie używane metody testów biologicznych (badania na hodowlach tkankowych, ocena reakcji tkanek zwierząt po podskórnej implantacji) dają często sprzeczne wyniki. Aczkolwiek dąży się do opracowania nowych metod badania właściwości biologicznych materiałów dentystycznych oraz krajowych i międzynarodowych norm, których celem jest określenie biologicznych wymagań stawianych materiałom dentystycznym (Reddy i wsp., 2011). W wyniku działania różnorodnych czynników na powierzchnię metali może dochodzić do ich niszczenia wskutek korozji chemicznej lub elektrochemicznej.

➤ Korozja chemiczna - to proces niszczenia struktury metali, który zachodzi pod wpływem bezpośredniego działania gazów, bądź też otoczenia niezdolnego do przewodzenia elektronów. W środowisku jamy ustnej pacjenta bezpośredni chemiczny wpływ na powierzchnię metali wywierają spożywane soki ze świeżych warzyw i owoców, jak również powstający w procesie rozkładu białek siarkowodór. Korozja chemiczna w jamie ustnej występuje często z korozją elektrochemiczną. Do powstania zjawisk tego typu konieczny jest przepływ prądu elektrycznego, który wytworzony jest wskutek powstania ogniwa galwanicznego, w którym energia chemiczna przekształcona jest na energię prądu elektrycznego. Ogniwo to może powstać w jamie ustnej w obecności wypełnień wykonanych z różnych metali. Uzupełnienia w tej sytuacji pełnią rolę elektrod, a występująca ślina pełni rolę elektrolitu. Zjawisko korozji może dotyczyć również jednego rodzaju metalu, w którym w wyniku wadliwej obróbki laboratoryjnej dochodzi do powstania niejednorodnej struktury, z której uwalniać się będą mogły jony metalu (Muller i wsp. 1990).

➤ Korozja elektrochemiczna - w środowisku jamy ustnej możliwe jest wystąpienie czterech form korozji elektrochemicznej:

A) korozja powstaje wskutek bezpośredniego kontaktu dwu różnorodnych metali bądź stopów. Może to się odbywać w dwojaki sposób: okresowo tzn. W wyniku czasowego kontaktu dwu różnorodnych wypełnień pomiędzy jednym zębem a zębem przeciwnym, lub kontakt może odbywać się w sposób ciągły, np. w przypadku dolutowania przęsła mostu

protetycznego do korony filarowej wykonanej z innego materiału,

B) występuje na skutek różnic w składzie metali na obszarze poszczególnego wypełnienia.

Polega ona na powstaniu prądów pomiędzy poszczególnymi ziarnami kryształów metali bądź stopów o różnym składzie, czego wynikiem jest pojawienie się tego rodzaju korozji,

C) obecna jest w momencie gdy struktura powierzchni nie jest jednolita. Związana jest ona z wewnętrznym naprężeniem utwardzającym metal bądź stop. Niekiedy w poszczególnych uzupełnieniach podczas czynności ich obróbki powstają utwardzające napięcia. W wyniku czego dochodzi do wystąpienia niewielkich ogniw między metalem naprężonym a nienaprężonym. Takie powierzchnie w większym stopniu narażone są na korozję,

D) czwarta forma korozji jest w przypadku, gdy metal jest narażony w jednakowym czasie na działanie dwóch różnych elektrolitów. Proces ten występuje w chwili zalegania resztek pokarmowych, które rozkładając się powodują powstanie elektrolitu, przy czym rolę drugiego elektrolitu pełni ślina. Obecne w jamie ustnej wypełnienia reagują z elektrolitem powodując wytworzenie niedużego ogniwa i wytworzony przez ogniwo prąd jest przyczyną korozji (Jacobs i wsp., 1998).

W jamie ustnej najczęściej dochodzi do powstania korozji elektrochemicznej gdy prace wykonane są z różnych stopów o różnych potencjałach elektrochemicznych. Dochodzi do powstania ogniwa galwanicznego, w którym elektrodami są elementy metalowe, a ślina elektrolitem. Wysokość napięcia tego źródła prądu zależna jest od różnicy potencjałów elektrochemicznych zastosowanych stopów. Im szlachetniejszy jest stop, tym wyższy jest jego potencjał elektrochemiczny. Stop o niższym potencjale występuje jako anoda, katodą jest natomiast stop o wyższym potencjale. Prąd przepływa od stopu mniej szlachetnego do bardziej szlachetnego. Stop mniej szlachetny ulega rozpuszczeniu podczas tego procesu i dochodzi do korozji (Yamazoe, 2010).

W szczelinie dziąsłowej zębów koronowanych, bardzo często dochodzi do redukcji lub całkowitego zatrzymania natleniania, co prowadzi do miejscowego spadku pH, powstania korozji elektrochemicznej w postaci ogniwa lokalnego i uwolnienia jonów metali do płynu kieszonki dziąsłowej (Can i wsp., 2007). Do wystąpienia ogniwa lokalnego dochodzi gdy: metal lub stop podatny jest na korozję, na powierzchni metalu występują niezwiązane tlenki, powierzchnia metalu jest uszkodzona lub zanieczyszczona oraz następuje zadziałanie elektrolitu (płyn lub gaz). Jony metali, które w wyniku działania procesów korozyjnych zostały uwolnione ze struktury stopu metalu, prowadzą – wskutek wystąpienia reakcji sprzecznych – do wzajemnego oddziaływania z tkanką żywą (Lucas i Lemons 1992; Ravnholt 1998). Uwolnione pierwiastki organizm ludzki jest w stanie usuwać

bądź też wykorzystać. Są jednak pewne wartości progowe, poniżej których nie dochodzi do wzajemnego oddziaływania. Wartości progowe są bardzo indywidualne i przekroczenie tych wartości doprowadza do niekorzystnych zjawisk. Zjawiska takie zaburzające fizjologiczne warunki funkcjonowania tkanek żywych w konsekwencji mogą być przyczyną zmian patologicznych zwanych elektrometalozami, które są jedną z postaci stomatopatii protetycznych (Urbanek-Brychczyńska i Hędzulek, 2000). Toksyczne jony metali oddziałują, w zależności od ich ilości i zróżnicowanej potencji toksycznej, na przyzębie w podobny sposób jak antygeny, enzymy i toksyny bakteryjne (Schmalz i Garhammer 2002b). Przeprowadzonych zostało wiele doświadczeń, w których badano zjawisko korozji. Stwierdzono, iż uwalnianie jonów metali zależy od wielu czynników tj. rodzaj użytego stopu, obróbki chemicznej czy termicznej, typu korozji, pH roztworu itp. Stwierdzono na przykład, iż do zwiększenia uwalniania jonów niklu dochodzi przy pH 1 lub 4, podczas gdy stopy wysokoszlachetne i szlachetne nie reagują na zmiany pH. W jamie ustnej istnieje wiele czynników zwiększających ryzyko powstania korozji tj. czynniki biologiczne, składniki pożywienia kwasy, czy enzymy produkowane przez mikroorganizmy. Korozję mogą również wzmacniać komórki fagocytarne tj. ludzkie neutrofile. Stwierdzono, iż uwalniające się jony metali mogą wywoływać przebarwienia, zapalenie języka, kątów ust, zaczerwienia, nadżerki błony śluzowej, stany zapalne dziąseł ale także przyzębia. Zauważono również, że jony metali uwolnione ze stopów przez korozję mogą penetrować do twardych tkanek (Kirkpatrick i wsp., 2002; al-Hiyasat i wsp., 2002).

W doświadczeniach przeprowadzonych na szczurach, królikach oraz świnkach morskich badano wpływ 12 stopów metali na otaczające środowisko, ich biokompatybilność oraz właściwości korozyjne. Żaden z badanych stopów nie powodował ostrego zatrucia czy efektów letalnych, kiedy zwierzęta były karmione sproszkowanymi metalami w ilości 1000 mg na dzień przez okres siedmiu dni. Znalezione natomiast znaczące zmiany w płucach, nerkach czy śledzionie w zależności od kompozycji badanych stopów. Największe zmiany tj. nekroza tkankowa, owrzodzenie i chroniczne zapalenie zauważono wtedy gdy użyte stopy zawierały duże ilości miedzi, indu czy berylu. Obserwowane zmiany występowały zazwyczaj najwyraźniej w momencie, kiedy stopy zostały wprowadzone podskórną czy domięśniowo. W szczególności bardzo wysoki poziom jonów niklu i chromu został stwierdzony w otaczających tkankach w przypadku zastosowania stopów chromo-niklowych. W badaniach *in vivo* stwierdzono, że stopy dentystyczne mogą wywoływać zmiany lokalne i systemowe, które nie mogą być przewidziane w związku ze składem stosowanych stopów. Analiza wykazała jednak, że stopy zawierające dużą ilość miedzi, indu

czy berylu mogą prowadzić do zmian tkankowych tj. zapalenie czy nawet nekroza (Ryberg i Alexier, 1990; Cooper i Harrison, 2009).

1.7 Wpływ zabiegów protetycznych na tkanki przyzębia

Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na prawidłowe funkcjonowanie tkanek przyzębia jest atraumatyczne postępowanie podczas preparacji zębów pod uzupełnienia protetyczne. Jakiegokolwiek działania stomatologiczne mogą bowiem w radykalny sposób zmienić skład flory szczeliny dziąsłowej i przesunąć równowagę w kierunku flory patogenicznej. Przyczyną takiego stanu może być:

- jednorazowe krótkotrwałe zadziaływanie czynnika szkodliwego podczas zabiegów protetycznych np. w trakcie szlifowania, pobierania wycisku, dostosowywania niedokładnej korony czy zdejmowaniu korony,
- okresowe działywanie czynnika uszkadzającego w wyniku umocowania wadliwej korony tymczasowej tj.: za długiej, za krótkiej, o zbyt grubym obrzeżu, pozostawienie materiału mocującego w szczeliny dziąsłowej,
- długotrwałe działywanie czynnika szkodliwego w wyniku zacementowania nieprawidłowej korony protetycznej za długiej, za krótkiej, o zbyt grubym obrzeżu, pozostawienie resztek cementu w szczeliny dziąsłowej, zastosowanie niewłaściwego lub źle przerobionego stopu jako podbudowy korony protetycznej (Spiechowicz 2010).

1.8 Mediators odpowiedzi immunologicznej w obrębie przyzębia i jamy ustnej

Cytokiny to glikoproteiny wydzielane głównie przez aktywowane monocyty, makrofagi, limfocyty i granulocyty, a także szereg innych komórek. Związywanie się cytokin z receptorami w błonie komórkowej prowadzi do uaktywnienia w komórce szlaków przekazywania sygnału. Niektóre cytokiny mogą działywać jednocześnie na te same komórki osiagając efekt synergistyczny, inne zaś mogą działywać antagonistycznie wobec siebie, nawzajem blokując wywierane efekty biologiczne. Liczne badania wykazały zdolność cytokin zarówno do indukowania, regulowania przebiegu i hamowania reakcji zapalnej poprzez modulację procesów gojenia i naprawy tkanek (Delves i wsp., 2006). Jony metali mogą również prowadzić do miejscowych i ogólnoustrojowych zmian w układzie immunologicznym. Produkcja mediatorów zapalenia była badana zarówno w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Badano np. uwalnianie niektórych cytokin przez stymulowane i nie stymulowane komórki krwi obwodowej (PBMCs) oraz ich żywotność i syntezy DNA po

inkubacji z jonami chromu. W zależności od zastosowanej dawki stwierdzono zmniejszoną żywotność, produkcję DNA oraz sekrecję IL-6. Te badania dowodzić mogą, że chrom jest potencjalnym supresorem systemu immunologicznego (Granchi i wsp., 1999).

Prozapalny efekt wielu metali był badany z użyciem kultur komórkowych tj. keratynocytów i fibroblastów. Wzrost ekspresji IL-6 pod wpływem takich jonów jak miedź, cynk, nikiel czy kobalt sugeruje, że mogą one stać się potencjalnymi czynnikami zapaleniotwórczymi (Schmalz i wsp. 1998). Stwierdzono, iż zaburzenia w produkcji cytokin mogą być jedną z głównych przyczyn prowadzących do rozwoju niepożądanych zmian tj. liszaja płaskiego czy niektórych procesów nowotworzenia. Mechanizm karcinogennego działania pierwiastków polega na ich wpływie na procesy enzymatyczne, strukturę i funkcję informacji genetycznej (Anhoury i wsp., 2002; Rojas i wsp., 1999). Wydaje się, że jedną z głównych ról odgrywają tu takie cytokiny jak: IL-1, IL-6 czy TNF- α . Są one produkowane nie tylko przez makrofagi, limfocyty T, ale również przez fibroblasty i keratynocyty (Gołąb i wsp., 2013).

Cytokiny prozapalne tj. IL-1, IL-6, IL-8 czy TNF- α występują w mniejszej lub większej ilości na każdym etapie rozwoju zapalenia. Odpowiedzialne są w głównej mierze za resorpcję kości, produkcję kolagenazy i prostaglandyn. Zauważono, że IL-1, TNF- α , czy lipopolisacharyd (LPS) indukują ekspresję mRNA IL-6. Wzrost poziomu IL-6 stymuluje rekrutację i aktywność osteoklastów, a tym samym uwalnianie Ca^{++} z kości i tym samym resorpcję kości, co jest szczególnie niekorzystne w obrębie wyrostków zębodołowych szczęki i żuchwy. Działanie IL-6 polega również na zahamowaniu w osteoblastach aktywności fosfatazy alkalicznej i syntezy kolagenu. Jednym z efektów działania IL-1, IL-6 jak również TNF- α , jest stymulacja produkcji prostaglandyny E_2 (PGE_2), cząsteczki promującej aktywność osteolityczną osteoklastów i cementoklastów. Obecność prostaglandyn z grupy E stwierdzono między innymi w zmianach okołowierzchołkowych, w których najprawdopodobniej powodują resorpcję kości i modulują miejscowe procesy immunologiczne (Graves i Cochran, 2003; Kono i wsp., 1991; Dongari-Bagtzoglou i Ebersole, 1998).

1.8.1 TNF- α

TNF- α czyli czynnik martwicy nowotworów alfa, zwany także kachektyną (z łac. *cachexia* - wyniszczenie) został pierwotnie opisany, jako białko zdolne do zabijania komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* oraz powodujące martwicę krwotoczną

guzów wszczepionych zwierzętom doświadczalnym. TNF- α zbudowany jest z 3 identycznych łańcuchów polipeptydowych połączonych niekowalencyjnie, dlatego nazywamy je homotrimerami. Prekursor TNF- α syntetyzowany jest, jako białko transbłonowe o masie cząsteczkowej 26 kDa, a następnie w wyniku działania metaloproteinaz, uwalniany jest do wolnej formy o masie cząsteczkowej 17 kDa. Zarówno forma wolna, jak i transbłonowa TNF- α mają budowę homotrimerów. TNF- α przyjmuje również budowę trimeru, jednak jej forma wolna ma budowę α stąd nazwa LT- α -homotrimeru. Składa się z on z 3 identycznych łańcuchów α , natomiast forma transbłonowa może się składać z 2 łańcuchów α i 2 łańcuchów β (LT-b) (Korobowicz, 2006).

TNF- α jest jedną z ważniejszych cytokin odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Bierze udział w przekazywaniu sygnałów pomiędzy komórkami zaangażowanymi w odpowiedź immunologiczną, a innymi komórkami, w zjawisku apoptozy, w metabolizmie komórkowym, reakcjach zapalnych i fibrynolitycznych. Głównym źródłem TNF- α są aktywowane makrofagi, ale jest on wytwarzany także przez inne komórki takie jak limfocyty T i B, komórki Panetha i komórki tuczne. TNF- α jest jednym z kluczowych mediatorów zapalenia i szoku septycznego, a wysoki jego poziom jest związany z nasileniem odpowiedzi zapalnej (Hajeer i Hutchinson, 2000). Najsilniejszym bodźcem do wytwarzania TNF- α jest lipopolisacharyd (LPS) stanowiący główny składnik ścian bakterii Gram ujemnych. W mniejszym stopniu wytwarzanie tej cytokiny przez makrofagi pobudza IL-1 oraz sam TNF- α . Czynniki te wpływają na zwiększoną migrację neutrofili i monocytów przez ściany naczyń, m. in. poprzez stymulację ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1, ELAM-1 i VCAM-1, które uczestniczą w przyłączaniu molekuł adhezyjnych neutrofili i monocytów. TNF- α indukuje też lokalną syntezę IL-8, która decyduje o zwiększonej migracji komórek zapalnych przez ściany naczyń (McCormack i wsp., 2001). Ważną funkcją TNF- α jest indukowanie ekspresji na komórkach cząsteczek MHC II. Jednakże wpływ TNF- α na układ odpornościowy nie jest jednoznacznie aktywujący, bowiem stwierdzono, że w wyniku wielokrotnego podawania TNF- α może dojść do supresji odpowiedzi komórkowej i osłabienia aktywności komórek NK. TNF- α zmniejsza zawartość trójglicerydów w tkance tłuszczowej obniżając lipogenezę i indukując lipolizę, a także przejawia aktywność przeciwnowotworową w stosunku do niektórych typów komórek (Choi i wsp., 2012). TNF- α wraz z innymi, także indukowanymi przez siebie cytokinami, w sposób endo-, para- i autokrynowy oddziałuje na monocyty, makrofagi, fibroblasty, neutrofile, keratynocyty oraz komórki tuczne. Przede wszystkim powoduje martwicę krwotoczną nowotworów litych. Nie tylko uszkadza śródbłonek naczyń

nowotworu, ale również wpływa na wzrost, różnicowanie i czynność wielu komórek, zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych. Aktywuje komórki NK, zwiększa fagocytność neutrofili, wzmacnia proliferację i różnicowanie limfocytów T i B, indukuje syntezę IL-1 i zwiększa jej ekspresję na powierzchni komórek nabłonkowych (Gołąb i wsp., 2013). Ponadto TNF- α zwiększa zdolność komórek śródbłonna do adhezji limfocytów, stymuluje wzrost fibroblastów i reguluje syntezę kolagenu, fibronektyny i kwasu hialuronowego. Indukuje wytwarzanie kolagenaz i innych proteaz oraz aktywuje osteoklastogenezę, dojrzewanie osteoklastów i resorpcję kości. Jest miejscowym moderatorem przebudowy kości w stanach zapalnych TNF- α jest jedną z głównych cytokin odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Cytokina ta inicjuje proces zapalny i uruchamia mechanizm prowadzący do destrukcji tkanek przyzębia. Z licznych badań tych wynika, że TNF- α pełni funkcję „cytokiny alarmowej” i koordynatora odpowiedzi cytokinowej po zadziałaniu czynnika infekcyjnego. Poprzez indukcję chemokin i cząsteczek adhezyjnych, TNF- α prowadzi do szybkiej odpowiedzi immunologicznej i migracji leukocytów do szczeliny dziąsłowej, a poprzez stymulację i ekspresję fibroblastów i osteoklastów, dochodzi do degradacji ości i tkanki kostnej przyzębia (Zabel 2001).

1.8.2 Interleukina 8

IL-8 wydzielana głównie przez monocyty, limfocyty i granulocyty (Ajuebor i Swain 2002). Jej produkcję wzmagają IL-1 i TNF- α . Odgrywa ważną rolę w przebiegu ostrej fazy zapalenia przez silny efekt chemotaktyczny w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych, zasadochłonnych, kwasochłonnych i limfocytów T. Jej najważniejszą rolą w stosunku do neutrofili jest przyciąganie ich do miejsca zapalenia i pobudzanie ich właściwości bakteriobójczych. IL-8 stymuluje krążenie limfocytów T przez śródbłonek naczyń, indukuje uwolnienie przez bazofile niektórych mediatorów reakcji anafilaktycznej np. histaminy. Poza tym działa na inne komórki poza układem immunologicznym np. pobudza proliferację keratynocytów (Gołąb i wsp., 2013). IL-8 posiada dwa receptory A i B. Receptor A znajduje się na granulocytach obojętnochłonnych i jest specyficzny dla IL-8. Receptor B znajduje się na monocytach i komórkach T, i mogą się do niego przyłączać także inne chemokiny. IL-8 jest chemokiną prozapalną biorącą udział w wielu procesach patologicznych. Jej chemotaktyczne właściwości względem neutrofili i bazofili powodują, że jest ona cytokiną biorącą udział w procesach alergicznych. Zdolności IL-8 do przyciągania do naskórka różnych populacji leukocytów sprawia, iż cytokina ta ma duże

znaczenie w chorobach skóry. Odgrywa istotną rolę w patogenezie łuszczycy i alergicznym zapaleniu skóry. IL-8 jest również współodpowiedzialna za powstawanie niektórych chorób autoimmunizacyjnych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów (Baggiolini i Clark-Lewis, 1992).

1.8.3 Interferon gamma

Interferony są wytwarzane i uwalniane głównie w odpowiedzi na zakażenia wirusowe i oddziaływujące na inne komórki indukują powstawanie czynników przeciwwirusowych. Wyróżnia się pięć różnych rodzajów IFN: α , β , γ , κ , ω . Interferony to składające się ze 143–146 aminokwasów cytokiny produkowane przez leukocyty (IFN- α), fibroblasty (IFN- β) lub limfocyty T (IFN- γ) po pobudzeniu przez wirusy, określone antygeny bakteryjne czy pierwotniakowe, a także mitogeny lub syntetyczne polimery. Te mediatory zapalenia znalazły zastosowanie w leczeniu przewlekłych chorób wirusowych (wirusowe zapalenie wątroby typu B, typu C, typu D, zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego narządów płciowych), a także wybranych nowotworów, m.in. czerniaka złośliwego, szpiczaka mnogiego, przewlekłej białaczki szpikowej. Interferony nie mają bezpośredniego działania przeciwwirusowego, uruchamiają one w komórce szereg enzymów umożliwiających degradację materiału genetycznego wirusa, wywołując tzw. stan przeciwwirusowy. Natomiast ich działanie przeciwnowotworowe wynika m.in. z silnego pobudzenia syntezy antygenów charakterystycznych dla nowotworu i obecnych na jego komórkach, co czyni je bardziej rozpoznawalnymi i wrażliwymi na atak mechanizmów immunologicznych. Wzmoczona fagocytoza, stymulacja makrofagów, zwiększona cytotoksyczność limfocytów T, komórek NK czy indukcja ekspresji innych cytokin, takich jak IL-1, IL-6, TNF- α , to przykłady wpływu interferonów na układ odpornościowy (Gołąb i wsp., 2013).

Spośród interferonów najbardziej aktywny biologicznie okazał się IFN- γ . Jest on produkowany głównie przez aktywowane komórki NK i limfocyty T, a jego receptory znajdują się na wszystkich komórkach ciała. Wzmoczona ekspresja IFN- γ charakterystyczna jest dla odpowiedzi komórkowej (Matikainen i wsp., 2001). IFN- γ wywiera wielokierunkowy wpływ na układ odpornościowy tj. wzmacnia cytotoksyczność limfocytów T i komórek NK, aktywuje makrofagi, które nabywają między innymi właściwości cytotoksycznych oraz indukuje ekspresję innych cytokin tj. IL-1, IL-6 i TNF- α (Gołąb i wsp., 2013). Dodatkowo wzmacnia ekspresję cząsteczek MHC klasy I i II, na komórkach

docelowych, przez co nasila prezentację antygenów limfocytom T, co sprzyja odpowiedzi przeciwnowotworowej, ale także ze względu na swe działanie antyproliferacyjne jest inhibitorem krwiotworzenia (Li i He, 2004).

Rola cytokin przeciwzapalnych i immunoregulacyjnych

Cytokiny przeciwzapalne i immunoregulacyjne biorą udział w wielu procesach związanych z różnicowaniem się i aktywacją komórek immunokompetentnych.

1.8.4 Interleukina 10

IL-10 jest cytokiną o szerokiej aktywności immunoregulacyjnej, która jest kluczowa dla różnicowania się limfocytów typu Th2. Produkowana jest głównie przez pobudzone limfocyty T, limfocyty B, monocyty, makrofagi i keratynocyty. Jej główne funkcje to blokowanie sekrecji cytokin prozapalnych przez Th1, szczególnie IFN gamma, IL-2, IL-3 oraz wywieranie wpływu na różnicowanie i proliferację limfocytów T, B, komórek NK oraz komórek prezentujących antygen. Poza tym, poznane jest jej hamujące działanie na produkcję cytokin, szczególnie IL-12, IL-6, IL-8 i TNF- α przez monocyty i makrofagi. Dodatkowo, IL-10 hamuje wytwarzanie reaktywnych związków tlenowych i tlenku azotu przez makrofagi (Gołąb i wsp., 2013). Aktywność immunoregulacyjna IL-10 polega na jednoczesnym hamowaniu syntezy cytokin i prezentacji antygeny. To działanie spowodowane jest hamowaniem przez IL-10 ekspresji cząsteczek MHC klasy II na monocytach. Poza tym, cytokina ta wzmacnia ekspresję kilku cytokin przeciwzapalnych np. stymuluje wytwarzanie antagonisty receptora dla IL-1 oraz rozpuszczalnego receptora dla TNF- α . Wraz z IL-4 i IL-9 stymuluje proliferację i różnicowanie komórek tucznych oraz współdziała w regulacji krwiotworzenia (Kim i wsp., 2000).

1.8.5 Interleukina 12

IL-12 jest jedną z głównych cytokin odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi w odpowiedzi typu Th1 oraz Th2. Wytwarzana jest głównie przez makrofagi i komórki dendrytyczne. Wytwarzają ją również keratynocyty. Jej wydzielanie pobudzają przede wszystkim składniki ścian komórkowych bakterii i bezpośredni kontakt limfocytów TH1 z komórkami prezentującymi antygen. IL-12 stymuluje proliferację, aktywację i cytotoksyczność limfocytów T i komórek NK, a także indukuje powstawanie limfocytów

Th1 oraz wpływa na ich aktywność i proliferację (Gołąb i wsp., 2013). Biologicznie aktywna IL-12 jest heterodimerem składającym się z dwóch różnych podjednostek: p35 i p40. Udowodniono, że IL-12 wspólnie z innymi cytokinami np. IL-18, stymuluje wytwarzanie IFN- γ i cytokin prozapalnych, przez co staje się ważnym mediatorem odpowiedzi immunologicznej w chorobach infekcyjnych. Z drugiej strony wytwarzanie IL-12 jest regulowane przez IL-4 i IL-10. W ostatnich latach stwierdzono, że IL-12 pełni krytyczną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej w różnych modelach chorób autoimmunologicznych (Adorini 1999; McGinley i wsp., 2011b).

2 CELE PRACY

Wiedza o wpływie stopów dentystycznych i metali wchodzących w ich skład na mikrośrodowisko tkanek przyzębia zębów pokrytych koronami metalowo-ceramicznymi jest ciągle niedostateczna. Podjęte badania miały na celu:

1. Zbadanie wpływu koron metalowo-ceramicznych wykonanych z 4 różnych stopów metali na środowisko immunologiczne i mikrobiologiczne w obrębie szczeliny dziąsłowej.
2. Ocenę wpływu jonów Au, Ni, Co i Cr na odpowiedź immunologiczną ludzkich keratynocytów w warunkach *in vitro*.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 Charakterystyka pacjentów

Badaniom poddanych zostało 65 pacjentów w wieku 30-55 lat (średni wiek: $42,5 \pm 8,4$ lata), u których wykonano ze wskazań estetycznych łącznie 95 pojedynczych koron protetycznych metalowo-porcelanowych, z czego 40 koron wykonanych na podbudowie ze stopu chromo-niklowego, 30 stopu chromo-kobaltowego oraz 25 ze stopu złota. Do licowania koron użyto jednego rodzaju materiału ceramicznego.

Tabela 1. Charakterystyka ogólna osób badanych.

Liczba pacjentów (n)	65
Kobiety/mężczyźni	31/34
Średni wiek (lata, średni błąd, zakres)	42,5 $\pm$ 8,43 30-55
Stan zdrowia - osoby zdrowe - chorzy na nadciśnienie - chorzy na cukrzycę typu II	49 12 4
Łączna liczba koron na zębach własnych	95
Liczba koron na zębach ze stopów Cr-Ni	40
Liczba koron na zębach ze stopów Cr-Co	35
Liczba koron na zębach ze stopów Au	25
Kryterium oszlifowania	Ze stopniem Bez stopnia

Do wykonania podbudowy metalowej użyto stopów:

- Cr-Ni (VeraBond II) o składzie Ni 75,55%, Cr 11,50%, Mo 3,50%, Al 2,25%, Ti 0,45%, Nb 4,25%, Si 3,50%;
- Cr-Co (Wirobond) o składzie Co 61,0%, Cr 26,0%, Mo 6,0%, Wo 5,0%, Si 1,0%, Cer 0,5%;
- Au (Degudent H) o składzie Au 84,4%, Pt 8,0%, Pd 5,0%, In 2,5%, Ta 0,1%.

Do licowania koron użyto porcelany Hera Ceram (Heraus). Korony protetyczne zostały zacementowane na cement Ketac Cem radiopaque (3M ESPE).

Pacjenci poddani badaniom, zarówno kobiety i mężczyźni, byli ogólnie zdrowi, 12 pacjentów leczyło się na nadciśnienie, które było uregulowane, 4 osoby miały uregulowaną cukrzycę typu II. Wszyscy pacjenci mieli zdrową jamę ustną, uzębienie bez

czynnych ognisk próchnicy, zdrowe przyzębie. Szczeliny dziąsłowe zębów filarowych miały głębokość do 2 mm, nie zawierały wysięku. Pacjenci nie użytkowali wcześniej żadnych uzupełnień protetycznych.

Wszyscy pacjenci zostali poinformowani o istocie badań oraz wyrazili na nie ustną i pisemną zgodę. Na przeprowadzenie badań u pacjentów uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Gdańsku (aktualnie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego).

Przed rozpoczęciem leczenia protetycznego pacjenci byli badani ogólnostomatologicznie z uwzględnieniem *oceny stanu higienicznego jamy ustnej* wg wskaźników Gingival Index (GI) oraz Plaque Index (PII) (według Silness i Loe).

W sytuacji kiedy stan higieny był niezadawalający, tzn. jeżeli wskaźnik GI lub PII był większy niż 0.1 wykonywano zabiegi higienizacyjne, przeprowadzono instruktaż higieny jamy ustnej i na następnej wizycie ponownie oceniono stan higieny i stan kliniczny dziąseł. W przypadku prawidłowego stanu higieny pobierano płyn do badań ze szczeliny dziąsłowej i przystępowano do szlifowania zęba i wykonania korony.

Zęby szlifowano zgodnie z obowiązującymi zasadami nie uszkadzając przyzębia brzeżnego. Po oszlifowaniu zębów i wykonaniu wycisków pod korony metalowo ceramiczne zęby zabezpieczano koronami tymczasowymi wykonanymi materiałem Omnitemp (firmy Omnident) umocowanymi za pomocą cementu tymczasowego.

Ocena stanu higieny jamy ustnej

Ocena stanu tkanek przyzębia zębów filarowych i stanowiących grupę kontrolną objętych badaniem przeprowadzona została przy użyciu wskaźników Gingival Index (GI). Ocena higieny przy użyciu wskaźnika Plaque Index (PII) (według Silness i Loe). Grupę kontrolną stanowiły zęby pacjentów przed oszlifowaniem.

Wskaźnik GI (Gingival Index)

Wskaźnik GI (Gingival Index wg Silness i Loe) umożliwia jakościową ocenę stanu dziąsła uzyskaną badaniem dziąsła otaczającego każdy ząb na czterech powierzchniach zęba - powierzchni policzkowej, podniebiennej (językowej) oraz stycznej bliższej i stycznej dalszej. Wskaźnik dziąsłowy GI dla danego zęba jest średnią wartości otrzymanych z badanych powierzchni (Lange D. 1996).

Stan dziąseł oceniano wg kryteriów klinicznych zmian jakościowych w tkance miękkiej dziąsła:

- 0 - brak patologicznej zmiany zabarwienia dziąsła (kolor bladoróżowy),
- 1 - łagodne zapalenie dziąsła - niewielka zmiana w zabarwieniu dziąsła, brak krwawienia przy zgłębnikowaniu;
- 2 - umiarkowane zapalenie dziąsła - zaczerwienienie, obrzęk, krwawienie przy ucisku lub zgłębnikowaniu;
- 3 - ciężkie zapalenie dziąsła - znaczne zaczerwienienie, obrzęk, owrzodzenie, skłonność do samoistnego krwawienia.

Przyjęto odpowiednie zakresy wartości wskaźnika Gingival Index:

- GI=0 - dziąsła klinicznie bez zmian
- GI=0,1-1,0 - łagodne zapalenie dziąseł
- GI=1,1-2,0 - umiarkowane zapalenie dziąseł
- GI=2,1-3,0 - ciężkie zapalenie dziąseł

Wskaźnik PII (Plaque Index)

Stan higieny jamy ustnej oceniano w odniesieniu do zębów objętych badaniem oraz zębów kontrolnych przy użyciu wskaźnika PII (Plaque Index wg Silness i Loe). Badanie ilości miękkich złogów nazębnych umiejscowionych w okolicy szyjki zęba filarowego odnoszono do czterech powierzchni zęba: policzkowej, podniebiennej (językowej), stycznej bliższej i stycznej dalszej. Wskaźnik płytki bakteryjnej PII jest średnią wartości otrzymanych dla danego zęba. Do oceny płytki bakteryjnej przyjęto następujące kryteria:

- 0 - brak płytki bakteryjnej,
- 1 - cienka warstwa płytki bakteryjnej przylegająca do brzegu dziąsłowego i szyjki zęba stwierdzona sondą, ale niewidzialna gołym okiem,
- 2 - umiarkowane nagromadzenie płytki bakteryjnej na brzegu dziąsła i/lub szyjce zęba oraz w szczelinie dziąsłowej widoczne gołym okiem,
- 3 - obfite, miękkie złogi wewnątrz kieszonki dziąsłowej, na brzegu dziąsła i na powierzchni korony zęba.

Stan higieny jamy ustnej oceniano, obliczając odsetek zębów z higieną bardzo dobrą, dobrą, dostateczną i niedostateczną, w tym celu posłużono się następującymi zakresami wartości wskaźnika Plaque Index:

- PII = 0 - brak płytki - higiena bardzo dobra,
- PII = 0,1-1,0 - higiena dobra,
- PII = 1,1-2,0 - higiena dostateczna,

PII = 2,1-3,0 - higiena niedostateczna.

Na wstępnej wizycie stwierdzono, że wskaźnik GI u 23 pacjentów wynosił 0, u 42 był w granicach 0,1 - 1,0, natomiast wartość wskaźnika PII u 23 pacjentów wynosiła 0, u 34 była w granicach 0,1 - 1,0 a u 8 pacjentów w granicach 1,1 – 2,0. U pacjentów ze wskaźnikami GI i PII $\geq 0,1$ wykonano higienizację jamy ustnej, przeprowadzono instruktaż higieny jamy ustnej, odroczone pobranie płynu ze szczeliny dziąsłowej i wykonanie koron i wyznaczono wizytę kontrolną za 7 dni. Po tygodniu ponownie określono oba wskaźniki i po stwierdzeniu u wszystkich tych pacjentów zerową wartość obu wskaźników przystąpiono do pobrania płynu ze szczeliny dziąsłowej i wykonania koron.

Pobranie płynu ze szczeliny dziąsłowej

Do badań immunologicznych płyn ze szczeliny dziąsłowej pobierano za pomocą jałowych pasków filtracyjnych (Periopaper Strips, USA), zaś do badań mikrobiologicznych za pomocą jałowych ćwieków endodontycznych.

A/ Płyn ze szczeliny zębowej zęba filarowego pobierano trzykrotnie w celu oznaczenia stężenia cytokin:

Przed rozpoczęciem procedury protetycznej, po ocenie miejscowego stanu przyzębia i higieny jamy ustnej. Dla każdego pacjenta dane uzyskane przed oszlifowaniem zębów określano w rozdziale „Wyniki” jako wartości kontrolne, a zestawienie wyników dla wszystkich badanych określano jako grupę kontrolną („kontrola”).

2. Po 1 tygodniu od zacementowania korony. Przed pobraniem materiału dokonywano oceny stanu przyzębia i higieny jamy ustnej. Zespół takich danych określono w rozdziale „Wyniki” jako **grupę T1** (a na wykresach jako „prim”).
3. Po 6 miesiącach od zacementowania koron, wg powyższej procedury. Dane opisano w rozdziale „Wyniki” jako **grupę T2** (a na wykresach jako „bis”).

B/ Płyn ze szczeliny zębowej zęba filarowego w celu oznaczenia środowiska mikrobiologicznego: pobierano dwukrotnie:

1. Przed rozpoczęciem procedury protetycznej, po ocenie miejscowego stanu przyzębia i higieny jamy ustnej (grupa kontrolna, „kontrola”).
2. Po 6 miesiącach od zacementowania koron wg opisanej powyższej procedury.

Badania in vitro

Wpływ jonów Au, Cr, Co i Ni na morfologię keratynocytów badano na izolowanych komórkach nabłonka błony śluzowej jamy ustnej. Komórki pochodziły od zdrowych pacjentów odpowiadającym wiekowo grupie badanej (n=8), poddanych rutynowym zabiegom chirurgicznym, usunięcia trzecich zębów trzonowych. Błona śluzowa tych pacjentów była zdrowa, bez zmian patologicznych, bez cech stanu zapalnego.

3.2 Materiały do hodowli komórkowej

3.2.1 Aparatura

Aparat fotograficzny cyfrowy (Canon, Japonia), Power Shot A95

Inkubator z regulowanym przepływem dwutlenku węgla (Nuaire, USA)

Cytometr przepływowy LSRII (Becton Dickison) wyposażony w lasery emitujące światło o długości fali 355 nm (UV), 488 nm, 633 nm

Komora laminarna klasy II (Kendro HS12, Niemcy)

Komora Fuchsa-Rosenthala do liczenia komórek (Marienfeld, Niemcy)

Mikroskop świetlny odwrócony z kontrastem fazowym z łącznikiem do aparatu cyfrowego (Opta-Tech)

Pipety zmiennopojemnościowe (Medlab Products, Polska)

Waga elektroniczna (Rad WAG)

Wirówki: Sigma 4K15, 3K15, Eppendorf 5810R

Vortex (IKA, Niemcy)

3.2.2 Odczynniki do hodowli komórkowej

Trypsyna (0,5g/l oraz 0,2g/l EDTA w roztworze Hanksa z dodatkiem czerwieni fenolowej), (nr kat. T3924, Sigma, Niemcy)

PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanem) bez wapnia i magnezu, (nr kat. D8537, Sigma, Niemcy)

Roztwór penicyliny i streptomycyny (50x) (nr kat. P4458, Sigma, Niemcy)

Dyspaza II (nr kat. 17105-041, Gibco, Niemcy)

3.2.3 Suplementy hodowli komórkowej

Bydłęca surowica płodowa (FBS) – (nr kat. 10099133, Invitrogen USA)

Antybiotyki – penicylina ze streptomycyną – (Sigma, Niemcy)

3.2.4 Podłoże hodowlane dla komórek

Podłoże podstawowe KBM-2 (nr kat. CC3103, Clonetics, USA).

Zestaw czynników wzrostu KGM-2 („SingleQuot KIT”) nr kat. CC4152, zawierający ludzki rekombinowany, naskórkowy czynnik wzrostu (10 ng/ml), ekstrakt z przysadki bydłowej (0,4% v/v), insulina (5 µg/ml), hydrokortyzon (0,5µg/ml), transferyna (5 µg/ml), gentamycyna/amfoterycyna B (50 µg/ml) – wszystkie z firmy Clonetics, USA.

3.2.5 Związki badanych metali użytych do hodowli z keratynocytami

Chlorowodorek złota ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, POCh, Gliwice, Polska)

Chlorek kobaltu ($\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, POCh, Gliwice, Polska),

Chlorek niklu ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, POCh, Gliwice, Polska),

Chlorek chromu ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, POCh, Gliwice, Polska).

3.2.6 Sprzęt laboratoryjny

Butelki hodowlane o powierzchni 75 cm² lub 25 cm² (Sarstadt, Niemcy)

Płytki 12-dółkowe (Sarstadt, Niemcy)

Sterylnie pojemniki typu Corning o pojemności 15 i 50 ml

Probówki do cytometru o pojemności 5 ml (Sarstadt, Niemcy)

Sterylnie szalki Petriego o średnicy 6 cm (Sarstadt, Niemcy)

Zdrapywaczki, końcówki do pipet automatycznych

Pipety transferowe 3 ml, 10 ml (Sarstadt, Niemcy)

FILtry 0,22 µm (Falcon BD, Niemcy)

3.2.7 Oprogramowanie

Statistica 10,3 (Statsoft, Tulsa, OK, USA)

WinMdi

FACSDiva Software (Becton Dickinson, USA)

3.3 Metody

3.3.1 Oznaczanie zawartości cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej

Do badań immunologicznych płyn ze szczeliny dziąsłowej został pobrany na specjalne jałowe paski filtracyjne (Periopaper Strips, USA). Celem ekstrakcji cytokin, paski umieszczono w 0,5 ml roztworu NaCl na 24 h. Następnie próbki odwirowano i zamrożono w -80 °C do czasu wykonania oznaczeń.

Oznaczanie ilości cytokin przeprowadzono w Zakładzie Histologii GUMed przy użyciu cytometru przepływowego LSR II (Beckton-Dickinson, USA). Badanie polegało na pomiarze ilościowym pięciu cytokin: IFN- γ , IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α , z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów do oznaczania cytokin (Flex-Set, BD, USA).

3.3.2 Izolacja enzymatyczna keratynocytów

Fragmenty niez zmienionej zapalnie błony śluzowej pobierane były przez lekarza prowadzącego rutynowy zabieg chirurgiczny dłutowania zatrzymanych zębów ósmych dolnych, następnie umieszczane w roztworze PBS, zawierającym penicylinę (400 U/ml) oraz streptomycynę (400 μ g/ml) i przenoszone do lodówki (4 °C). W tym roztworze błona śluzowa transportowana była do laboratorium. Dalsze etapy izolacji odbywały się w warunkach aseptycznych w komorze laminarnej. Przed procedurą izolacji bonę śluzową inkubowano w 70% etanolu przez okres nie dłuższy niż 10 sekund. Zapewniało to brak kontaminacji ze strony bakterii i grzybów w trakcie hodowli, a jednocześnie nie obniżało przeżywalności komórek. Błonę śluzową następnie płukano (PBS) i inkubowano przez noc (4°C) w roztworze uprzednio przefiltrowanej dyspazy II (2,0 U/ml). Kolejnym etapem było mechaniczne oddzielenie samego nabłonka od tkanki łącznej. Nabłonek następnie umieszczany był w roztworze trypsyny/EDTA na 30 min. w temp. 37°C, po tym czasie komórki przechodzące do roztworu trypsyny były zbierane (pipetą) i przenoszone do pożywki zawierającej 10% surowicę bydlęcą. Kolejno komórki były odwirowywane (1500 obr/min), a pożywka z trypsyną zlewana. Komórki natomiast zawieszane były w odpowiedniej objętości pożywki, intensywnie rozdzielane przez wielokrotne pipetowanie oraz zliczane pod mikroskopem odwróconym. Dodatkowo każdorazowo badano przeżywalność komórek przy zastosowaniu roztworu błękitu trypanu (0,4%) oraz komory Fuchsa-Rosenthala (obliczanie gęstości komórek).

3.3.3 Hodowla keratynocytów

Komórki do doświadczeń hodowane były w pożywce podstawowej (KBM, Clenetics, nr kat. CC-3107), która zawierała dodatkowo zestaw czynników wzrostu (KGM): ludzki rekombinowany naskórkowy czynnik wzrostu (10 ng/ml), ekstrakt z przysadki bydlęcej (0,4% v/v), hydrokortyzon (0,5 µg/ml), transferyna (5 µg/ml), insulina (5 µg/ml), gentamycyna oraz amfoterycyna B (50 µg/ml). Czynniki wzrostu przechowywano w temp. - 20⁰C. Gotowa do użycia pożywka KBM łącznie z KGM przygotowywana była każdorazowo w objętości 50 ml i przechowywana w temp. 4⁰C nie dłużej niż 7 dni. W przypadku komórek hodowanych przez pierwsze 24 godz. (bezpośrednio po izolacji) stosowano pożywkę zawierającą 10% płodową surowicę bydlęcą (nr kat. 10099133, Invitrogen, USA). Pożywka zmieniana była co drugi dzień. Hodowla komórek monitorowana była codziennie za pomocą mikroskopu odwróconego z kontrastem fazowym.

3.3.4 Pasażowanie komórek

Pierwszy pasaż komórek odbywał się w hodowli pierwotnej po uzyskaniu przez komórki pokrycia powierzchni szalki (konfluencji) około 30-40% i prowadzony był w celu namnożenia keratynocytów. Pasaż polegał na usunięciu pożywki z szalki lub butelki, następnie komórki przepłukiwano roztworem PBS (o temperaturze 37⁰C), po czym komórki inkubowano w roztworze trypsyny (0,05%) z dodatkiem EDTA (0,02%) przez 20 min. w temp. 37⁰C. Komórki będące w zawiesinie były następnie pipetowane kilkakrotnie i przenoszone do pożywki zawierającej 10% surowicę (neutralizacja trypsyny). Komórki w dalszym etapie były odwirowywane (1500 obr/min), pożywka usuwana, natomiast komórki „rozpipetowywane”, liczone i przenoszone do naczynia hodowlanego w liczbie 2,5X10⁴ żywych komórek/cm². Po 24 godzinach hodowli pożywka (z surowicą) była usuwana łącznie z komórkami, które nie przylegały do podłoża i zastępowana nowym medium (KGM). Kolejne pasaże wykonywane były (wg opisanej procedury) po osiągnięciu przez komórki konfluencji 80-90%.

3.3.5 Ocena wpływu wybranych jonów na morfologię hodowanych keratynocytów

Do doświadczeń wykorzystywano komórki po pierwszym pasażu, które osiągnęły 60-70% konfluencji. Komórki hodowano na płytkach 12-dołkowych w opisanych wyżej warunkach. Stymulacja odbywała się poprzez dodawanie do medium hodowlanego roztworu PBS w objętości 10 µl, zawierającego odpowiednie stężenie wybranego jonu. Po 48 godzinnej hodowli w tak przygotowanych warunkach, supernatant znad komórek (1,0 ml)

przenoszony był do probówek i przechowywany w temperaturze -70°C do czasu analizy ilości cytokin. Na podstawie danych literaturowych wybrano niżej wymienione stężenia jonów do doświadczeń: Au – $20\mu\text{M}$ (w formie $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Co – $100\mu\text{M}$ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Ni – $100\mu\text{M}$ ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Cr – $200\mu\text{M}$ ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

3.3.6 Oznaczanie stężenia cytokin metodą Flex Set

Do określenia stężenia wybranych cytokin (IFN gamma, IL-10, IL-8, TNF- α , IL-12p70) w supernatantach (nadsączach) hodowli komórkowych, wybrano metodę Flex Set (Becton Dickinson, USA), opartą na technice cytometrii przepływowej. Metoda ta pozwala na jednoczesne określenie stężenia wielu białek rozpuszczalnych w badanym roztworze. Stężenie to odpowiada fluorescencji fluorochromu związanego z przeciwciałem, skierowanym przeciw danej cytokinie. Pierwszy etap procedury polegał na przygotowaniu seryjnych rozcieńczeń badanych cytokin, w celu wykreślenia krzywej wzorcowej. Rozcieńczenia te odpowiadały stężeniom od 2500 pg/ml do 10 pg/ml dla badanej cytokiny. Następnie wybarwiano próbki badane oraz próbki wzorcowe kuleczkami opłaszczonymi przeciwciałami ($50\mu\text{l}$ na próbkę), następnie przeciwciałami reporterowymi ($50\mu\text{l}$ na próbkę) sprzężonymi z fikoerytryną. Po procedurze wybarwiania, próbki płukano, wirowano, następnie zawieszano w $300\mu\text{l}$ roztworu do płukania. Tak przygotowane próby poddawano procedurze analizy cytometrycznej. Wykorzystywano cytometr przepływowy LSR II (Becton Dickinson), wyposażony w trzy lasery. Zbierano sygnał FSS/SSC oraz fluorescencję barwników APC, APC-Cy7, PE. Dane analizowano następnie przy użyciu oprogramowania FCAP Array (Becton Dickinson) i prezentowano, jako stężenia w pg cytokiny na 1 ml medium hodowlanego (supernatantu).

3.3.7 Badania mikrobiologiczne płynu ze szczeliny dziąsłowej

Badania objęły 65 pacjentów. Do badań mikrobiologicznych dwukrotnie, (tj. przed zacementowaniem koron – „kontrola” oraz w 6 miesięcy po ich zacementowaniu – grupa „badana”) pobierano płyn ze szczeliny dziąsłowej, której głębokość nie przekraczała 2 mm. Płyn był pobierany jałowym ćwiekiem endodontycznym, umieszczany w pojemniku zawierającym płyn transportowy (przygotowany metodą PRAS) i w czasie 1 godziny przesyłany do laboratorium w Zakładzie Mikrobiologii Jamy Ustnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, którego kierownikiem jest: prof. dr hab. Anna Kędzia. Z każdego materiału wykonywano preparat, który był barwiony metodą Grama oraz dokonywano posiewu na powierzchni podłoża agarowych, odpowiednich dla danego

drobnoustroju. Badania mikrobiologiczne dotyczyły oceny ilościowej i jakościowej drobnoustrojów obecnych w pobranym materiale zgodnie z obecnymi zasadami analizy mikrobiologicznej (Krieg i wsp. 1984; Mahnon i wsp. 2007). W celu określenia liczby drobnoustrojów badany materiał (po ujednoliceniu mieszalnikiem mimośrodowym), był seryjnie rozcieńczany w odpowiednim bulionie tzn. bulionie tioglikolanowym - bakterie beztlenowe i mikroaerofilne, w bulionie BHI (Difco) - bakterie tlenowe i względnie beztlenowe, bulionie Sabourauda - grzyby drożdżopodobne. Następnie próbki w ilości 0,1 ml były posiewane na odpowiednie podłoża agarowe (zależnie od drobnoustrojów) i hodowane w 37⁰ C odpowiednio długo we właściwych warunkach dobranych zależnie od mikroorganizmów. Do posiewu bakterii beztlenowych i mikroaerofilnych użyto agaru dla beztlenowców z dodatkiem 5% krwi baraniej, menadionu i heminy; dla bakterii tlenowych i względnie beztlenowych agaru Muellera-Hintona z dodatkiem 5% krwi baraniej i dla grzybów drożdżopodobnych agaru Sabourauda. Po inkubacji liczono wyhodowane kolonie. W celu wyhodowania obecnych w materiałach drobnoustrojów pobrany materiał posiewano na odpowiednie podłoża niewybiórcze i wybiórcze dla bakterii beztlenowych i mikroaerofilnych, bakterii tlenowych i względnie beztlenowych oraz dla grzybów drożdżopodobnych. Hodowle tych posiewów prowadzono w 37⁰ C (zależnie od rodzaju drobnoustrojów) w warunkach beztlenowych, mikroaerofilnych i tlenowych przez odpowiednio długi czas. Próbkę do badań mikrobiologicznych pobierano od pacjentów niezależnie od prób przeznaczonych do analizy stężenia cytokin.

3.3.8 Badania w kierunku bakterii beztlenowych

Pobrane materiały posiewano na następujące podłoża: agar dla beztlenowców z dodatkiem 5% Krwi baraniej, menadionu i heminy (po 10 µg/ml), podłoża wybiórcze tj. Agar dla beztlenowców zawierający 5% krwi baraniej, z dodatkiem: kanamycyny i wankomycyny oraz kanamycyny i neomycyny; Fusobacterium Medium (Difco) i agar z dodatkiem żółci i eskuliny. Podłoża były inkubowane w warunkach beztlenowych w 37⁰ C, w anaerostatach wypełnionych mieszaniną gazów o składzie: 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, zawierających katalizator palladowy i wskaźnik warunków beztlenowych. Po 10 dniowej inkubacji oceniano morfologię wyhodowanych kolonii, ich zdolność do fluorescencji (w promieniach UV), cechy biochemiczne (testy API 20A, bioMerieux) oraz wytwarzanie z glukozy kwasów tłuszczowych od C₁ do C₆, kwasu mlekowego, bursztynowego i fumarowego (metodą chromatografii gazowej). Wyhodowane szczepy bakterii beztlenowych

były identyfikowane na podstawie schematów przedstawionych w Anaerobe Laboratory Manual V.P.I. (Holdeman, 1977), Bergey's Manual (Krieg N.R 1984), uwzględniając zmiany taksonomiczne.

3.3.9 Badania w kierunku paciorkowców i pałeczek *Lactobacillus*

Materiały posiewano na powierzchni agaru Mitis Salivarius i agaru odżywczego z dodatkiem 5% krwi baraniej. Inkubację posiewów prowadzono przez 48 godzin w temp. 37⁰ C, w an aerostatach zawierających mieszaninę gazów: 10% CO₂ i 90% N₂, a następnie w temp. pokojowej przez kolejne 48 godzin. Szczepy paciorkowców były identyfikowane na podstawie testów API 20STREP (bioMerieux), zgodnie z zaleceniami producenta oraz Bergey's Manual (Krieg N.R 1984). Natomiast w celu wyizolowania pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* materiał posiewano na podłoże *Lactobacilli* MRS Agar (Difco) oraz agar wzbogacony dodatkiem 5% krwi baraniej. Inkubację prowadzono w anaerostatach zawierających CAMPY Pak (bioMerieux) przez 48 godzin w 37⁰ C. Szczepy identyfikowano na podstawie Bergey's Manual.

3.3.10 Badania w kierunku bakterii mikroaerofilnych

Materiały pobrane od pacjentów były posiewane na powierzchni Agaru Brucella (Difco) i Agaru Columbia (Difco), które zostały wzbogacone dodatkiem 5% krwi baraniej. Hodowlę prowadzono w anaerostatach zawierających CAMPY PakTM EZ (Becton Dickinson), w temp. 37⁰ C przez 4 – 5 dni. Identyfikacji wyhodowanych szczepów bakterii mikroaerofilnych dokonywano na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych, wykorzystując odpowiednie testy API (BioMerieux), zgodnie z obowiązującymi przepisami (Mahnon C.R, 2007).

3.3.11 Badania w kierunku bakterii tlenowych i względnie beztlenowych

Materiały posiewano na podłoża niewybiórcze (agar odżywczy, agar odżywczy z dodatkiem 5% krwi baraniej, wybiórcze i wybiórczo-różnicujące m.in. Agar MacConkey i Agar Chapmana) i hodowano przez 24 – 48 godzin w temp. 37⁰ C w warunkach tlenowych. Identyfikacji wyhodowanych szczepów bakterii tlenowych dokonywano na podstawie morfologii kolonii, odpowiednich testów API (bioMerieux), zgodnie z obowiązującymi zasadami.

3.2.12 Badania w kierunku grzybów drożdżopodobnych

Materiały zostały posiane na podłoże Sabourauda. Inkubację posiewów prowadzono w temp. 37⁰ C przez 1 – 3 dni w warunkach tlenowych. Szczepy grzybów drożdżopodobnych były identyfikowane na podstawie morfologii kolonii, wzrostu na podłożu CHROMagar (BioRad), testu filamentacji, zdolności do wytwarzania chlamydospor oraz testów biochemicznych (20 C AUX) (bioMerieux) (Krzysiak i wsp. 2011).

3.3.13 Analiza statystyczna

Wszystkie obliczenia wykonano za pomocą arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel wersja 2007 oraz pakietu statystycznego Statistica wersja 8.5 (Statsoft, Kraków). W opisie statystycznym danych ilościowych posłużono się klasycznymi miarami położenia takimi jak średnia arytmetyczna i mediana, oraz odchyleniem standardowym i rozstępem jako ogólnymi miarami zmienności. Normalność rozkładu zmiennych ciągłych i równość wariancji badanej cechy w grupach badano odpowiednio testem W Shapiro-Wilka i testem równości wariancji. Przy porównaniu dwóch grup dla danych ilościowych posłużono się testem t-Studenta dla danych parametrycznych o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach oraz testem U Manna-Whitney'a w wypadku niestwierdzenia spełnienia powyższych założeń. Przy porównaniu większej liczby grup dla danych ilościowych parametrycznych posłużono się metodą analizy wariancji (ANOVA), a dla danych nieparametrycznych jej odpowiednikiem nieparametrycznym - testem Kruskala-Wallisa. wraz z testami porównań wielokrotnych *post hoc*. W ocenie danych zmieniających się w czasie ze względu na charakter rozkładu zmiennych przy porównaniu dwukrotnym wykorzystano test kolejności par Wilcoxona, a porównując wielokrotnie użyto odmiany analizy wariancji według Friedmana. W celu oceny siły, kierunku i istotności powiązania zmiennych posłużono się współczynnikiem korelacji liniowej Pearsona, a dla danych nieparametrycznych współczynnikiem korelacji rang Spearmana. We wszystkich testach statystycznych za poziom statystycznej istotności różnic przyjęto $p < 0,05$.

4 WYNIKI

4.1 Stężenie cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej po 1 tygodniu i po 6 miesiącach od zacementowania koron.

Z danych przedstawionych w Tab. 2 wynika, że wystąpiły duże różnice pomiędzy stężeniami poszczególnych cytokin zarówno w grupie kontrolnej (przed zacementowaniem), jak i po tygodniu i pół roku od zacementowania. W zbiorczej tabeli nie uwzględniono rodzaju stopu, umiejscowienia korony, sposobu preparacji zęba i płci. Znamienne statystycznie różnice dotyczyły IFN- γ , IL-8 oraz IL-10.

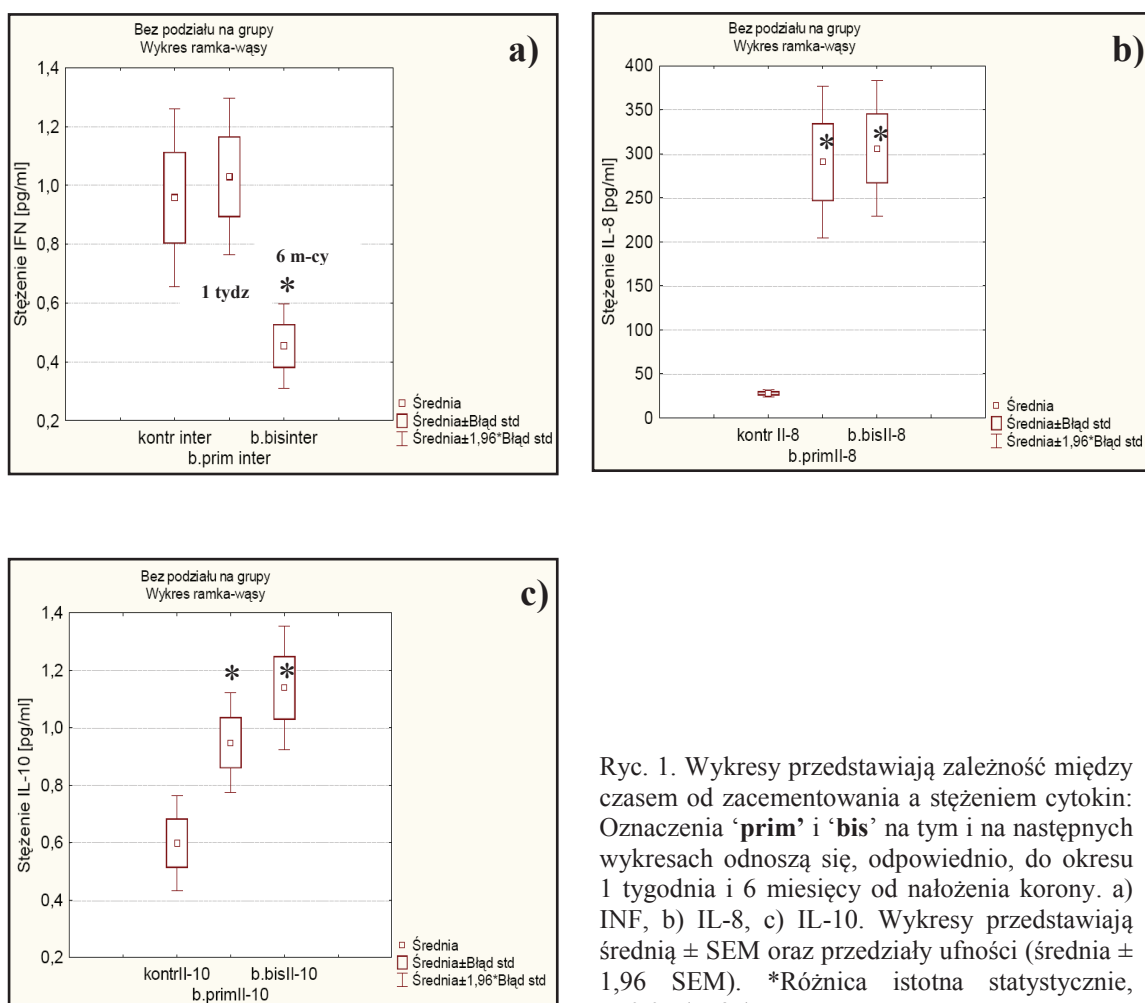
Tabela 2 . Średnie stężenia badanych cytokin w całej badanej grupie pacjentów (n=65) bezpośrednio przed oszlifowaniem zęba (kontrola), po 1 tygodniu (T1) i po 6 miesiącach (T2) od zacementowania koron.

	Kontrola	T1	T2
TNF	0,42 $\pm$ 0,31	0,52 $\pm$ 0,21	1,00 $\pm$ 0,44*
IFN- γ	0,95 $\pm$ 0,45	1,038 $\pm$ 0,31	0,45 $\pm$ 0,32* ^A
IL-8	27,95 $\pm$ 11,2	290,39 $\pm$ 43,44***	306,02 $\pm$ 59,44***
IL-10	0,61 $\pm$ 0,33	0,95 $\pm$ 0,45*	1,14 $\pm$ 0,41*
IL-12	1,74 $\pm$ 0,53	1,97 $\pm$ 0,74	2,11 $\pm$ 0,67

Dane przedstawiają średnie stężenie oraz odchylenia standardowe ($\pm$ OS) dla wszystkich rodzajów zastosowanych stopów (pg/ml). *, **, *** statystycznie znamienne różne od kontroli, odpowiednio $p < 0.05$, $p < 0.01$ i $p < 0.001$. ^A statystycznie znamienne różne od T1, $p < 0.05$. Tak jak opisano w Rozdziale „Metody” analiza statystyczna wyników została przeprowadzona głównie w oparciu o nieparametryczny test U Manna-Whitney’a.

Ryc. 1 przedstawia stężenia badanych cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej w grupie kontrolnej oraz po 1 tygodniu i 6 miesiącach od zacementowaniu koron. Po tygodniu od zacementowania poziom IFN- γ nie różnił się od kontroli, natomiast po 6 m-cach zmniejszył się dwukrotnie (Ryc. 1a). Warto zauważyć jednak, iż stężenie IFN- γ we wszystkich przypadkach było bardzo niskie.

W przypadku IL-8 stężenie tej cytokin było relatywnie niskie w warunkach kontrolnych, jednak już po tygodniu od zacementowania koron było kilkunastokrotnie wyższe i pozostawało na tym poziomie także po 6 m-cach od zacementowania (Ryc. 1b). Także stężenie IL-10 było istotnie wyższe niż u kontroli po upływie tygodnia od zacementowania i nie ulegało istotnej zmianie po 6 miesiącach (Ryc. 1c). Natomiast stężenia TNF- α oraz IL-12 w płynie kieszonki dziąsłowej nie zmieniały się w porównaniu do kontroli ani po 1 tygodniu ani po 6 m-cach od zacementowania koron (Tab. 2).



Ryc. 1. Wykresy przedstawiają zależność między czasem od zacementowania a stężeniem cytokin: Oznaczenia 'prim' i 'bis' na tym i na następnych wykresach odnoszą się, odpowiednio, do okresu 1 tygodnia i 6 miesięcy od nałożenia korony. a) INF, b) IL-8, c) IL-10. Wykresy przedstawiają średnią $\pm$ SEM oraz przedziały ufności (średnia $\pm 1,96 \cdot$ SEM). *Różnica istotna statystycznie, $p < 0,05$ ($n = 95$).

4.2. Wpływ rodzaju stopu metalu na stężenia cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej po zacementowaniu koron

W Tabeli 3 przedstawiono średnie stężenia cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej po 1 tygodniu i 6 miesiącach od zacementowania w zależności od rodzaju stopu korony, ale bez uwzględnienia umiejscowienia korony, sposobu preparacji zęba i płci.

W warunkach kontrolnych uzyskano bardzo podobne stężenia wyjściowe dla określonych cytokin. Natomiast różne rodzaje stopów w różnym zakresie wpływały na stężenie cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej, przy czym najbardziej istotne różnice zaobserwowano dla IL- 8.

Tabela 3. Wpływ materiału koron na stężenia badanych cytokin po zacementowaniu. Wartości przedstawiają średnią $\pm$ odchylenie standardowe (pg/ml).

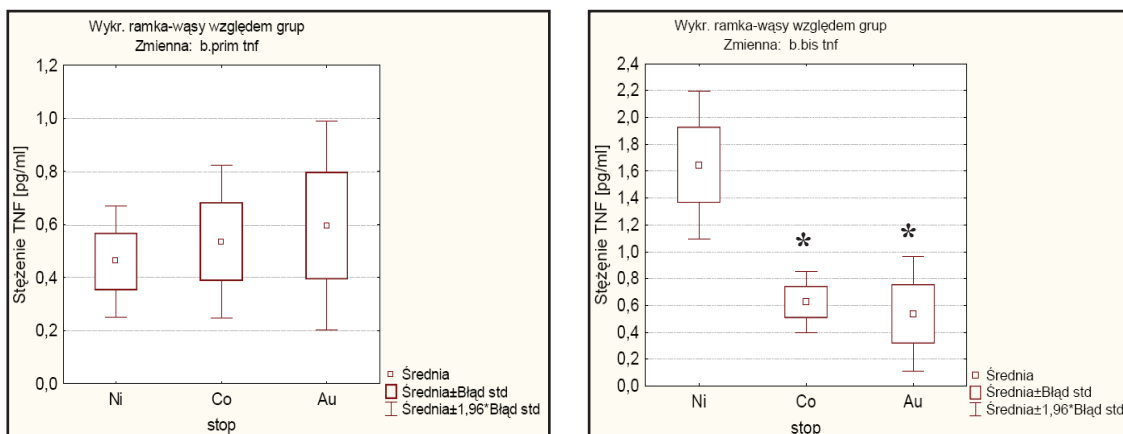
	Kontrola	T1 Cr-Ni	T2 Cr-Ni	Kontr.	T1 Cr-Co	T2 Cr-Co	Kontrola	T1 Au-Pt	T2 Au-Pt
TNF	0,37 $\pm$ 0,21	0,46 $\pm$ 0,20	1,64 $\pm$ 0,56** @	0,50 $\pm$ 0,32	0,55 $\pm$ 0,37	0,63 $\pm$ 0,23#	0,45 $\pm$ 0,21	0,53 $\pm$ 0,12	0,54 $\pm$ 0,20
IFNγ	0,87 $\pm$ 0,23	1,35 $\pm$ 0,34*	0,82 $\pm$ 0,21@	0,83 $\pm$ 0,11	0,80 $\pm$ 0,29*	0,60 $\pm$ 0,33&	0,89 $\pm$ 0,23	0,86 $\pm$ 0,31	0,15 $\pm$ 0,11**
IL-8	29,7 $\pm$ 11,3	523,2 $\pm$ 123,4** @	493,3 $\pm$ 115,3** @	26,4 $\pm$ 14,33	217,3 $\pm$ 7,45**&#	306,6 $\pm$ 87,92**&	27,5 $\pm$ 12,42	98,6 $\pm$ 34,22**	65,8 $\pm$ 23,45**
IL-10	0,51 $\pm$ 0,32	0,94 $\pm$ 0,41	0,96 $\pm$ 0,29	0,35 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,23**	1,05 $\pm$ 0,32**	0,47 $\pm$ 0,11	0,97 $\pm$ 0,24**	1,49 $\pm$ 0,29**
IL-12	1,82 $\pm$ 0,39	1,78 $\pm$ 0,45	1,73 $\pm$ 0,54	1,85 $\pm$ 0,67	2,19 $\pm$ 0,76	1,95 $\pm$ 0,68	1,48 $\pm$ 0,44	1,97 $\pm$ 0,73	2,87 $\pm$ 0,56

K - grupa kontrolna, T1 - po 1 tygodniu, T2 - po 6 miesiącach od zacementowania korony.

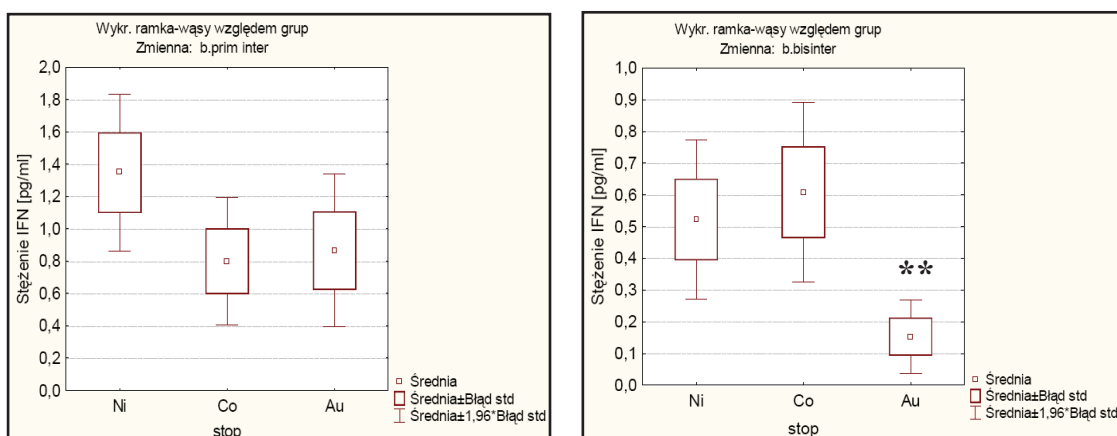
*** wartości znamienne statystycznie różne od odpowiedniej kontroli, odpowiednio $p < 0.05$ i $p < 0.01$; @ znamienność różnica między Cr-Ni a Au-Pt dla odpowiadających sobie okresów czasowych (T1 lub T2), $p < 0.05$; & znamienność różnica między Cr-Co a Au-Pt dla odpowiadających sobie okresów czasowych (T1 lub T2), $p < 0.05$; # znamienność różnica między Cr-Co a Cr-Ni dla odpowiadających sobie okresów czasowych (T1 lub T2), $p < 0.05$.

Dane przedstawione na Rycinach 1-4 odnoszą się do pomiaru stężeń cytokin dla określonych rodzajów stopu po jednym tygodniu i 6 miesiącach od zacementowania. Dane wskazują na to, że korony wykonane na bazie stopów niklu (Cr-Ni) powodowały prawie czterokrotnie wyższe stężenie TNF- α w płynie szczeliny dziąsłowej w porównaniu do koron wykonanych ze stopów na bazie kobaltu (Cr-Co) i złota (Au-Pt). Jednak efekt ten był widoczny jedynie po 6 miesiącach od zacementowania (ryc. 2).

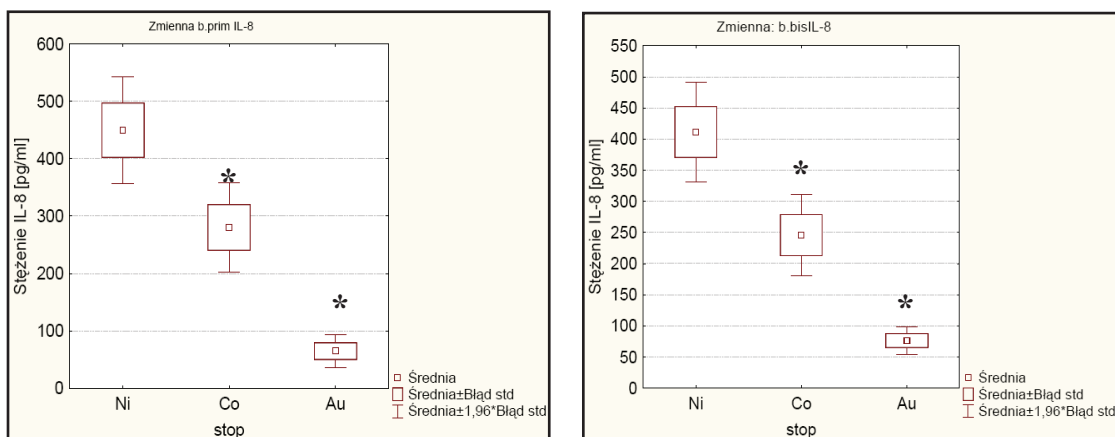
Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



Ryc. 2. Zależność między rodzajem stopu Ni (Cr-Ni), Co (Cr-Co), Au (Au-Pt) a stężeniem TNF po 1 tygodniu (lewy panel) oraz po 6 miesiącach (prawy panel). Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie względem kontroli dla $p < 0,05$.



Ryc. 3. Zależność między rodzajem stopu (Ni, Co, Au) a stężeniem INF po 1 tygodniu (lewy panel) oraz po 6 miesiącach (prawy panel) od zacementowania koron. Opis danych jak dla ryciny 1. *, ** Różnica istotna statystycznie, odpowiedni $P < 0,05$ oraz $p < 0,01$.



Ryc. 4. Zależność między rodzajem stopu (Ni, Co, Au) a stężeniem IL-8 po 1 tygodniu (lewy panel) oraz po 6 miesiącach (prawy panel) od zacementowania korony. Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P < 0,05$.

Wykr. ramka-wąsy względem grup
Zmienna: b.primIL-10

Stężenie IL-10 [pg/ml]

Ni Co Au

stop

□ Średnia
 □ Średnia±Błąd std
 + Średnia±1,96*Błąd std

Wykr. ramka-wąsy względem grup
Zmienna: b.bisIL-10

Stężenie IL-10 [pg/ml]

Ni Co Au

stop

□ Średnia
 □ Średnia±Błąd std
 + Średnia±1,96*Błąd std

Wykr. ramka-wasy względem grup
Zmienna: b.primil-12

Stężenie L-12 [pg/ml]

Ni Co Au

stop

□ Średnia
 □ Średnia±Błąd std
 ┘ Średnia±1,96*Błąd std

Wykr. ramka-wasy względem grup
Zmienna: b.bisil-12

Stężenie L-12 [pg/ml]

Ni Co Au

stop

□ Średnia
 □ Średnia±Błąd std
 ┘ Średnia±1,96*Błąd std

Dane przedstawione na Ryc. 3 wskazują na to, że korony wykonanych ze stopów na bazie Ni i Co powodowały istotne statystycznie zwiększenie stężenia IFN- γ w płynie szczeliny dziąsłowej w porównaniu do koron wykonanych ze stopu na bazie Au. Rycina 3 pokazuje także, że w przypadku koron wykonanych ze stopu szlachetnego zaobserwowano znamienne spadki stężenia IFN- γ po 6 miesiącach od zacementowania poniżej wartości uzyskanych dla w badaniu przed oszlifowaniem zębów. Wartości kontrolna i oznaczona po 1 tygodniu od zacementowania koron były zbliżone. Należy jednak zaznaczyć, iż we wszystkich tych przypadkach stężenie IFN- γ było bardzo niskie.

49

miesiącach. W przypadku IL-10 nie zaobserwowano znaczących różnic w ekspresji dla poszczególnych stopów, za wyjątkiem stopów Au. W tym ostatnim przypadku nastąpił wzrost poziomu IL-10 dla próbek pobranych po 6 miesiącach (ryc. 5). Stwierdzono natomiast różnice w poziomie ekspresji IL-12 po tygodniu (nieznaczna) i po sześciu miesiącach (istotna statystycznie) od momentu zacementowania koron dla stopów złota (ryc. 6). Należy jednak zaznaczyć, iż wartości stężeń tej cytokiny dla wszystkich przypadków bardzo niskie.

4.3. Wpływ płci na stężenie cytokin u w płynie szczeliny dziąsłowej po zacementowaniu koron

Tabela 4. Wpływ płci na stężenia badanych cytokin po zacementowaniu dla wszystkich koron niezależnie od stopu.

	Kontrola	T1	T2	Kontrola	T1	T2	Kontrola	T1	T2
	K+M (n=65)	K+M	K+M	K (n=31)	K	K	M (n=34)	M	M
TNF	0,42± 0,31	0,52±0,21	1,00±0,44*	0,33± 0,11	0,43± 0,12	1,14± 0,38* ^A	0,54± 0,21	0,64± 0,22	0,81± 0,34
IFN	0,95±0,45	1,04± 0,31	0,45± 0,32*	1,20± 0,39	1,07± 0,44	0,38± 0,13* ^A	0,64± 0,21	0,97± 0,39	0,56± 0,21
IL-8	27,95±11,2	290,39± 43,44**	306,02± 59,44**	29,63± 11,23	210,41± 76,33 **	254,63± 98,33**	25,76± 12,33	395,20± 156,22**	373,36± 87,44**
IL-10	0,61±0,33	0,95± 0,45	1,141± 0,41	0,72± 0,34	0,86± 0,39	1,02± 0,34	0,44± 0,23	1,07± 0,56*	1,29± 0,46*
IL-12	1,74±0,53	1,97± 0,74	1,97± 0,74	1,90± 0,45	1,83± 0,343	1,92± 0,67	1,50± 0,79	2,16± 0,49	2,36± 0,67

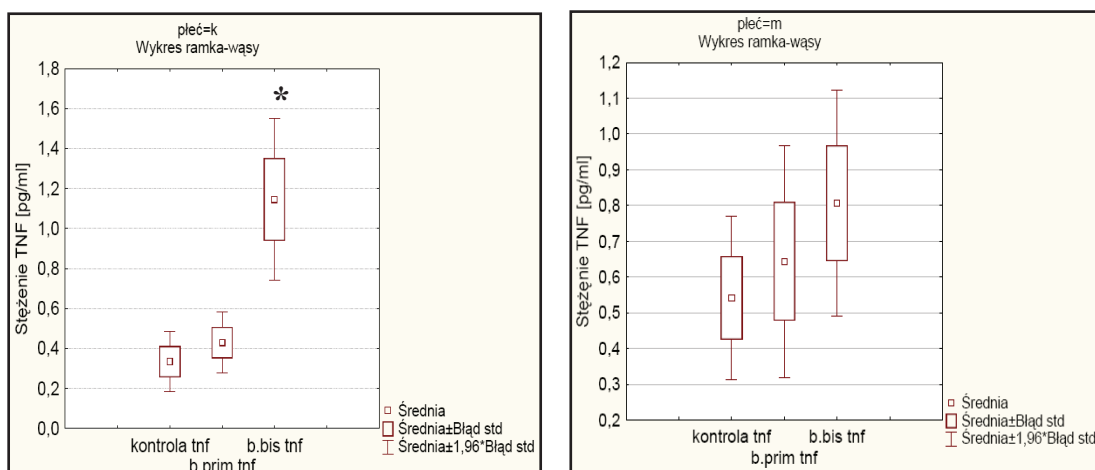
Tabela przedstawia wartości średnie ± OS (pg/ml). Kon - grupa kontrolna, T1 – tydzień po zacementowaniu, T2 – 6 miesięcy po zacementowaniu, K – kobiety, M – mężczyźni.

*, ** wartości znamienne statystycznie różne od odpowiedniej kontroli, p<0,05, p<0,01.

^A statystycznie znamienne różne od T1 w grupie K lub M, p<0,05.

W badaniach zaobserwowano istotne różnice zależne od płci w stężeniu TNF- α . U kobiet stwierdzono brak zmian po tygodniu i wyraźny wzrost stężenia TNF- α po 6 miesiącach od momentu zacementowania koron. U mężczyzn ani po tygodniu, ani po sześciu miesiącach od zacementowania koron poziom TNF- α nie różnił się istotnie od grupy kontrolnej Tab. 4 i ryc. 7). Zaobserwowano także istotne różnice zależne od płci w stężeniu IFN- γ . U kobiet po tygodniu od zacementowania koron stężenie IFN- γ nie uległo istotnej zmianie, natomiast po sześciu miesiącach poziom tej cytokiny był znacznie niższy w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. 4, ryc. 8). Natomiast w grupie mężczyzn nie zaobserwowano istotnych zmian w stężeniu IFN- γ w płynie kieszonki dziąsłowej ani po tygodniu, ani po pół roku od zacementowania korony (Tab. 4, Ryc. 8).

Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów

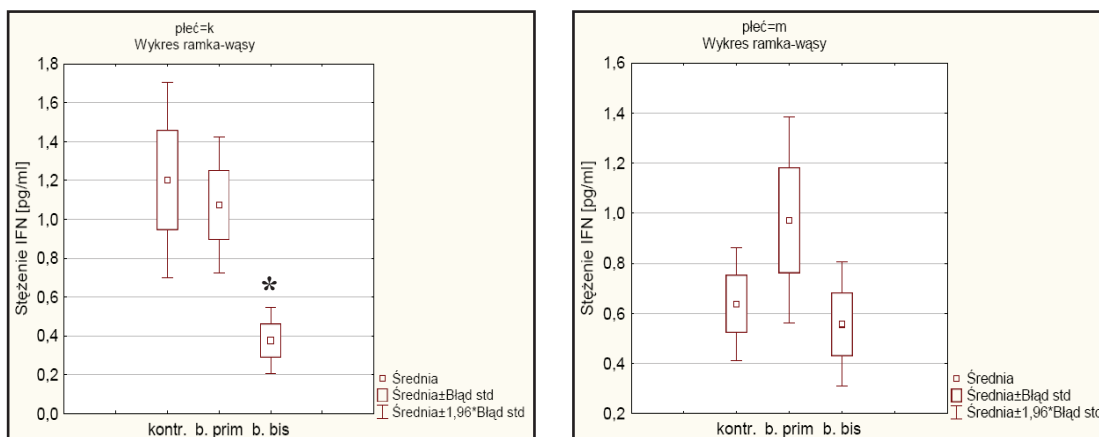


Ryc. 7. Poziom TNF u kobiet (lewy panel) i mężczyzn (prawy panel) po 1 tygodniu (prim) i 6 miesiącach (bis) od zacementowania koron. Opis danych jak dla ryciny 1.
*Różnica istotna statystycznie dla $P < 0,05$.

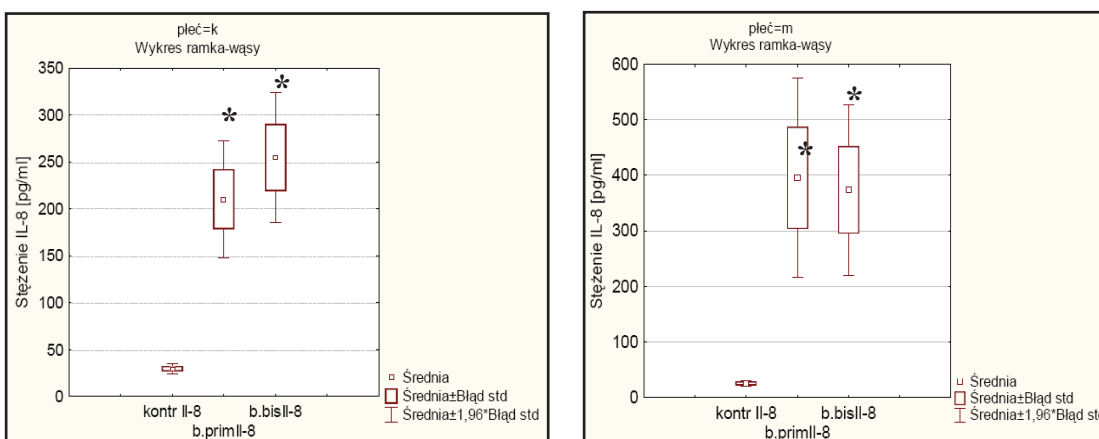
Zmiany w stężeniu IL-8 przebiegały podobnie u kobiet i u mężczyzn. U pacjentów obydwu płci stwierdzono statystycznie istotny wzrost poziomu IL-8 zarówno po tygodniu, jak i 6 miesiącach od momentu zacementowania koron (Tab. 4, Ryc. 9). W odniesieniu do IL-10 zaobserwowano także pewne różnice zależne od płci. Zacementowanie koron nie zmieniło w sposób statystycznie znamienny stężenia IL-10 w płynie kieszonki dziąsłowej u kobiet. Natomiast w grupie mężczyzn zacementowanie koron wyraźnie podwyższyło poziom IL-10 zarówno po tygodniu, jak i po 6 miesiącach (Tab. 4, ryc. 10).

W odniesieniu do IL-12 nie zaobserwowano znamiennych różnic w stężeniach w stosunku do kontroli zarówno u kobiet jak i mężczyzn po tygodniu i pół roku od zacementowania koron.

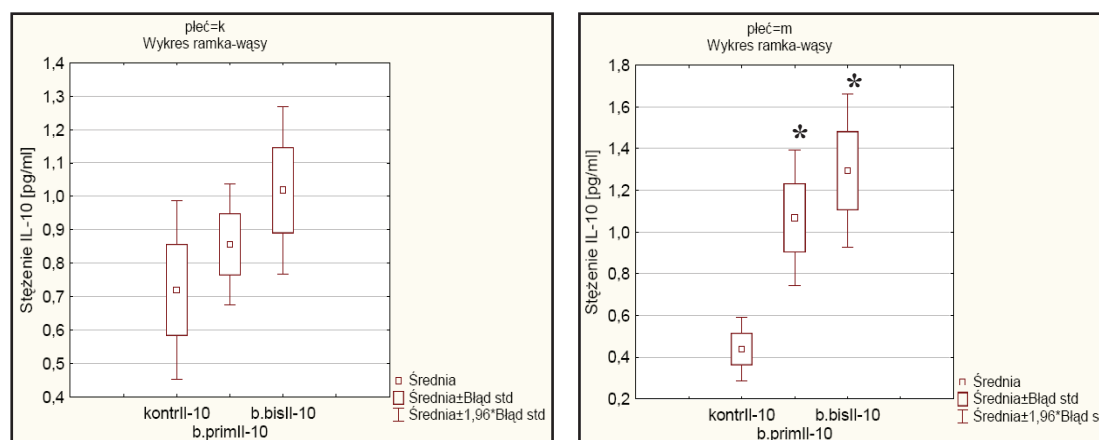
Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



Ryc. 8. Poziom INF u kobiet (lewy panel) i mężczyzn (prawy panel) po 1 tygodniu i 6 miesiącach od zacementowania koron. Opis danych jak dla ryciny 1. * dla $P<0,05$.



Ryc. 9. Poziom IL-8 u kobiet (lewy panel) i mężczyzn (prawy panel) po 1 tygodniu i 6 miesiącach od zacementowania koron. Opis danych jak dla ryciny 1. * dla $P<0,05$.



Ryc. 10. Poziom IL-10 u kobiet (lewy panel) i mężczyzn (prawy panel) po 1 tygodniu i 6 miesiącach od zacementowania koron. Opis danych jak dla ryciny 1. * dla $P<0,05$.

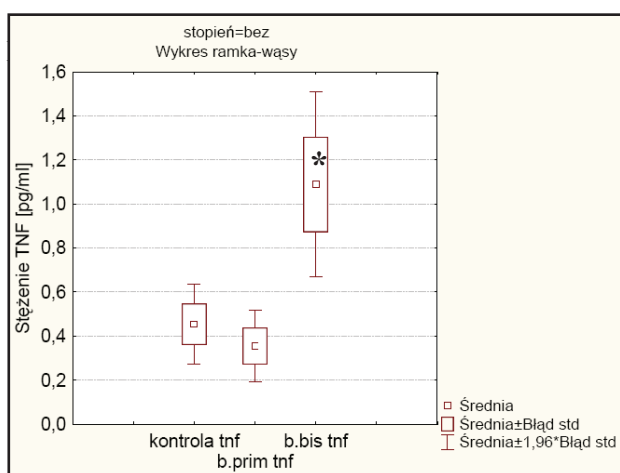
4.4 Ocena wpływu rodzaju preparacji na stężenia cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej

Tabela 5. Wpływ rodzaju preparacji na stężenia cytokin po zacementowaniu po czasie jednego (T1) oraz sześciu miesięcy (T2) (wartości w pg/ml).

	Kontrola stopień	T1 stopień	T2 stopień	Kontrola bez stopnia	T1 bez stopnia	T2 bez stopnia
TNF	0,40 ±0,23	0,35 ±0,11	0,43 ±0,27	0,45 ±0,21	0,34 ±0,29	1,09±0,41 ^A
IFN	0,90 ±0,49	1,06 ±0,32	0,48 ±0,19	1,04 ±0,31	0,96 ±0,23	0,42±0,11 ^A
IL-8	26,99 ±12,33	166,17 ±34,33 **	248,00 ±45,22 ** ^A	29,28 ±11,33	391,58 ±112,3**	379,97 ±123,2 **
IL-10	0,61 ±0,23	1,07 ±0,34*	0,97 ±0,45*	0,58 ±0,23	0,77 ±0,38	1,39 ±0,12 ^A
IL-12	1,69 ±0,78	2,16 ±0,56	2,12 ±0,45	1,79 ±0,48	1,70 ±0,89	1,85 ±0,67

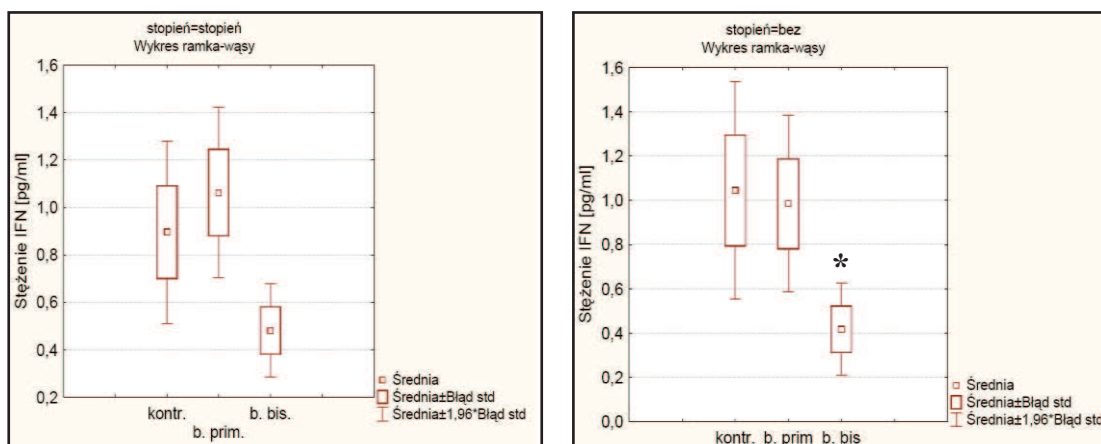
Tabela przedstawia wartości średnie ± OS (pg/ml). Oznaczenia symboli w takie jak w opisie Tabeli 4. ^A statystycznie znacząco różne od T1, p<0.05.

Stwierdzono statystycznie istotny wzrost stężenia TNF-α po 6 miesiącach od zacementowania koron bez stopnia i brak zmian w stężeniu tej cytokiny przy zastosowaniu stopnia (Tab. 5 i ryc. 11).

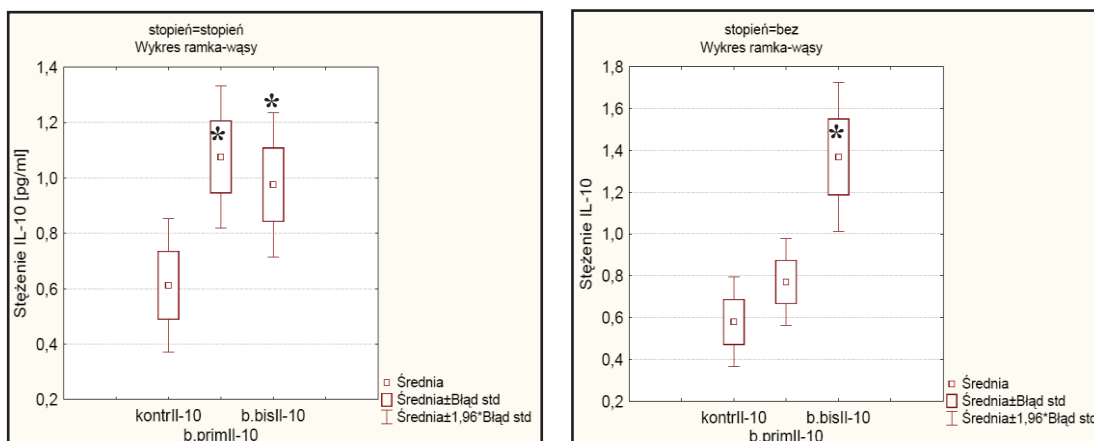


Ryc. 11. Stężenia TNF po 1 tygodniu (prim) oraz po 6 miesiącach (bis) od zacementowania korony (bez stopnia). Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla p<0,05.

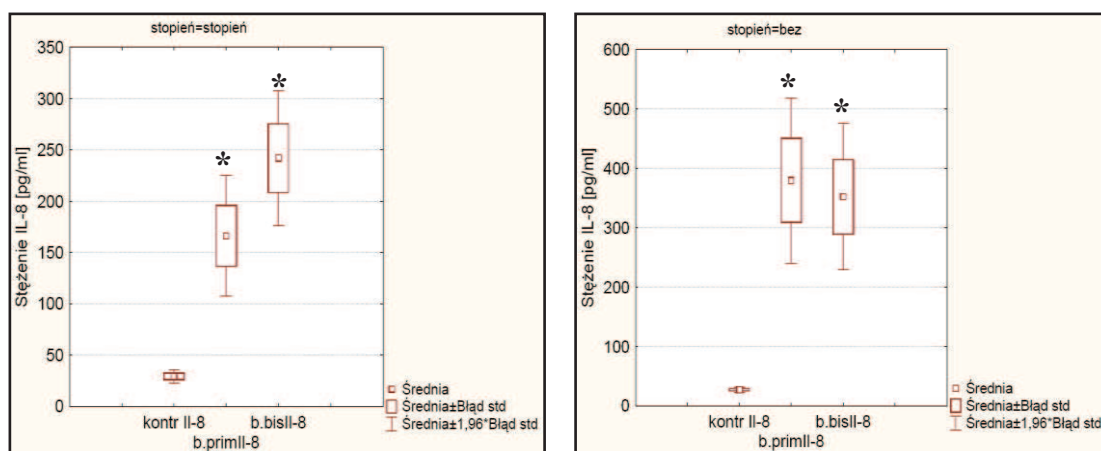
Wpływ stopów metalu stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



Ryc.12. Poziom INF przy preparacji zębów ze stopniem (lewy panel) i bez stopnia (prawy panel) po 1 tygodniu i 6 miesiącach od zabiegu. Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P<0,05$.



Ryc. 13. Poziom IL-10 przy preparacji zębów ze stopniem (lewy panel) i bez stopnia (prawy panel) po 1 tygodniu i 6 miesiącach od zabiegu. Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P<0,05$.



Ryc. 14. Poziom IL-8 przy preparacji zębów ze stopniem (lewy panel) i bez stopnia (prawy panel) po 1 tygodniu i 6 miesiącach od zabiegu. Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P<0,05$.

Natomiast w odniesieniu do IFN nie stwierdzono znaczących zmian w stężeniu tej cytokiny zależnych od obecności stopnia: w obydwu przypadkach poziom tej cytokiny nie zmieniał się po tygodniu od zacementowania i ulegał statystycznie znamiennej obniżeniu tylko po 6 miesiącach od zacementowania w porównaniu w przypadku korony bez stopnia (ryc. 12). W odniesieniu do IL-10 stwierdzono, że przy szlifowaniu ze stopniem wystąpił wzrost stężenia tej cytokiny po tygodniu od zacementowania i pozostawał podwyższony w stosunku do kontroli także po 6 miesiącach (Tab. 5 i ryc. 13). Natomiast przy szlifowaniu bez stopnia nie doszło do istotnej zmiany w poziomie IL-10 po tygodniu od zacementowania, natomiast po 6 miesiącach stwierdzono wzrost stężenia tej cytokiny (Tab. 5 i ryc. 14).

W przypadku IL-8 zaobserwowano wzrost poziomu tej cytokiny w płynie szczeliny dziąsłowej zarówno w przypadku oszlifowania zęba ze stopniem jak i bez stopnia. Wyraźny wzrost jej stężenia wystąpił już po 1 tygodniu od zacementowania korony i był istotnie podwyższony względem kontroli także po 6 miesiącach (Tab. 5 i ryc. 14).

4.5. Ocena wpływu lokalizacji anatomicznej koron na stężenie cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej

Tabela 6. Wpływ lokalizacji na stężenia cytokin po zacementowaniu. Wartości przedstawiają średnią oraz odchylenie standardowe (pg/ml).

	Kontrola Szczęka	T1 Szczęka	T2 Szczęka	Kontrola Żuchwa	T1 Żuchwa	T2 Żuchwa
TNF	0,43 ±0,11	0,54 ±0,23	0,80 ±0,43	0,41 ±21	0,50 ±0,23	1,29 ±0,34*
IFN	0,82 ±0,35	0,90 ±0,45	0,36 ±0,11* ^A	1,16 ±0,34	1,21 ±0,33	0,60 ±0,21*
IL-8	26,70 ± 12,3	187,03 ± 56,3*	220,04 ±34,22*	29,81 ±12,34	443,53 ±43**	433,40 ±42,33**
IL-10	0,77 ±0,41	0,94 ±0,51	1,07 ±0,34	0,34 ±0,12	0,96 ±0,43**	1,24 ±0,67 **
IL-12	1,96 ±0,78	1,94 ±0,78	1,89 ±0,65	1,40 ±0,87	2,03 ±0,56	2,44 ±0,53

Oznaczenia symboli w Tabeli takie jak w opisie Tabeli 4.

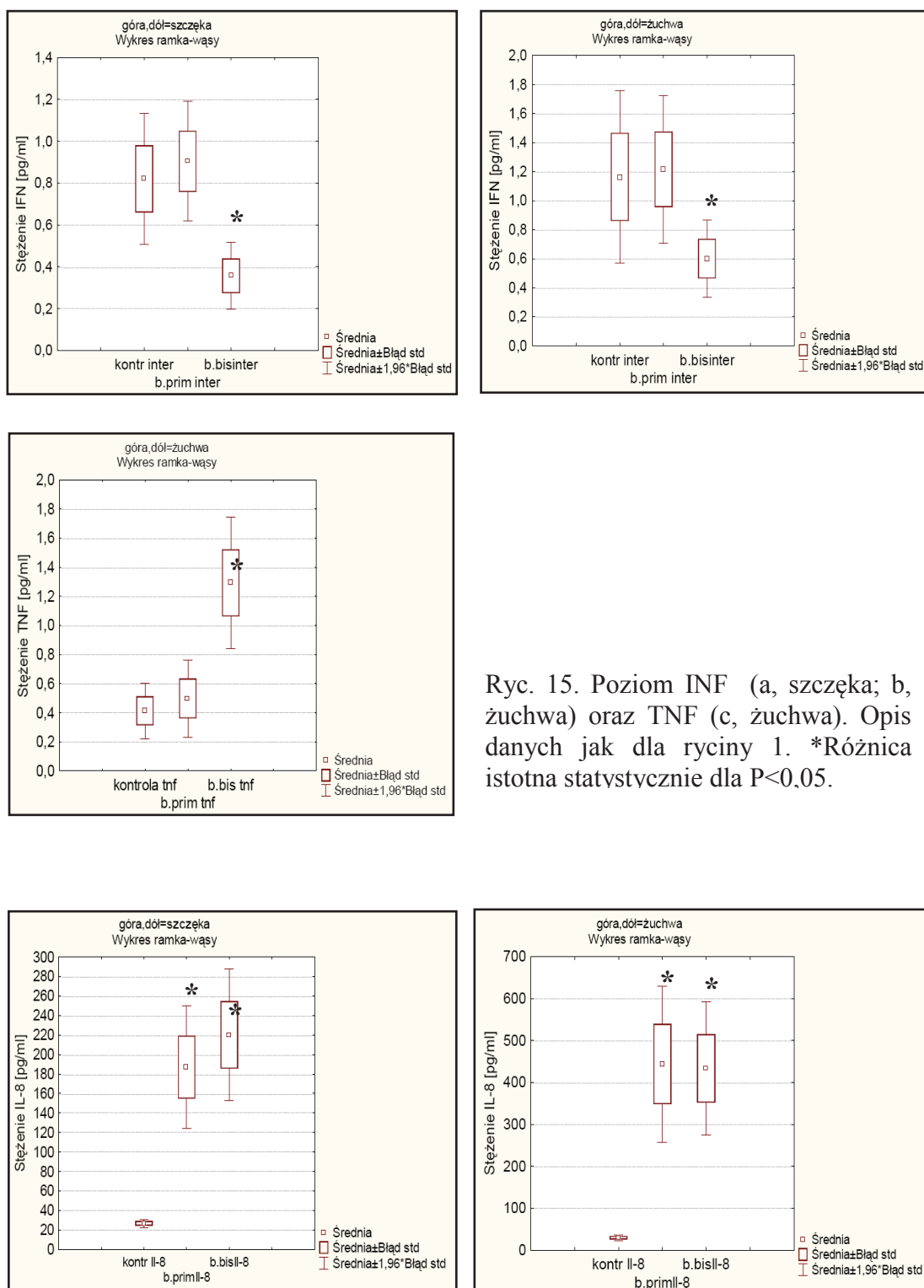
Stwierdzono statystycznie istotne różnice w poziomie TNF- α po sześciu miesiącach od zacementowania koron w zależności od umiejscowienia koron: w szczęce lub żuchwie. Po 1 tygodniu od zacementowania poziomy TNF- α były podobne jak u kontroli w obydwu lokalizacjach. Natomiast po 6 miesiącach od zacementowania w żuchwie odnotowano wyraźny wzrost TNF-u w porównaniu ze szczęką (Tab. 6 i ryc. 15c).

W przypadku IFN-gamma zaobserwowano statystycznie znamienny spadek IFN po 6 miesiącach od zacementowania (Tab. 6 i ryc 15 a, b).

W płynie szczeliny dziąsłowej szczęki górnej i dolnej stężenie IL-8 było znacznie podwyższone po tygodniu i sześciu miesiącach od momentu zacementowania koron w szczęce i w żuchwie (Tab. 6 i ryc. 16 a, b).

Stwierdzono statystycznie istotne różnice między szczęką a żuchwą w przebiegu zmian stężenia IL-10 po zacementowaniu: w szczęce nie zmieniało się, natomiast w żuchwie było podwyższone względem kontroli po tygodniu i sześciu miesiącach od momentu zacementowania koron (Tab. 6 i ryc. 17).

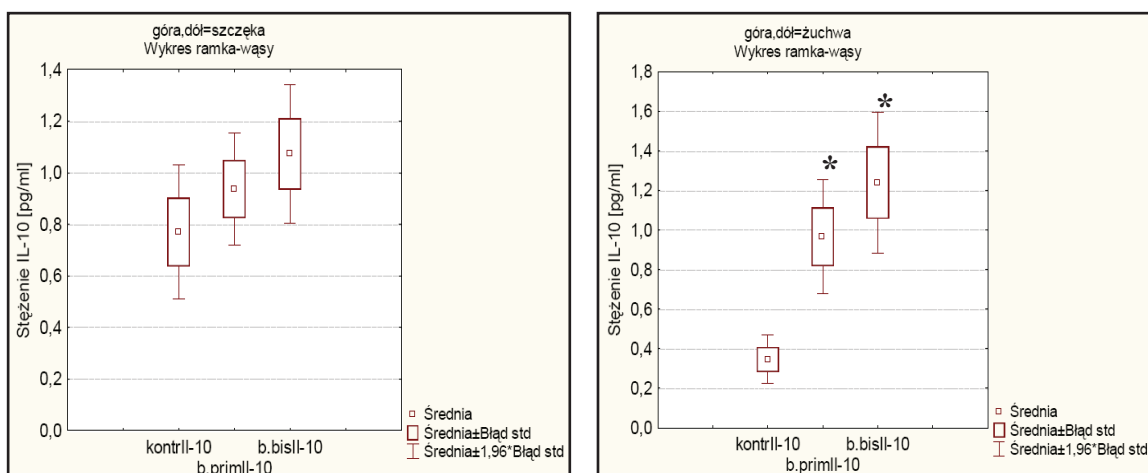
Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



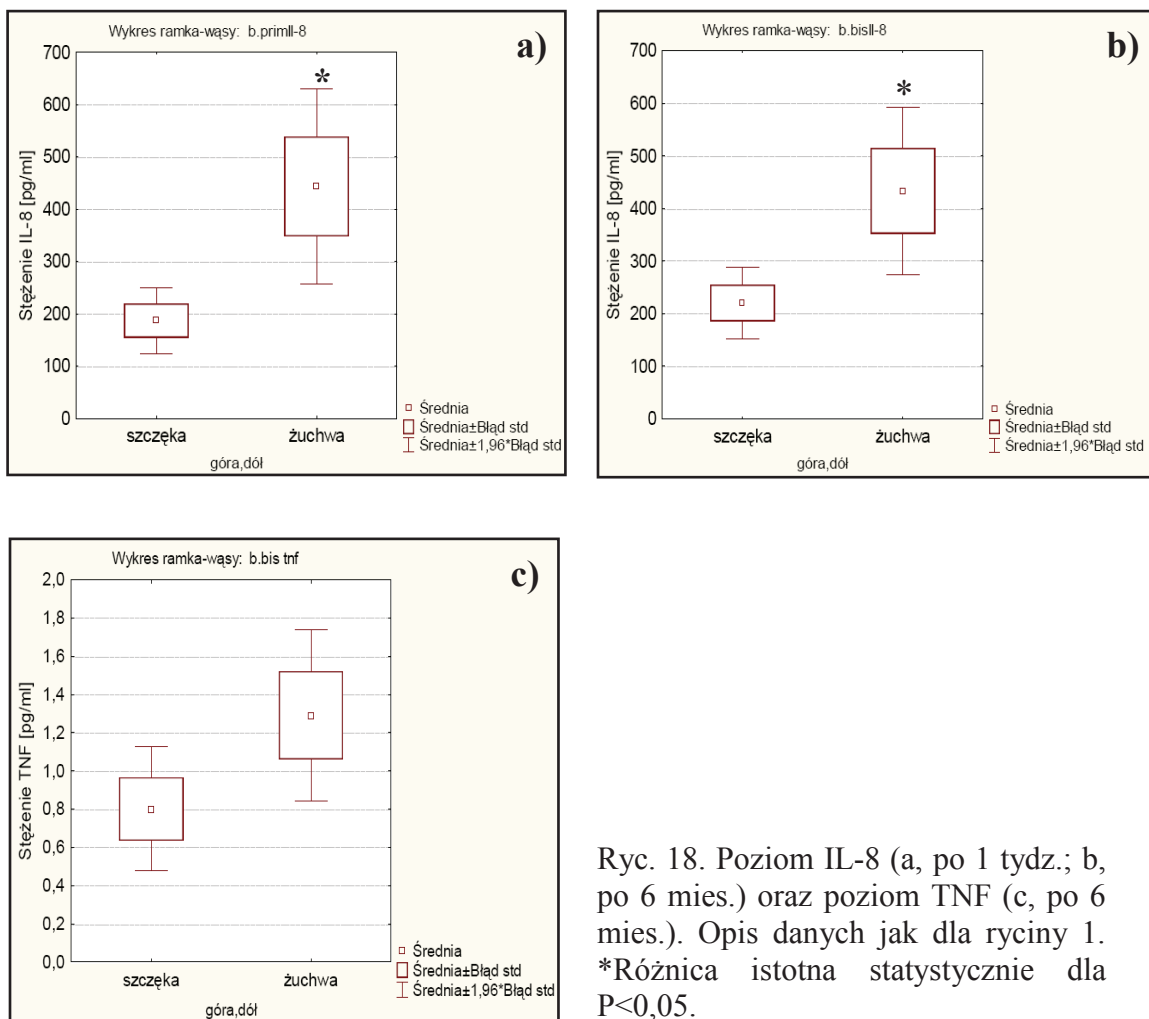
Ryc. 15. Poziom INF (a, szczęka; b, żuchwa) oraz TNF (c, żuchwa). Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P < 0.05$.

Ryc. 16. Poziom IL-8 (a, szczęka; b, żuchwa) po 1 tygodniu i 6 miesiącach od preparatyki. Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P < 0.05$.

Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



Ryc. 17. Poziom IL-10 (a, szczęka; b. żuchwa) po 1 tygodniu i 6 miesiącach od preparatyki. Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P < 0,05$.



Ryc. 18. Poziom IL-8 (a, po 1 tydz.; b, po 6 mies.) oraz poziom TNF (c, po 6 mies.). Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P < 0,05$.

4.6 Ocena wpływu umiejscowienia koron na stężenia cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej

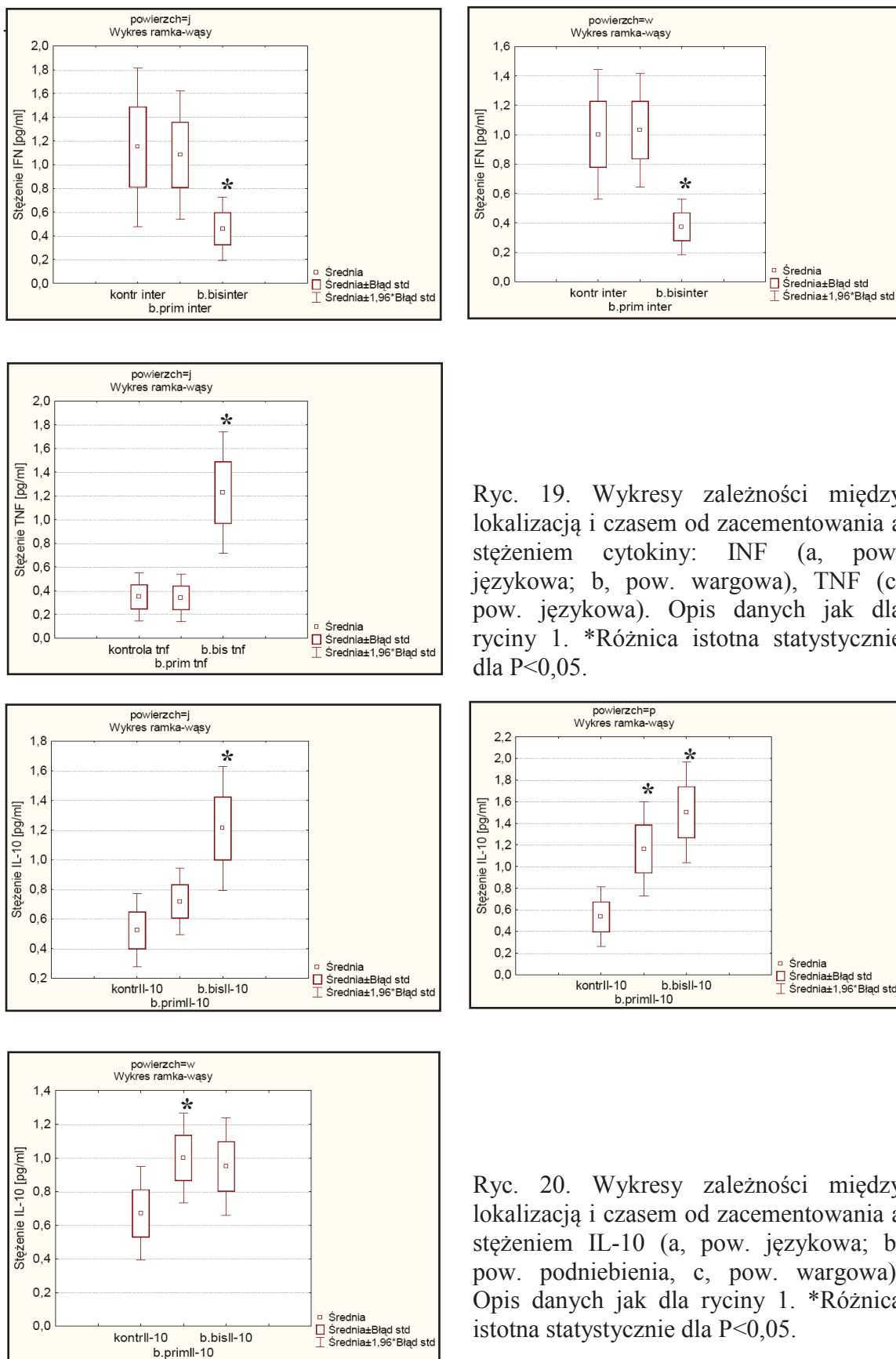
Tabela 7. Stężenie cytokin w szczelinie dziąsłowej od strony wargowej i podniebiennej zależności. Ocena wpływu lokalizacji koron na stężenie cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej. Wartości przedstawiają średnie oraz odchylenie standardowe (pg/ml). Opis jak w tabeli nr 4.

	Kontrol a	T1	T2	Kontrol a	T1	T2	Kontrol a	T1	T2
	p. warg	p. warg	p. warg	p. pod	p. pod	p. pod	p. jęz	p. jęz	p. jęz
TNF	0,43 ± 0,12	0,63 ± 0,34	0,92 ± 0,57*	0,51 ± 0,23	0,53 ± 0,34	0,85 ± 0,39	0,35 ± 0,23	0,34 ± 0,21	1,23 ± 0,63* ^A
IFN	0,98 ± 0,46	1,04 ± 0,55	0,37 ± 0,13** ^A	0,57 ± 0,41	0,95 ± 0,39	0,64 ± 0,28	1,17 ± 0,45	1,1 ± 0,32	0,46 ± 0,23* ^A
IL-8	26,5 ± 6,29	257,45 ± 39,45**	246,94 ± 65,32**	28,06 ± 12,7	572,56 ± 87,3**	524,45 ± 78,1**	30,32 ± 12,87	155,11 ± 54,5**	257,52 ± 34,98**
IL-10	0,68 ± 0,34	1,01 ± 0,46*	0,95 ± 0,56	0,53 ± 0,31	1,16 ± 0,76*	1,5 ± 0,87*	0,53 ± 0,32	0,72 ± 0,32	1,21 ± 0,39*
IL-12	1,6 ± 0,73	2,04 ± 0,78	2,04 ± 0,87	2,02 ± 0,76	2,23 ± 0,49	2,56 ± 0,51	1,78 ± 0,98	1,69 ± 0,45	1,92 ± 0,73

Oznaczenia symboli w Tabeli takie jak w opisie Tabeli 4.

Uzyskane dane wskazują, iż w przypadku powierzchni językowej i wargowej zaobserwowano spadek wydzielania IFN-γ po sześciu miesiącach od zacementowania koron w porównaniu do kontroli (tab. 7, ryc. 19 a i b). Stwierdzono, iż po tygodniu od zacementowania koron nie nastąpiła zmiana poziomu TNF-α dla powierzchni językowej, natomiast po sześciu miesiącach stężenie tej cytokiny było znacząco wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. Stwierdzono statystycznie istotny wzrost ekspresji IL-10 po tygodniu (powierzchnia wargowa i podniebienna) i po sześciu miesiącach od zacementowania korony (powierzchnia podniebienna i językowa) (ryc. 20). Stwierdzono statystycznie istotne różnice w poziomie ekspresji IL-8 po tygodniu i sześciu miesiącach od momentu zacementowania koron po stronie językowej, podniebiennej i wargowej. We wszystkich tych przypadkach nastąpił wzrost ekspresji IL-8, przy czym był on najsilniej zaznaczony w przypadku powierzchni podniebiennej, gdzie poziom tej cytokiny (po jednym tygodniu oraz sześciu miesiącach) były ponad dwukrotnie wyższe od tych obserwowanych dla pozostałych lokalizacji (ryc. 21). W przypadku IL-12 nie zaobserwowano znaczących różnic w zależności od lokalizacji korony, przy czym same poziomy we wszystkich przypadkach były bardzo niskie (tabela 7).

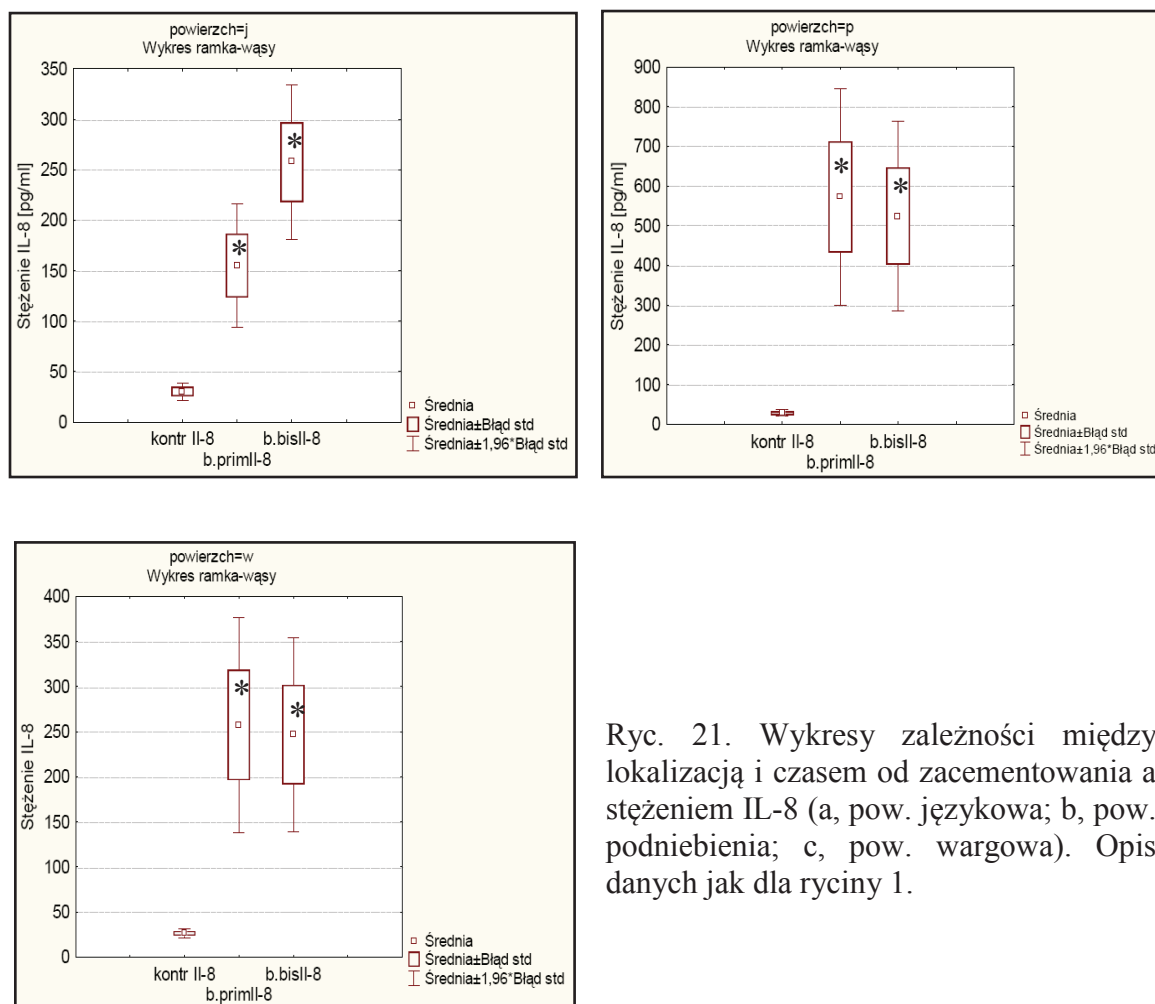
Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



Ryc. 19. Wykresy zależności między lokalizacją i czasem od zacementowania a stężeniem cytokiny: INF (a, pow. językowa; b, pow. wargowa), TNF (c, pow. językowa). Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P < 0,05$.

Ryc. 20. Wykresy zależności między lokalizacją i czasem od zacementowania a stężeniem IL-10 (a, pow. językowa; b, pow. podniebienia, c, pow. wargowa). Opis danych jak dla ryciny 1. *Różnica istotna statystycznie dla $P < 0,05$.

Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



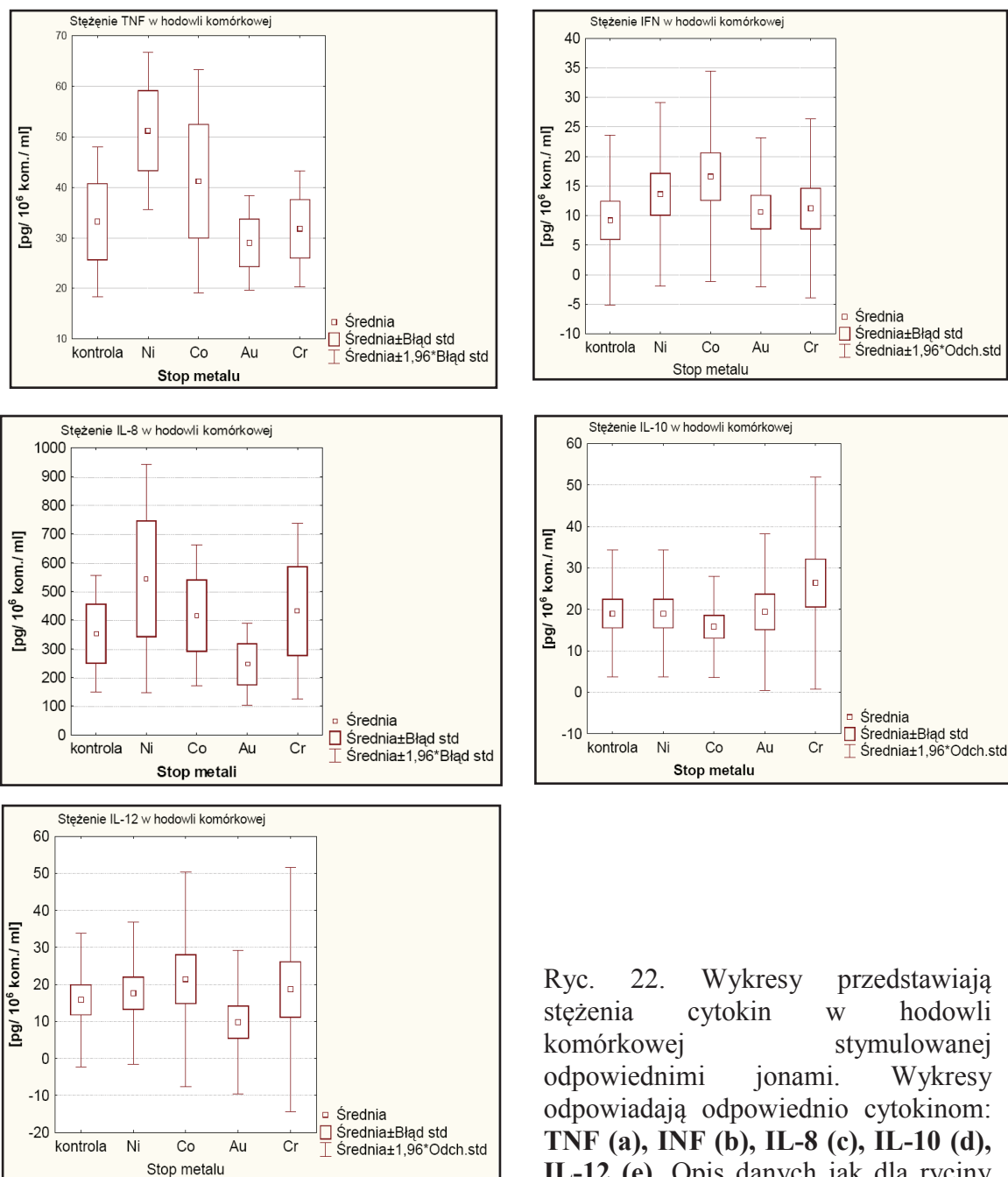
Ryc. 21. Wykresy zależności między lokalizacją i czasem od zacementowania a stężeniem IL-8 (a, pow. językowa; b, pow. podniebienia; c, pow. wargowa). Opis danych jak dla ryciny 1.

4.7 Wpływ jonów metali na sekrecję cytokin przez keratynocyty hodowane w warunkach *in vitro*

Do pomiaru stężenia poszczególnych cytokin wykorzystano medium hodowlane zbierane z nad keratynocytów traktowanych odpowiednimi jonami: niklu (Ni), kobaltu (Co), złota (Au) lub chromu (Cr), głównymi składnikami stopów koron, przez okres 48 godzin (rozdział „Metody”). Wartości, jakie przedstawiają wykresy stanowią średnie stężenia cytokin po przeliczeniu na 10^6 komórek.

Po przeprowadzeniu wstępnych badań dotyczących zakresu stężeń badanych jonów, dla każdego jonu wybrano jedno stężenie medium inkubacyjnym hodowanych komórek. Wartości te wynosiły odpowiednie dla: Au – 20 μM (w formie $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Co – 100 μM ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Ni – 100 μM ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Cr – 200 μM ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Wyniki przedstawione na Ryc. 22 wskazują, iż poszczególne jony nie wykazywały istotnie statystycznego wpływu na wydzielanie badanych cytokin. W przypadku $\text{TNF-}\alpha$, poziom tej cytokiny nieznacznie się podniósł po działaniu na komórki jonami niklu oraz kobaltu (wzrost nie był jednak istotny statystycznie). Dla pozostałych jonów poziom tego czynnika był porównywalny z kontrolą (ryc. 22a). Poszczególne jony również nie indukowały w hodowli wydzielania $\text{IFN-}\gamma$ (poziom zbliżony do kontroli). Na uwagę jednak zasługuje bardzo niskie stężenie tej cytokiny we wszystkich próbkach (ryc. 22b). Niewielki wzrost IL-8 obserwowany był natomiast po działaniu na komórki jonami niklu (bez istotności statystycznej). Dla pozostałych jonów poziom tej cytokiny był zbliżony do kontroli (ryc. 22c). W przypadku cytokin IL-10 oraz IL-12 również nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między kontrolą a komórkami traktowanymi jonami (ryc. 22d, 24e).

Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów

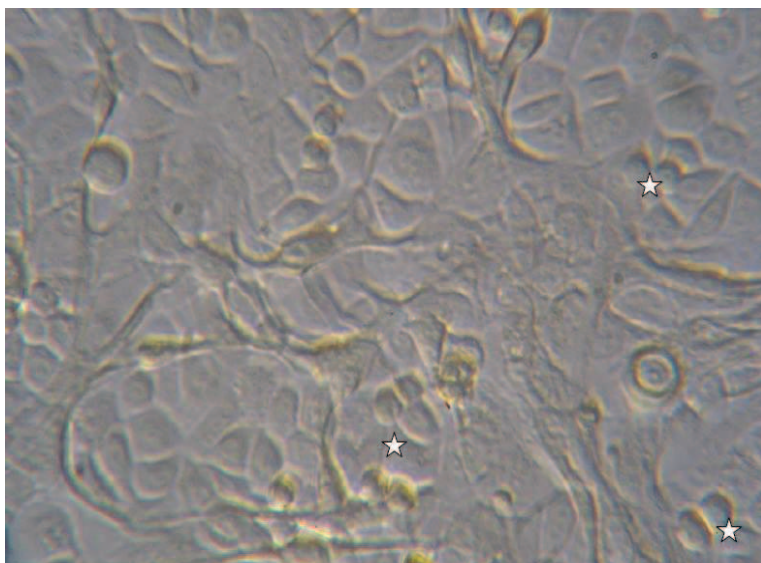


Ryc. 22. Wykresy przedstawiają stężenia cytokin w hodowli komórkowej stymulowanej odpowiednimi jonami. Wykresy odpowiadają odpowiednio cytokinom: **TNF (a), INF (b), IL-8 (c), IL-10 (d), IL-12 (e)**. Opis danych jak dla rycin

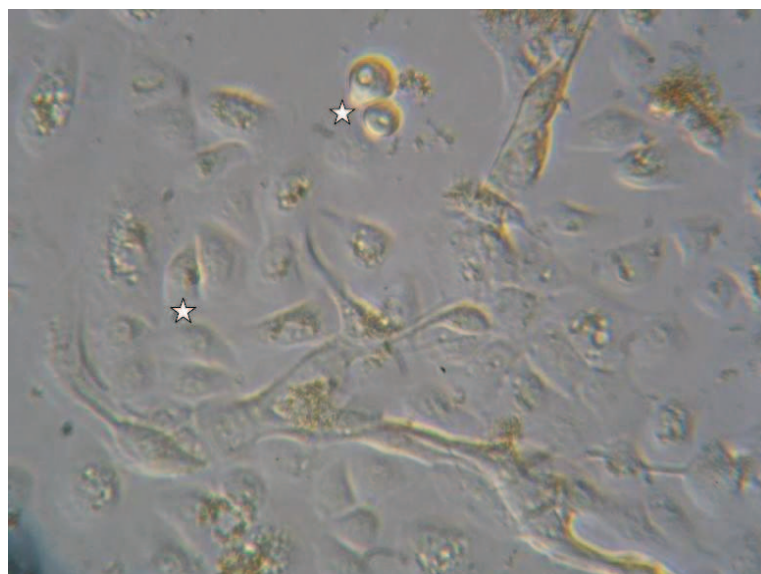
4.8 Wpływ jonów metali na morfologię keratynocytów jamy ustnej w hodowlach *in vitro*

Keratynocyty wyściełające błonę śluzową jamy ustnej należą do komórek o stosunkowo dużym potencjale proliferacyjnym. Stąd komórki te mogą być z powodzeniem hodowane *in vitro* i stanowić obiekt badań toksykologicznych i farmakologicznych. W niniejszej pracy wykorzystywano keratynocyty będące po pierwszym pasażu, które następnie stymulowano odpowiednimi związkami przez 48 godzin.

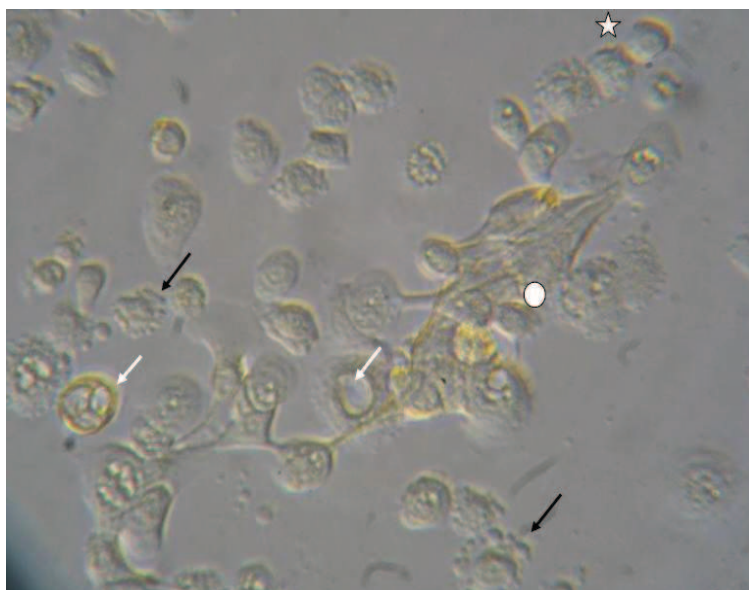
Opisywane poniżej ryciny pochodzą z hodowli *in vitro* po 48 godzinnej stymulacji badanymi jonami. Również po tym czasie zbierane było medium do późniejszego pomiaru stężenia cytokin. Rycina 23 obrazuje hodowlę keratynocytów bez stymulacji jonami (hodowla kontrolna). Widoczne jest pełne pokrycie szalki przez komórki (pełna konfluencja) łącznie z figurami mitotycznymi (gwiazdki), świadczącymi o wysokiej proliferacji komórek. Część komórek przybiera wrzecionowate kształty, co może wskazywać na indukcję wczesnego różnicowania komórek. W przypadku inkubacji komórek z jonami chromu w stężeniu 200 μM (ryc. 24) zauważalne było nieznaczne zahamowanie proliferacji komórek (mniejsza konfluencja), przy jednoczesnym braku znaczących zmian w ich morfologii w porównaniu do kontroli. Widoczne są jednak wciąż figury mitotyczne (gwiazdki), świadczące o ciągłych podziałach komórek. Zauważalne jest również wytwarzanie przez komórki macierzy zewnątrzkomórkowej (koło, ryc. 24), większe niż w przypadku kontroli. Po inkubacji z jonami niklu w stężeniu 100 μM (rycina 25) zaobserwowano znaczące zmniejszenie konfluencji, z jednoczesnym pojawieniem się komórek apoptotycznych (czarna strzałka na ryc. 25). Widoczne są również komórki zawierające wakuole (białe strzałki, ryc. 25), mogące sugerować proces autofagocytozy. W przypadku tej hodowli zaznaczona jest również obecność macierzy zewnątrzkomórkowej (koło, ryc. 25). Podczas inkubacji komórek z jonami kobaltu w stężeniu 100 μM (rycina 26), obserwowano zmiany w morfologii komórek zbliżone do tych obserwowanych pod wpływem niklu. Widoczne było również zahamowanie proliferacji oraz pojawienie się komórek o cechach apoptotycznych. Natomiast wciąż widoczne były podziały mitotyczne (gwiazdka, ryc. 26), z bardzo ubogą substancją międzykomórkową. Inkubacja keratynocytów z jonami złota w stężeniu 20 μM (ryc. 27) wywołała niewielkie zmiany w ich morfologii: część komórek przybierała kształt podłużny i wrzecionowaty, część okrągły i regularny. Widoczne były również komórki zawierające wakuole (biała strzałka, ryc. 27) oraz niewielka ilość substancji międzykomórkowej (koło, ryc. 27).



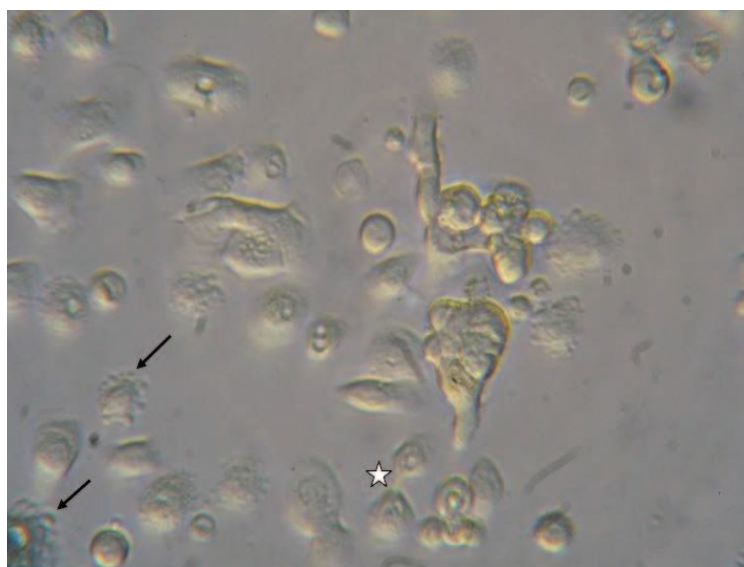
Ryc. 23. Obraz hodowli kontrolnej keratynocytów (brak jonów w medium). Opis w tekście. Mikroskop odwrócony, 200X.



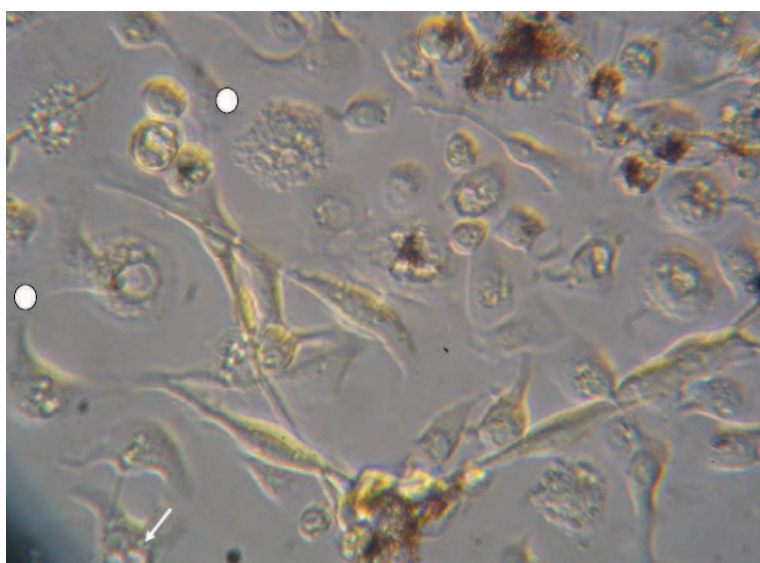
Ryc. 24. Obraz hodowli keratynocytów po inkubacji z jonami chromu. Opis w tekście. Powiększenie 200X.



Ryc. 25. Obraz hodowli keratynocytów po inkubacji z jonami niklu. Opis w tekście. Powiększenie 200X.



Ryc. 26. Obraz hodowli keratynocytów po inkubacji z jonami kobaltu. Opis w tekście. Powiększenie 200X.



Ryc. 27. Obraz hodowli keratynocytów po inkubacji z jonami złota. Opis w tekście. Powiększenie 200X.

4.9 Analiza mikrobiologiczna płynu kieszonki dziąsłowej

Analiza mikrobiologiczna została przeprowadzona dla 65 pacjentów. Od każdego pacjenta pobierano płyn ze szczeliny dziąsłowej zęba przed oszlifowaniem (n=65) oraz płyn ze szczeliny przy danej koronie (w sumie n=95 prób). Analizowano materiał pochodzących z 25 koron ze stopu Au, 30 ze stopu Cr-Co oraz 40 ze stopu Cr-Ni. Otrzymano 1032 dodatnie jakościowe i ilościowe wyniki posiewów mikrobiologicznych, z czego 523 wyników odpowiadało bakteriom beztlenowym, 360 obejmowały bakterie tlenowe i względnie beztlenowe, 93 bakterie mikroaerofilne i 41 wyniki dodatnie dla grzybów drożdżakopodobnych.

Zestawienie wyników jakościowych przedstawiono w Tabelach 8-10. Uzyskane dane wskazują na to, iż po okresie 6 miesięcy od oszlifowania koron, w płynie szczeliny dziąsłowej, dochodzi do znacznego zwiększenia częstości występowania bakterii beztlenowych (tabela 8) oraz tlenowych i względnie beztlenowych (tabela 9), a także bakterii mikroaerofilnych (tabela 10).

Tabela 8. Bakterie beztlenowe wyizolowane z płynu szczeliny dziąsłowej w obrębie analizowanych koron (próby badane) oraz zębów zdrowych (próby kontrolne).

Bakterie beztlenowe	Częstość izolacji szczepów bakteryjnych	
	Próby badane	Próby kontrolne
Gram-ujemne pałeczki:		
<i>Prevotella buccae</i>	2	1
<i>Prevotella buccalis</i>	20	13
<i>Prevotella denticola</i>	32	8
<i>Prevotella intermedia</i>	36	9
<i>Prevotella loescheii</i>	5	2
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	15	7
<i>Prevotella oralis</i>	37	13
<i>Prevotella oris</i>	8	1
<i>Prevotella veroralis</i>	1	1
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	24	5
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	17	6
<i>Tannerella forsythia</i>	15	5
<i>Bacteroides fragilis</i>	6	4
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	17	2
Gram-ujemne ziarniaki:		
<i>Veillonella atypia</i>	1	1
<i>Veillonella parvula</i>	1	1
Gram-dodatnie ziarniaki:		
<i>Anaerococcus prevotii</i>	1	0
<i>Anaerococcus tetradius</i>	1	0
<i>Finegoldia magna</i>	22	8
<i>Parvimonas micra</i>	35	18
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	2	0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	4	0
<i>Ruminococcus productus</i>	4	7
Gram-dodatnie pałeczki:		
<i>Actinomyces israelii</i>	28	11
<i>Actinomyces naeslundii</i>	9	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	19	9
<i>Actinomyces viscosus</i>	2	3
<i>Eggerthella lenta</i>	5	3
<i>Propionibacterium acnes</i>	3	1
<i>Propionibacterium granulosum</i>	1	1
<i>Propionibacterium propionicum</i>	6	0
Bakterie beztlenowe łącznie	382^{***}	141

*** Znamiennie różne od prób kontrolnych, $p < 0.001$, test Wilcoxona.

Tabela 9. Bakterie tlenowe i względnie beztlenowe wyizolowane z płynu szczeliny dziąsłowej w obrębie analizowanych koron (próby badane) oraz zębów zdrowych (próby kontrolne).

Bakterie tlenowe i względnie beztlenowe	Częstość izolacji szczepów	
	Próby badane	Próby kontrolne
Gram-ujemne pałeczki:		
<i>Escherichia coli</i>	1	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	6
<i>Pseudomonas stutzerii</i>	4	1
Gram-ujemne pałeczki niefermentujące	17	21
Inne Gram-ujemne pałeczki	49	10
Gram-ujemne ziarniaki:		
<i>Neisseria spp.</i>	7	1
Gram-dodatnie pałeczki:		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5	3
<i>Lactobacillus spp.</i>	4	4
<i>Corynebacterium spp.</i>	1	2
<i>Nocardia spp.</i>	2	1
Gram-dodatnie ziarniaki:		
<i>Streptococcus mutans</i>	3	3
<i>Streptococcus sanguinis</i>	4	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	4
<i>Streptococcus spp.</i>	89	41
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	1
<i>Enterococcus spp.</i>	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	7
<i>Staphylococcus spp.</i>	7	8
<i>Micrococcus spp.</i>	1	4
Inne Gram-dodatnie ziarniaki	14	4
Bakterie tlenowe i względnie beztlenowe łącznie	238 *	122

* Znamienne różnice od prób kontrolnych, $p < 0.05$, test Wilcoxona.

Tabela 10. Bakterie mikroaerofilne wyizolowane z płynu szczeliny dziąsłowej w obrębie analizowanych koron oraz zębów zdrowych.

Bakterie mikroaerofilne	Częstość izolacji szczepów	
	Próby badane	Próby kontrolne
Gram-ujemne pałeczki: <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Campylobacter gracilis</i>	17 24 12	9 8 8
Gram-dodatnie pałeczki: <i>Corynebacterium matruchotii</i>	8	7
Bakterie mikroaerofilne łącznie	61*	32

* Znamienne różnie od prób kontrolnych, $p < 0.05$, test Wilcoxona.

4.9.1 Ocena wpływu stopu na środowisko mikrobiologiczne kieszonki dziąsłowej

Dokonano analizy statystycznej częstości występowania poszczególnych grup mikroorganizmów w płynie szczeliny dziąsłowej. Na Ryc. 28. przedstawiono zestawienie ilościowe oznaczeń mikrobiologicznych w zależności od materiału stopu: Au, Co, Ni. Zaobserwowano ogólną tendencję do zwiększenia ilości posiewów dodatnich w badaniu w stosunku do kontroli niezależnie od grup mikroorganizmów oraz użytych stopów; zaobserwowano zwiększenie ilości grzybów drożdżakopodobnych w badaniu w stosunku do kontroli ($P = 0,04$, test U-Manna-Whitney'a), różnice te dotyczyły głównie stopów Au oraz Ni, gdzie stwierdzono mniejszą ilość grzybów w kontroli w stosunku do badanych stopów ($P = 0,02$, $P = 0,04$; test U-Manna-Whitney'a). Wyjątek stanowi zmniejszona ilość posiewów bakterii beztlenowych w przypadku stopów Au ($P = 0,04$, test U-Manna-Whitney'a). Nie stwierdzono innych zależności statystycznych pomiędzy materiałem stopu a ilością wyhodowanych kolonii mikroorganizmów.

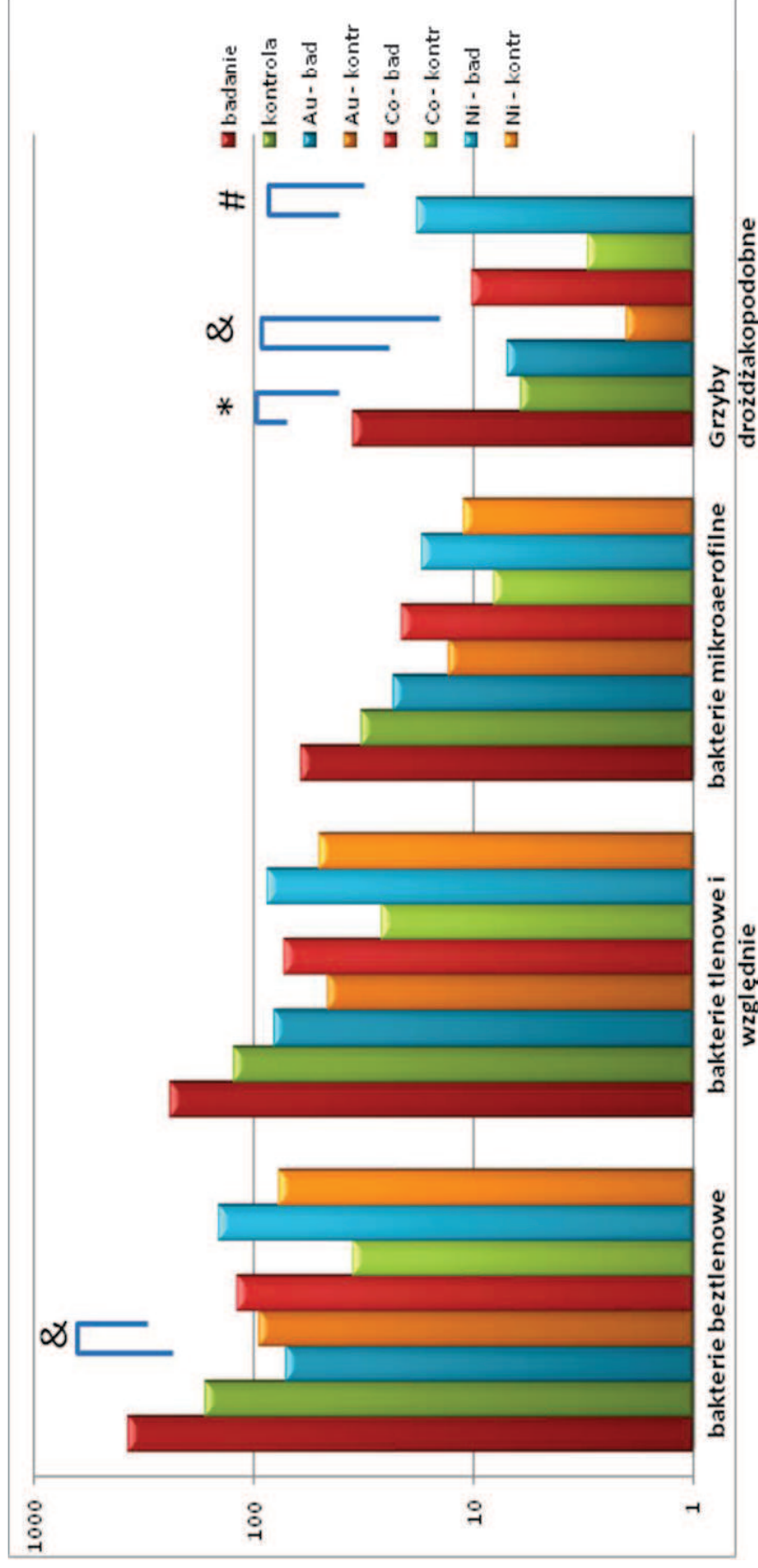
Oznaczenie ilościowe mikroorganizmów cechowało się dużym rozrzutem wyników (10^0 - 10^9), stąd też podano wyniki mediany razem z wartością średnią i odchyleniem standardowym (Tab. 11), natomiast na wykresach przedstawiono średnią i średni błąd średniej (Ryc. 28). Z wyjątkiem stopów złota, zaobserwowano ogólną tendencję do wyższego miana mikroorganizmów w płynie szczeliny dziąsłowej po badaniu

(„założeniu” korony) w stosunku do stanu wyjściowego (kontrola). Zaobserwowano zmniejszone miano bakterii beztlenowych oraz beztlenowych w badaniu ze stopami Au w stosunku do kontroli (odpowiednio $P=0,01$ oraz $P=0,04$, test U-Manna-Whitney’a). Podobne zależności zanotowano dla Au w przypadku organizmów mikroaerofilnych oraz grzybów (odpowiednio $P=0,03$ i $P=0,04$). Z drugiej strony zanotowano zwiększoną ilość bakterii tlenowych, organizmów aerofilnych oraz grzybów w stopach Co w badaniu w stosunku do kontroli (odpowiednio $P=0,002$, $P=0,01$ i $P=0,008$, test U-Manna-Whitney’a) (Ryc. 28). W przypadku stopów Ni zanotowano zwiększone miano organizmów mikroaerofilnych w badaniu ($P=0,03$, test U-Manna-Whitney’a). Dla bakterii beztlenowych oraz grzybów również zaobserwowano tendencję do wzrostu miana w badaniu, jednak prawdopodobnie ze względu na duży rozrzut wyników (beztlenowce) oraz zbyt małą ilość oznaczeń (grzyby), różnice te nie były istotne statystycznie.

Tab. 11. Zestawienie wyników posiewów mikrobiologicznych płynu szczeliny dziąsłowej z rodzajem materiału korony protetycznej.

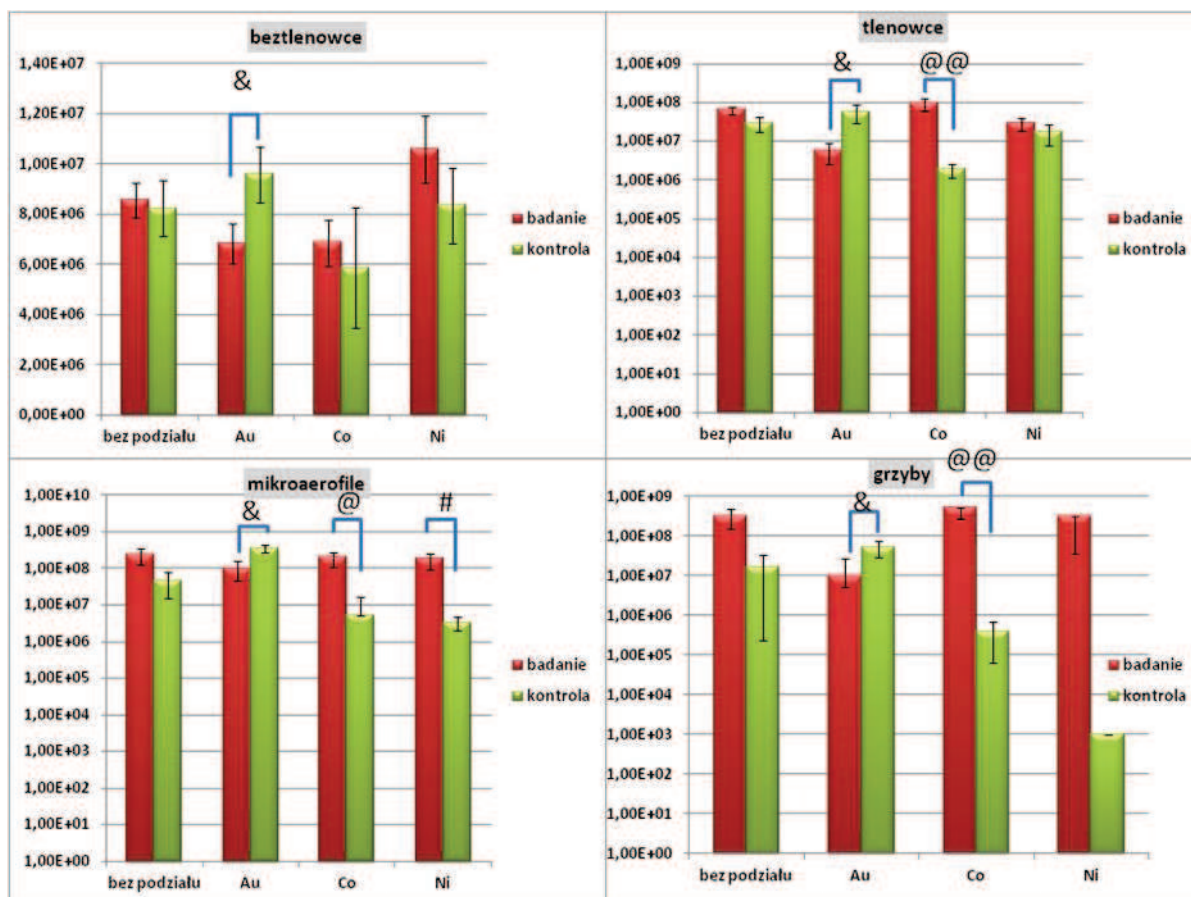
Materiał stopu	Pomiar	Bakterie beztlenowe [x10 ⁶]				Bakterie tlenowe i względnie beztlenowe [x10 ⁶]				Bakterie mikroaerofilne [x10 ⁶]				Grzyby drożdżakopodobne [x10 ⁶]			
		Liczba pos. dod.	Średnia	OS	mediana	Liczba pos. dod.	Średnia	OS	mediana	Liczba pos. dod.	średnia	OS	mediana	Liczba pos. dod.	średnia	OS	mediana
Bez podziału	Badanie	361	8,58	13,4	5,0	238	64,9	234,4	1,00	61	235,5	818,2	3,00	35*	310,6	919,2	10,00*
	kontrola	141	8,23	14,2	1,0	122	30,2	136,3	1,00	32	463,7	177,9	1,00	6*	1,69	40,7	0,09*
Au	Badanie	91	6,81 ^{&}	6,67	2,0 ^{&}	80	58,8 ^{&}	28,9	1,00 ^{&}	23	102,4 ^{&}	273,0	0,5 ^{&}	7 ^{&}	10,0 ^{&}	12,9	0,1 ^{&}
	kontrola	69	9,58*	10,6	9,0*	46	59,6 ^{&}	205,4	10,0 ^{&}	13	353,3 ^{&}	257,8	1,0 ^{&}	2 ^{&}	50,00 ^{&}	30,7	50,0 ^{&}
Co	Badanie	113	6,86	9,93	5,0	72	93,2 ^{@@}	276,0	1,00 ^{@@}	21	196,0 [@]	400,1	5,00 [@]	10	502,0 ^{@@}	706,6	8,00 ^{@@}
	kontrola	37	5,86	14,2	1,0	26	18,7 ^{@@}	36,7	10,0 ^{@@}	8	15,1 [@]	34,6	0,30 [@]	3	0,37 ^{@@}	0,54	0,1 ^{@@}
Ni	Badanie	157	10,6	16,0	10,0	86	29,3	93,8	1,00	17	179,3 [#]	350,6	5,00 [#]	18 [#]	313,1	1170,1	10,00
	kontrola	55	8,35	13,2	1,0	50	18,0	72,6	1,00	11	3,32 [#]	4,53	0,10 [#]	1 [#]	0,001	0	0,001

Wyniki mikrobiologiczne płynu dla: 1) wszystkich koron (Badanie, bez podziału na rodzaj materiału stopu), 2) z podziałem na rodzaj materiału (skład jonowy) korony (Badanie, Au, Co i Ni) oraz 3) kontroli; N – liczba posiewów dodatnich. * - p < 0,05 pomiędzy całością badanych i kontrolnych pomiarów; [&] - p < 0,05 dla stopów Au między B a K, [@], - p < 0,05, ^{@@} P < 0,01 dla stopów Co między B a K; [#] - p < 0,05 dla stopów Ni między B a K. Zastosowano test U Manna-Whitneya.



Ryc. 28. Zestawienie ilości dodatnich posiewów mikrobiologicznych z kieszonki dziąsłowej w zależności od użytych w koronach stopów: Au, Co, Ni. Badanie – posiewy ze szczeliny dziąsłowej dla wszystkich badanych koron, kontrola – posiewy ze szczeliny dziąsłowej kontrolnej. Słupki – sumaryczna ilość posiewów dla danej grupy mikroorganizmów, oś Y – skala logarytmiczna. * - $p < 0,05$ pomiędzy całością badanych i kontrolnych pomiarów; & - $p < 0,05$ dla stopów Au między grupą badaną a kontrolną; # - $p < 0,05$ dla stopów Ni między między grupą badaną a kontrolną. Zastosowano test U Manna-Whitneya.

Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



Ryc. 29. Miano głównych grup mikrobiologicznych oznaczonych w kieszonkach dziąsłowych dla stopów Au, Co, Ni. Oś Y – skala logarytmiczna, słupki – średnie, wąsy – średni błąd średniej (SEM). & - $P < 0,05$ dla stopu Au między grupami między grupą badaną a kontrolną, @, @@ - $p < 0,05$, $p < 0,01$ dla stopów Co między B a K, # - $p < 0,05$ dla stopów Ni między grupą badaną a kontrolną. Zastosowano test U Manna-Whitneya.

Tab. 12. Zestawienie ilościowo-jakościowe analizy występowania *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* oraz *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* w szczelinach dziąsłowych w zależności od użytego stopu.

Material stopu	Pomiar	<i>Porphyromonas gingivalis</i> [x10 ⁶]				<i>Prevotella intermedia</i> [x10 ⁶]				<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> [x10 ⁶]			
		Liczba pos. dodatnich	Średnia	OS	mediana	Liczba pos. dodatnich	Średnia	OS	mediana	Liczba pos. dodatnich	średnia	OS	mediana
Bez podziału	Badanie	24	10,90	16,46	5,00	36	7,80	11,80	2,50	17	237,96 *	398,26	6,00 *
	kontrola	5	10,22	12,03	10,00	9	7,29	9,66	5,00	9	11,91 *	33,07	0,10 *
Au	Badanie	7	3,77 &	5,54	0,20 &	5	0,96 &&	2,15	10,00 &&	4	0,49 &	0,53	0,48 &
	kontrola	2	10,00 &	0,00	10,00 &	17	7,96 &&	12,32	1,00 &&	3	33,62 &	27,49	0,80 &
Co	Badanie	8	4,50	4,31	3,00	9	6,60	6,59	6,00	5	202,48	445,85	1,00
	kontrola	1	0,10	0,00	0,10	1	0,03	0,00	0,03	1	0,10	0,00	0,10
Ni	Badanie	9	18,24	19,98	10,00	10	8,62	15,18	2,50	8	378,88 ##	439,46	255,00 ##
	kontrola	2	15,50	20,51	15,50	3	5,03	4,95	5,00	5	1,25 ##	2,13	0,10 ##

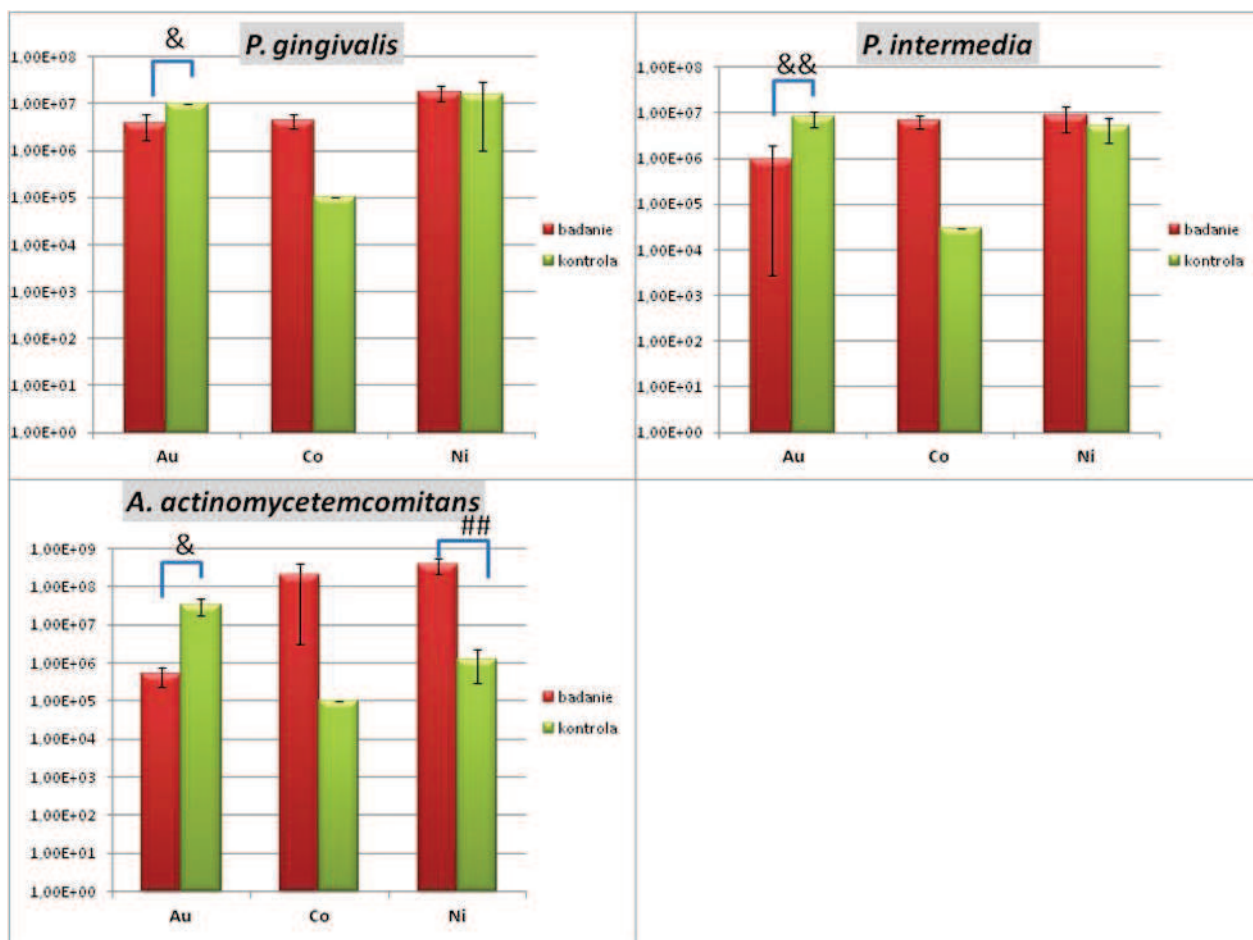
Wyniki badań mikrobiologicznych płynu szczeliny dziąsłowej dla: 1) wszystkich koron (Badanie, bez podziału na rodzaj materiału stopu), 2) z podziałem na korony (Badanie, Au, Co i Ni) oraz 3) Kontroli; N – liczba posiewów dodatnich. * - p < 0,05 pomiędzy całością badanych i kontrolnych pomiarów & & - odpowiednio P < 0,05, P < 0,01 dla stopu Au między między grupą badaną a kontrolną, ## - p < 0,01 dla stopów Ni między grupą badaną a kontrolną. Zastosowano test U Manna-Whitneya.

4.9.2 Analiza występowania wybranych gatunków mikroorganizmów w szczelinach dziąsłowych koron protetycznych na bazie Au, Ni, Co

Dokonano analizy jakościowo-ilościowej występowania bakterii beztlenowych *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* oraz mikroaerofilu *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Szczegółowe zestawienie przedstawiono w tab. 12, natomiast zestawienie ilościowe zaprezentowano na ryc. 30.

Zanotowano zwiększenie liczby *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* w grupie badanej w stosunku do kontroli ($P=0,02$, test U Manna-Whitneya). Różnica ta była spowodowana znacznym zwiększeniem liczby tego patogenu w przypadku Ni ($P=0,003$, test U Manna-Whitneya), natomiast dla stopów Au zanotowano obniżenie liczby *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* w badaniu w stosunku do kontroli ($P=0,02$, test U Manna-Whitneya). Również w przypadku pozostałych patogenów zaobserwowano obniżenie ich liczby w badaniu dla stopów Au ($P=0,04$ dla *Porphyromonas gingivalis* oraz $P=0,007$ dla *Prevotella intermedia*, test U-Manna-Whitneya). Pomimo zwiększonego występowania powyższych patogenów w przypadku koron wykonanych ze stopu Cr-Co w grupie badanej nie zanotowano istotności statystycznych względem kontroli. Stwierdzono obniżenie liczby pałeczek *Prevotella intermedia* oraz bakterii mikroaerofilnej z gatunku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* w przypadku stosowania Au w stosunku do kontroli oraz obniżenie liczby *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* w przypadku stosowania stopów Cr-Ni.

Wpływ stopów metali stanowiących podbudowę porcelanowych koron protetycznych na ekspresję cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i hodowlach keratynocytów



Ryc. 30. Zestawienie ilościowe mikroorganizmów patogennych w zależności od materiału korony protetycznej. Oś Y – skala logarytmiczna, słupki – wartości średnie, wąsy – średni błąd średniej (SEM). &, && - $P < 0,05$, $P < 0,01$ dla stopu Au między grupami B i K, ## - $p < 0,01$ dla stopów Ni między grupą badaną a kontrolną. Zastosowano test U Manna-Whitneya.

4.10 Podsumowanie wyników

1. Spośród 5 badanych cytokin, największy, kilkunastokrotny wzrost stężenia po zacementowaniu wystąpił w przypadku prozapalnej cytokiny - interleukiny 8, zarówno po tygodniu, jak i po 6 miesiącach od zacementowania w przypadku koron wykonanych ze wszystkich badanych stopów metali.
2. Wzrost stężenia IL-8 u był najwyższy w przypadku koron wykonanych ze stopów niklu, a najniższy dla koron wykonanych ze stopów złota.
3. W przypadku koron wykonanych bez stopnia poddziąsłowego zaobserwowano statystycznie istotny wyższy wzrost stężenia IL-8 w płynie szczeliny dziąsłowej w porównaniu do koron ze stopniem.
4. Zaobserwowano wyższe stężenia IL-8 w płynie szczeliny dziąsłowej zębów pokrytych koronami protetycznymi wykonanymi w żuchwie niż w szczęcie.
5. Zawartość pozostałych badanych cytokin, tj. TNF- α , IFN- γ , IL-10 oraz IL-12 w płynie kieszonki dziąsłowej była w warunkach kontrolnych niewielka, zaś po zacementowaniu albo nie zmieniała się, albo zmieniała się w niewielkim stopniu.
6. Statystycznie istotny spadek stężenia prozapalnej cytokiny IFN- γ w stosunku do kontroli wystąpił po 6 miesiącach od zacementowania w przypadku koron wykonanych ze stopów złota.
7. W przypadku interleukiny 10, zaobserwowano tendencję do wzrostu jej poziomu w płynie szczeliny dziąsłowej dla koron wykonanych ze stopów niklu, oraz statystycznie istotny wzrost stężenia dla koron wykonanych ze stopów kobaltu i stopów złota, zarówno po tygodniu jak i po 6 miesiącach od zacementowania.
8. Stężenie cytokiny TNF- α nie ulegało istotnym zmianom po zacementowaniu w przypadku koron wykonanych ze stopów kobaltu i złota, wzrosło jedynie po 6 miesiącach od zacementowania w przypadku koron wykonanych ze stopów niklu.
9. Rodzaj stopu i czas użytkowania koron nie wpływały na stężenie immunoregulacyjnej interleukiny 12 w płynie szczeliny dziąsłowej.
10. Zmiany w ekspresji TNF, IL-10 oraz IFN- γ pod wpływem działania koron były różne u

kobiet i mężczyzn; u kobiet widoczny był wzrost poziomu TNF- α oraz spadek IFN- γ natomiast u mężczyzn wykazano wzrost poziomu IL-10.

11. Jony kobaltu, niklu i złota obecne w medium hodowlanym keratynocytów izolowanych z błony śluzowej jamy ustnej nie powodowały istotnych zmian w wydzielaniu cytokin w hodowlach tych komórek.

12. Wszystkie analizowane jony metali wpływały na morfologię hodowanych keratynocytów, indukując przede wszystkim śmierć komórek, prawdopodobnie na drodze apoptozy.

13. Zmiany w morfologii keratynocytów były najbardziej widoczne w przypadku ich inkubacji z jonami niklu.

14. Po okresie 6 miesięcy od zacementowania koron, wyraźnemu zwiększeniu w płynie szczeliny dziąsłowej uległa częstość występowania bakterii beztlenowych, tlenowych i względnie beztlenowych, a także mikroaerofilnych.

15. Dla stopów złota zanotowano obniżenie liczby bakterii beztlenowych, tlenowych, mikroaerofilnych i grzybów, natomiast dla stopów niklu i kobaltu zaobserwowano wzrost liczby tych organizmów w stosunku do kontroli.

16. Zaobserwowano zmniejszone miano patogenów z gatunku *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* oraz mikroaerofilu pałeczek mikroaerofilnych z gatunku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* jedynie w przypadku stopów złota, dla pozostałych stopów nie wykazano różnic, bądź też zanotowano wzrost ilości tych patogenów w badaniu.

5. DYSKUSJA

5.1 Korony protetyczne metalowo ceramiczne – możliwe interakcje z tkankami

Zdrowe tkanki przyzębia są jednym z warunków powodzenia leczenia stomatologicznego z zastosowaniem koron protetycznych. Zdrowe tkanki umożliwiają prawidłową funkcję narządu żucia oraz zapewniają optymalną estetykę uzębienia. Reakcja przyzębia zębów pokrytych koronami protetycznymi zależy od wielu czynników, m.in. sposobu preparacji zębów pod korony, technicznego wykonania koron i biokompatybilności materiałów z których wykonano korony oraz od właściwości środowiska jamy ustnej. Stopy dentystyczne stosowane w wykonawstwie koron protetycznych uważane są za materiał biokompatybilny. Jednocześnie przyjmuje się, że w warunkach środowiska jamy ustnej stopy są podatne na procesy korozji. Stwierdzono również uwalnianie się jonów metali ze stopów dentystycznych do okolicznych tkanek przyzębia krótko po zacementowaniu koron wykonanych na bazie stopów metali. Bardziej odporne na korozję są stopy metali szlachetnych, mniej stopy metali nieszlachetnych. Na podstawie licznych badań wiadomo, iż w środowisku jamy ustnej metale wchodzi w reakcję chemiczną z różnymi substancjami niemetalicznymi tworząc związki chemiczne, które przyczyniają się do rozpoczęcia korozji. Metale szlachetne, takie jak złoto nie są podatne na utlenienie i nie korodują (Can i wsp., 2007; McGinley i wsp., 2011b). Na powierzchni metalu może dochodzić do odkładania produktów korozji czy słabo rozpuszczalnych związków metali, które obniżają szybkość korozji do wartości znikomych, a metal pozostaje wówczas w stanie pasywnym. Do pasywujących się metali należą chrom, nikiel, molibden, wolfram, tytan, cyrkon, cyna i glin. W przypadku zastosowania tych metali, w organizmie dochodzi do reakcji polegającej na wytwarzaniu cienkiej, spoistej i półprzepuszczalnej warstwy tlenku na powierzchni metalu. Powstająca warstwa silnie przylega do powierzchni stopu i wykazuje minimalną rozpuszczalność, przez co zabezpiecza stop przed dalszym utlenianiem. Gdy warstwa jest trwała, metal jest chroniony. W przypadku podstawowych stopów metali mamy właśnie do czynienia z pasywacją związaną z wytwarzaniem warstwy tlenków na stopach zawierających pasywujące się metale, tj. złoto, platynę, chrom, molibden czy tytan (Wylie i wsp., 2007).

Wyjątkowe właściwości środowiska jamy ustnej (ślina, pokarmy), powodują, że warstwa pasywna jest wytrzymała do pewnego momentu. Związane jest to z obecnością

dużej ilości jonów chlorkowych, białek i enzymów oraz kwaśnych metabolitów bakterii. Również indukowane przez bakterie, katodowe zjawiska depolaryzacyjne na powierzchni stopów sprawiają, że żaden z pasywnujących się, podstawowych stopów metali nie jest w stanie oprzeć się korozji biologicznej. Następuje uszkodzenie warstwy pasywnej i rozpoczyna się korozja, która wnika w głąb niszcząc ich strukturę. Wpływ na korozję stopów mają również takie czynniki jak spożywanie kwaśnych pokarmów, zmiany w składzie śliny, a także obecność komórek fagocytyzujących, które mogą znacząco wpływać na korozję i prowadzić do zapalenia przyzębia, aktywując ekspresję cytokin prozapalnych, takich jak TNF, IL-6 i IL-8 w komórkach przyzębia. Komórki fagocytyzujące są w tym przypadku aktywowane głównie przez uwalniające się jony metali oraz bakterie (LPS). Za ich aktywację odpowiadają głównie receptory TLR obecne na powierzchni monocytów i makrofagów (Kim i wsp., 2007).

Poza właściwościami środowiska biologicznego jamy ustnej ważnymi elementami warunkującymi prawidłowe utrzymanie uzupełnienia protetycznego są preparacja zęba oraz kształt uzupełnienia protetycznego, które w jak najmniejszym stopniu powinny ingerować w środowisko jamy ustnej. Istotą bowiem preparacji zęba pod koronę jest uzyskanie jednoznacznej granicy szlifowania w celu zapewnienia szczelności brzeżnej i gładkiego, bezschodkowego przejścia korony w tkanki zęba, co eliminuje mechaniczny uraz tkanek przyzębia i możliwość mechanicznej retencji drobnoustrojów w szczelinie dziąsłowej. Ważna jest również lokalizacja szyjki korony protetycznej. W badaniach przeprowadzonych przez Muller i Eger zauważono niewielkie zapalenie w tkankach dziąsła zębów okoronowanych z usytuowaniem brzegu korony protetycznej poddziąsłowo, podczas gdy naddziąsłowy brzeg koron nie powodował stanu zapalnego (Muller i Eger, 2002). Podobne obserwacje poczynili inni badacze, którzy stwierdzili, że naddziąsłowa preparacja jest bardziej przyjazna dla przyzębia, co ma znaczenie w przypadku leczenia protetycznego pacjentów z chorobami przyzębia. Na stan przyzębia zębów z zacementowanymi koronami ma wpływ również kształt korony protetycznej (Kohal i wsp., 2004; Moretti i wsp., 2011).

Stopom dentystycznym poza właściwościami mechanicznymi niezbędnymi do zastosowania w poszczególnych rodzajach uzupełnień protetycznych stawia się wymóg jak najwyższej odporności korozyjnej i dlatego każdy stop, przed wprowadzeniem do leczenia, powinien przejść szczegółowe badania odporności na korozję, a wykonanie uzupełnienia protetycznego na bazie stopu musi być zgodne z procedurami opracowanymi przez producenta stopu (Baricevic i wsp., 2011; Wataha i wsp., 2008). Korozji ulegają

wszystkie podstawowe stopy metali, a uwolnione w procesie korozji jony metali przenikają do otoczenia. Stężenia poszczególnych metali w jamie ustnej są bardzo różne. Udowodniono, iż u pacjentów użytkujących metalowe uzupełnienia protetyczne wzrasta ilość jonów metali w ślinie. Można je również wykryć w dziąśle sąsiadującym z metalowymi koronami protetycznymi (Kirkpatrick i wsp., 2002; Lopez-Alias i wsp., 2006). Odporność na korozję metalowych uzupełnień protetycznych zależy od wielu czynników, między innymi od: składu chemicznego i struktury krystalicznej użytego stopu, rozkładu pierwiastków, jednorodności odlewu, obecności jam skurczowych, sposobu wykonawstwa laboratoryjnego, struktury jego powierzchni, udziału w odlewie innego metalu, uszlachetnienia odlewu czy składu roztworu korozyjnego i jego pH. Również ślina o podwyższonej kwasowości, która dostaje się do wnętrza jam skurczowych, przez pulsacyjną zmianę ich objętości (podczas cyklicznych deformacji konstrukcji protetycznych w trakcie żucia), przyspiesza korozję materiału w wyniku tworzenia się ogniwa stężeniowego (Lopez-Alias i wsp., 2006; Garhammer i wsp., 2004). Większość metali tworzących korony może w odpowiednich warunkach podlegać procesowi korozji. Procesowi niszczenia korozyjnego towarzyszy przenikanie do otoczenia, odpowiedzialnych za szkodliwe działanie stopów, produktów korozji i/lub jonów metali. Jony metali, uwolnione w trakcie korozji mogą dostawać się do przewodu pokarmowego, gromadząc się w żołądku, wątrobie, śledzionie, nerkach i kościach. Jony metali, uwalniane ze stopów, gromadzą się w otaczających tkankach osiągając często bardzo wysokie stężenia, np. w tkankach przylegających bezpośrednio do implantów Cr-Co stężenie kobaltu wzrasta 300 do 6000 razy (McGinley i wsp., 2011b; Natarajan i wsp., 2011). Po przekroczeniu krytycznego stężenia, różnego dla poszczególnych metali, występują reakcje toksyczne i/lub alergiczne. Stopień szkodliwego działania metalowych konstrukcji protetycznych zależy głównie od ilości uwolnionych produktów korozji i/lub jonów metali pozostających w bezpośrednim związku z podatnością uzupełnień na korozję, ich wielkością jak i warunkami w jakich się one znajdują, takimi, jak m.in. obecność innego metalu w jamie ustnej, pH oraz mechanizm ich szkodliwego (toksycznego) działania.

W praktyce klinicznej stosuje się rutynowo wiele stopów różniących się składem i własnościami, ale nie wszystkie dostępne stopy są jednakowo przydatne. Powszechnie uważa się, że tytan, cyrkon, niob, tantal, platyna, a także złoto i metale z grupy platynowców nie są toksyczne. Ze zmniejszeniem się zawartości metalu szlachetnego w stopie zmniejsza się tolerancja biologiczna stopu, co jest związane ze spadkiem odporności korozyjnej i

szkodliwym działaniem uwalnianych w większej ilości produktów korozji i jonów metali (al-Hiyasat i wsp., 2002). Niska tolerancja biologiczna cechuje powszechnie stosowane stopy o niewielkiej zawartości metali szlachetnych (stopy na bazie srebra i palladu). Miedź i cynk, dodatkowe składniki tych stopów, zawsze były uważane za metale toksyczne, podczas gdy toksyczność srebra uzależniano od stanu jego połączenia w stopie. Pallad zaś, tak jak złoto, jest stosunkowo mało reaktywnym metalem. Badania biologiczne na zwierzętach dowiodły jednak, że pallad w znacznie większym stopniu niż srebro stymuluje ostre zapalenie przyzębia z wytworzeniem silnie unaczynionej tkanki ziarninowej (al-Hiyasat i wsp., 2002; Reddy i wsp., 2011).

Uważa się, że wśród wielu stopów metali stosowanych klinicznie, stopy Cr-Ni i Cr-Co cechuje najwyższy stopień szkodliwego działania, znacznie wyższy niż stopów metali szlachetnych. Potwierdzają to również obserwacje kliniczne stanu dziąseł będących w kontakcie z koronami wykonanymi ze stopów Cr-Ni w porównaniu ze stopami metali szlachetnych (McGinley i wsp., 2011b). Trzeba podkreślić, iż rzetelna ocena stopnia szkodliwego działania stopów metali jest stosunkowo trudna. Błony śluzowe, podobnie jak skóra, stanowią ważną barierę ochronną broniącą organizm przed działaniem szkodliwych czynników środowiska zewnętrznego. Narażenie ich na różne substancje chemiczne uwalniane z uzupełnień protetycznych, może prowadzić do wystąpienia reakcji zapalnych o podłożu nie-immunologicznym lub immunologicznym. Spośród reakcji o podłożu immunologicznym, w jamie ustnej rzadko występują, mediuwane przez IgE, reakcje natychmiastowe, najczęściej obserwowanymi odczynami alergicznymi są reakcje nadwrażliwości typu późnego (kontaktowe) (IV typ nadwrażliwości wg Gella i Coombsa) ujawniające się po 24–72 godzinach po ekspozycji na alergen. Taką jest alergiczna reakcja na metale uwalniane z uzupełnień protetycznych, a występujący odczyn określa się jako kontaktowe lub alergiczne zapalenie błony śluzowej jamy ustnej (*stomatitis allergica*). Uważa się, że czyste metale nie alergizują, a właściwości alergizujące posiadają ich sole, przy czym stopień alergizacji jest zależny od stężenia jonów i czasu ekspozycji (Natarajan i wsp., 2011).

Wykazano, że komponenty metali uwalniane z uzupełnień protetycznych mogą modulować ekspresję różnych czynników immunologicznych i mogą być czynnikiem etiologicznym różnych procesów patologicznych. Wzrost ekspresji cytokin w różnych rodzajach komórek przyzębia po stymulacji LPS wskazuje, że toksyny bakteryjne, a także jony uwolnione w wyniku korozji mogą być czynnikami patogenetycznymi w takich

chorobach jamy ustnej jak zapalenie błony śluzowej czy zapalenie dziąseł/przyzębia lub przyczyniać się do resorpcji kości (Geurtsen, 2002).

Powikłania po zastosowaniu podstawowych stopów metali, najczęściej są spowodowane nadwrażliwością na chrom i nikiel, aczkolwiek niewątpliwie wpływ mają również takie czynniki jak techniczne wykonanie oraz kształt konstrukcji korony protetycznej (Contreras i wsp., 2010).

Niewiele jest danych na temat mechanizmów prowadzących do rozwoju stanów zapalnych dziąsła (*gingivitis*) czy przyzębia (*periodontitis*) spowodowanych obecnością stopów dentystycznych w szczelinie dziąsłowej. W procesach zapalnych istotną rolę odgrywają cytokiny prozapalne, od których zależy inicjacja reakcji zapalnej. Cytokiny biorą udział w wielu procesach związanych z różnicowaniem się i aktywacją komórek immunokompetentnych. Migracja komórek zapalnych do miejsc zapalenia jest jednym z kluczowych momentów w inicjacji i przebiegu reakcji zapalnych i może prowadzić do niszczenia tkanek. Główną rolę w tym złożonym procesie odgrywają chemokiny, których obecnie zidentyfikowano ponad 50. Podstawowa aktywność biologiczna chemokin dotyczy aktywacji i migracji monocytów i granulocytów obojętnochłonnych. Wydzielanie chemokin wzrasta w stanach zapalnych i w dużym stopniu jest indukowane przez prozapalne cytokiny m.in. przez TNF (Reddy i wsp., 2011), jednak wpływ koron protetycznych na te procesy nie był jeszcze badany. Dlatego we własnych badaniach, przedstawionych w niniejszej rozprawie, podjęto się m.in. zbadania w warunkach *in vivo* wpływu koron protetycznych wykonanych z różnych rodzajów stopów na stężenia wybranych cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej, a w badaniach *in vitro* na hodowlach komórkowych wpływu głównych składników stopów dentystycznych (Au, Ni, Co i Cr) na morfologię i funkcje pierwotnych hodowli ludzkich keratynocytów izolowanych z jamy ustnej zdrowych osób.

5.2. Wpływ materiału korony na poziomy cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej

W dostępnym piśmiennictwie brak jest w zasadzie prac, które oceniałyby wpływ stopów metali koron protetycznych na ilość cytokin wydzielanych do szczeliny dziąsłowej przez komórki przyzębia – przedmiotu przedstawianych badań. Należy podkreślić, że warunkiem przystąpienia do opracowań protetycznych jest klinicznie prawidłowy stan przyzębia, jaki zresztą stwierdzano w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie. Dzięki temu możliwe było traktowanie próbek płynu szczeliny dziąsłowej pobieranych w

czasie zero, tj. przed umieszczeniem korony, jako próby odniesienia u każdego pacjenta dla próbek pobieranych po okresie jednego tygodnia i 6 miesięcy po założeniu korony. Ponieważ stan kliniczny przyzębia po 1 tygodniu i 6 miesiącach nie wykazywał obrazu zapalnego, można traktować uzyskane dane o stężeniach cytokin jako rzeczywiście oddające wpływ stopów metali na niezmiennione mikrośrodowisko szczeliny dziąsłowej.

Zupełnie inna sytuacja występuje przy ocenie zmian stężenia cytokin w płynie kieszonki dziąsłowej w przypadku obecności stanu zapalnego przyzębia. Są to ważne klinicznie sytuacje, w których poznanie patomechanizmów choroby, a szczególnie aktywności miejscowego i systemowego układu odpornościowego ma ważne znaczenie. Z tego względu rola komórek układu immunologicznego oraz wydzielanych przez nie mediatorów zapalenia, w tym cytokin, jest od około 20 lat przedmiotem intensywnych badań. Wyniki kilku z nich zostaną w skrócie przedstawione, aby uwidocznić zasadnicze różnice między charakterem własnych badań, opisanych w niniejszej rozprawie odnoszących się do zdrowego przyzębia, a badaniami chorego przyzębia. Na przykład, Górską i wsp. oceniali stosunek parametrów klinicznych i stężeń IL-1 beta, TNF-alfa, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 w płynie kieszonki dziąsłowej i w biopsjach tkankowych u pacjentów z ciężką przewlekłą chorobą przyzębia (Górska i wsp., 2003). Stężenie IL-1 beta, TNF-alfa, IL-2, IFN- γ było znacznie wyższe w próbkach surowicy i biopsjach dziąseł tkanki przyzębia u pacjentów z zapaleniem przyzębia niż w grupie kontrolnej. Wysokie stężenia tych cytokin, a szczególnie wysoki stosunek IL-1beta/IL-10 i TNF-alfa/IL-4 w biopsjach tkankowych przyzębia były silnie skorelowane ze stopniem nasilenia ciężkością paradontozy. Badania te wskazują, że wysokie bezwzględne poziomy IL-1 beta, TNF-alfa, IL-2 i IFN- γ , znajdujące się w biopsjach tkankowych stanowią wyraz stopnia ciężkości choroby przyzębia (Górska i wsp., 2003). Również Tymkiw i wsp. zauważyli, że w ciężkim zapaleniu przyzębia poziom interferonu gamma był znacznie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną (Tymkiw i wsp., 2011).

5.2.1 Czynniki martwicy nowotworów- α

TNF jest cytokiną prozapalną o pleiotropowym działaniu wpływająca na szereg rodzajów komórek ludzkiego organizmu. Efekty biologiczne działania TNF zależą w dużym stopniu od całkowitej i lokalnej produkcji tego czynnika. Przeprowadzono wiele badań oceniających produkcję TNF w tkankach przyzębia, w płynie kieszonki lub szczeliny dziąsłowej oraz we krwi. Uważa się, iż TNF jest kluczową cytokiną odpowiedzi zapalnej,

powstającą lokalnie w tkance przyzębia otaczającą szczelinę dziąsłową, głównie w odpowiedzi na czynnik bakteryjny (Zabel, 2001). Badania Autorki pracy wskazują, iż w przypadku koron wykonanych ze stopów zawierających w swoim składzie nikiel, poziom TNF w płynie kieszonki dziąsłowej był podwyższony. Może to być spowodowane procesem zapalnym zainicjowanym przez jony niklu uwalniane ze stopu. Na zjawisko to może mieć również wpływ mikroflora bakteryjna, której zwiększoną ilość obserwowano u pacjentów z koronami wykonanymi z tego rodzaju stopów (aspekt omawiany w dalszej części dyskusji). Zwiększenie poziomu TNF w płynie szczeliny dziąsłowej może mieć znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania przyzębia. Dowiedziono bowiem, iż TNF razem z IL-1 stymulują szereg zdarzeń, które występują w trakcie choroby przyzębia (Graves i Cochran, 2003). Indukują one m.in. inne mediatory stanu zapalnego, które ułatwiają i wzmacniają odpowiedź zapalną, stymulują produkcję metaloproteinaz i resorpcję kości. Powodują utratę przyczepu nabłonkowego, degradację tkanki łącznej przyzębia oraz aktywację osteoklastów. Uważa się iż, duża część uszkodzeń powstałych podczas zapalenia tkanek przyzębia można przypisać działaniu IL-1 i TNF (Korobowicz, 2006). W szeregu innych badań wykazano, iż cynk, nikiel i kadm znacząco aktywują sygnalizację z udziałem NF- κ B, wzmacniają syntezę IL-8, TNF- α i IL-6 w komórkach THP-1 (linia ciągła monocytów) przez co mogą wywoływać szkodliwe działanie (Wataha i wsp., 1993; Wataha i wsp., 2008).

Doniesienia z piśmiennictwa jak również wyniki i obserwacje poczynione w obecnej pracy, dowodzą iż korona protetyczna schodkowa w porównaniu z koroną bezschodkową zapewnia gładkie przejście uzupełnienia protetycznego w tkanki zęba, szczelność brzeżną korony, zmniejsza zaleganie resztek pokarmowych, ułatwia oczyszczanie przez ślinę, ogranicza ilość miejsc ułatwiających odkładanie się bakterii oraz zmniejsza ryzyko urazu przyzębia zęba filarowego (dane doświadczalne nie ujęte w pracy). W przedstawianych badaniach stwierdzono niższe stężenie TNF w płynie szczeliny dziąsłowej zębów preparowanych ze stopniem pokrytych koronami niż zębów preparowanych pod korony bez stopnia, bez względu na rodzaj zastosowanego stopu metalu. Można, więc przypuszczać, że preparacja zębów ze stopniem i uzyskanie jednoznacznej granicy szlifowania może mieć istotne znaczenie dla utrzymania prawidłowej homeostazy jamy ustnej po założeniu korony protetycznej. Tak więc oprócz właściwości środowiska biologicznego jamy ustnej ważnymi elementami w zabezpieczeniu homeostazy przyzębia są: techniczne wykonanie uzupełnienia protetycznego, preparacja zębów jak również kształt uzupełnienia protetycznego, które w jak najmniejszym stopniu powinno

ingerować w środowisko jamy. W literaturze spotyka się różne poglądy na temat najbardziej korzystnego dla zachowania zdrowia przyzębia kształtu stopnia i kształtu koron protetycznych. Jedni autorzy utrzymują, że korony protetyczne powinny wiernie naśladować anatomiczny kształt zębów, inni natomiast dodatkowo zwracają szczególną uwagę na to, aby korony nie były nadmiernie wymodelowane. Część konturu korony klinicznej zęba, która rozciąga się od dna szczeliny dziąsłowej poprzez wolny brzeg dziąsła do środowiska jamy ustnej jest w literaturze anglojęzycznej definiowana, jako „emergence profile”. Zachowanie odpowiedniego kształtu oraz bezstopniowego przejścia korony protetycznej w powierzchnię zęba powoduje mniejszą agregację bakterii oraz redukuje aktywację procesów prowadzących do zwiększenia przepuszczalności naczyń włosowatych oraz wydzielania cytokin do płynu szczeliny/kieszonki dziąsłowej.

W pracy odnotowano również większe stężenie TNF wokół koron zacementowanych w żuchwie w porównaniu ze szczęką bez względu na rodzaj zastosowanego materiału. Ponadto wykazano największy wzrost stężenia TNF w płynie szczeliny dziąsłowej pobranym od strony i wargowej i językowej. Może to być związane z odmienną intensywnością zalegania pokarmu na zębach w żuchwie i szczęce oraz po stronie przedsionkowej i językowej łuku zębowego. Są to pierwsze tego typu obserwacje, które wymagają z pewnością dalszych badań.

Interesującą obserwacją było stwierdzenie większego wzrostu poziomu TNF pod wpływem koron (różnego rodzaju) w grupie kobiet w porównaniu do mężczyzn, co może wskazywać na zależne od płci różnice w odpowiedzi immunologicznej w obrębie jamy ustnej. Zjawisko to zaobserwowano w przypadku szeregu chorób autoimmunologicznych, które znacznie częściej dotyczą kobiety niż mężczyzn. Przykładem może tu być toczeń rumieniowaty trzewny, choroba układowa występująca przede wszystkim u kobiet. W tych chorobach istotną rolę odgrywa stan zapalny i wzrost poziomu szeregu cytokin, m.in. TNF (Schwartzman-Morris i Putterman, 2012).

Prace innych autorów wskazują również na to, że pacjenci z chorobami przyzębia silniej reagują na patologiczną mikroflorę bakteryjną. Kjeldsen i wsp. wykazali, że limfocyty, monocyty i granulocyty wyizolowane z krwi pacjentów z zapaleniem przyzębia stymulowane lipopolisacharydem wyizolowanym z *Aggregatibacter actinomycetem-comitans* i *Porphyromonas gingivalis*, wydzielają większe ilości TNF w porównaniu z komórkami wyizolowanymi z krwi grupy kontrolnej. Górská i wsp., badając stężenie cytokin prozapalnych w płynie szczeliny dziąsłowej i we krwi obwodowej nie stwierdzili

prostej zależności między stopniem zaawansowania choroby przyzębia a wyższym stężeniem cytokin prozapalnych we krwi, przy jednocześnie, zdecydowanie wyższym stężeniu cytokin prozapalnych w płynie szczeliny dziąsłowej (Górska i wsp., 2003). Autorzy ci wykazali natomiast dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikiem krwawienia a stężeniem TNF (Górska i wsp., 2003). We własnych badaniach nie zaobserwowano korelacji pomiędzy poszczególnymi parametrami stanu klinicznego przyzębia a poziomem poszczególnych cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej za wyjątkiem IFN- γ . Stashenko i wsp., wykazali, że leczenie chorób przyzębia zmniejsza w sposób istotny stężenie cytokin prozapalnych, co może sugerować związek ze stopniem zaawansowania procesu chorobowego (Feferskov i Kidd 2006; Stashenko i wsp. 1991).

W piśmiennictwie brak jest natomiast danych na temat wpływu koron protetycznych i stopów na stężenie TNF w płynie szczeliny/kieszonki dziąsłowej. Wyniki własne, przedstawione w niniejszej rozprawie mają więc charakter oryginalnych badań, które uzupełniają stan wiedzy w tej dziedzinie nauki.

5.2.2. Interleukina-8

IL-8 jest jedną z najsilniejszych chemokin stymulujących proces naciekania tkanek przez komórki układu immunologicznego, w tym głównie granulocyty obojętnochłonne segmentowane czyli przez neutrofile. Jest ona uwalniana przez monocyty/makrofagi, limfocyty, neutrofile, fibroblasty, komórki śródbłonna, komórki tuczne oraz keratynocyty (Gołąb i wsp., 2013). Poza LPS, składnikiem ściany komórkowej bakterii, syntezę tej chemokiny indukuje również IL-1 β . Wielu autorów jednoznacznie wykazało, że stężenie IL-8 w płynie szczeliny dziąsłowej jest znamienne większe u pacjentów z zapaleniem przyzębia (Feferskov i Kidd, 2006; Ucar i wsp. 2011; Geurtsen 2002; Muller i wsp., 1990; Jacobs i wsp. 1998; Yamazoe, 2010), a także u chorych z zapaleniem dziąseł (Geurtsen, 2002). Wykazano też, że stężenie IL-8 dodatnio koreluje ze wskaźnikami klinicznymi zaawansowania choroby (do Nascimento i wsp. 2011; Feferskov i Kidd 2006; Geurtsen 2002), chociaż w niektórych badaniach nie zaobserwowano takiej korelacji (Ucar i wsp. 2011; Yamazoe 2010). Zaobserwowano, że po wdrożonej terapii periodontologicznej stężenie IL-8 w płynie szczeliny dziąsłowej spada, przy czym ta zmiana koreluje z poprawą stanu klinicznego (Ucar i wsp. 2011; Feferskov i Kidd 2006; Muller i wsp. 1990; Jacobs i wsp. 1998).

Należy jednak podkreślić, że IL-8 występuje w płynie szczeliny dziąsłowej i to

w stosunkowo dużym stężeniu w warunkach prawidłowych, czyli u osób bez zmian zapalnych w obrębie tkanek przyzębia (Rao i Biswas 2009; Ucar i wsp., 2011; Jacobs i wsp., 1998; Yamazoe 2010; Can i wsp. 2007). Podobne obserwacje poczyniono także we własnych badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie. Stan taki jest prawdopodobnie wyrazem procesu obronnego określanego mianem „fizjologicznego zapalenia” w szczelinie dziąsłowej, w którym niezwykle ważną rolę odgrywają neutrofile będące jednym ze źródeł IL-8 (Kmieć, 2006). Hipotezę tę potwierdzają obserwacje Tonetti i wsp., iż stężenie mRNA dla IL-8 w tkankach przyzębia dodatnio koreluje z napływem neutrofilów do szczeliny dziąsłowej (Tonetti i wsp., 1998). Znaczące stężenie IL-8 w płynie szczeliny dziąsłowej u osób ze zdrowym przyzęciem może być związane także z rozwojem zapalenia subklinicznego, gdzie wzrost stężenia IL-8 może poprzedzać kliniczne oznaki choroby. Również we własnych badaniach stężenie IL-8 w płynie szczeliny dziąsłowej było relatywnie wysokie, mimo braku klinicznych cech zapalenia przyzębia ocenianych przy każdej wizycie.

Na uwagę zasługuje również fakt, iż podwyższenie stężenia IL-8 było widoczne zarówno dla koron oszlifowanych bez stopnia jak i ze stopniem. Przy czym zwiększenie sekrecji IL-8 było najbardziej widoczne dla koron bez stopnia. Odpowiada to częściowo wydzielaniu TNF, gdzie efekt stymulacyjny był tylko widoczny dla koron bez stopnia. Można zatem przyjąć, iż samo przygotowanie techniczne korony może mieć duże znaczenie dla późniejszych zjawisk immunologicznych (zostało również opisane w podrozdziale wyżej dotyczącym TNF). Brak pełnej korelacji w wydzielaniu IL-8 i TNF może wynikać z faktu, iż podczas zapalenia, IL-8 jest wytwarzana w organizmie wcześniej niż TNF. Wydaje się również, iż wytwarzanie TNF wymaga silniejszego sygnału, w porównaniu do IL-8. Dodatkowo, u pacjentów z zapaleniem przyzębia nie obserwuje się korelacji między poziomem IL-8 a poziomem TNF. Co ciekawe, taka korelacja występuje między poziomami IL-6 a IL-8 (Noh i wsp., 2013).

Oryginalny charakter ma własna obserwacja wskazująca na wyższy poziom IL-8 po tygodniu i sześciu miesiącach od zacementowania koron po stronie językowej i podniebiennej, gdzie zęby zostały oszlifowane bez stopnia.

W przeciwieństwie do TNF nie zauważono różnic w poziomie IL-8 między kobietami i mężczyznami bez względu na rodzaj zastosowanego stopu. Należy zaznaczyć, że stężenie IL-8 było wyższe po tygodniu i sześciu miesiącach od zacementowania koron w zuchwie aniżeli w szczęce bez względu na rodzaj zastosowanego stopu. Są to pierwsze tego

rodzaju obserwacje, ponieważ w piśmiennictwie brak jest danych na temat różnicy w ekspresji cytokin w szczęcie czy żuchwie.

Najnowsze badania zespołu Yu i wsp. wskazują, że poziom IL-8 w płynie szczeliny dziąsłowej wokół koron wykonanych ze stopu Cr-Ni był wyższy o 116% i 77% dla grup 30 mężczyzn i 30 kobiet niż w grupie kontrolnej (Yu i wsp., 2013). Natomiast poziom IL-8 po 3 miesiącach od zacementowania koron na stopach Cr-Co i złota wrócił do poziomu wyjściowego. Również we własnych badaniach poziom stężenia tej cytokiny było wyższe dla stopów Cr-Ni i Cr-Co w porównaniu ze stopami złota zarówno po tygodniu i sześciu miesiącach od zacementowania koron, co wskazuje na potencjalne znaczenie biologiczne tych obserwacji.

5.2.3. Interferon gamma

IFN- γ jest cytokiną wytwarzaną głównie w odpowiedzi na infekcję wirusową, jednak jego podwyższone poziomy są wykrywane również w innych rodzajach zapaleniach. W badaniach niniejszej pracy zauważono wzrost stężenia IFN- γ w płynie szczeliny dziąsłowej po sześciu miesiącach od zacementowania koron dla stopów niklu i kobaltu, przy niskim stężeniu tej cytokiny dla jonów złota.

Wyniki te mają częściowe odniesienie do badań Bordignon i wsp., którzy określali wpływ jonów niklu i palladu na ekspresję IFN- γ i IL-10 (Bordignon i wsp., 2008). Co ciekawe, u wszystkich pacjentów z dodatnim testem skórnym zarówno dla niklu i palladu, w badaniach *in vitro* komórek jednojądrzastych krwi obwodowej wystąpiła również odpowiedź charakteryzująca się uwalnianiem IFN- γ po stymulacji jonami niklu i wytwarzaniem IL-10 w odpowiedzi na jony palladu.

5.2.4 Interleukina 10

IL-10 należy do cytokin immunosupresyjnych, które hamują funkcję m.in. makrofagów i limfocytów Th1. Cytokina ta razem z TGF- β , jest również głównym czynnikiem odpowiedzialnym za nabywanie tolerancji na obce antygeny. Własne badania wskazują na wyższe stężenia IL-10 zarówno po tygodniu jak i sześciu miesiącach od zacementowania koron w porównaniu do kontroli (przed założeniem korony). Było to szczególnie widoczne dla koron wykonanych z kobaltu oraz złota. Wzrost ten może być powodowany obecnością obcego antygeny (metal) i indukcji procesu tolerancji

immunologicznej. Efektu takiego nie zaobserwowano dla jonów niklu, co może świadczyć o tym, że okres sześciu miesięcy może być za krótki dla zapoczątkowania znaczącej produkcji IL-10 i wytworzenia tolerancji immunologicznej (Rustemeyer i wsp., 2004). Jony niklu mogą również odmiennie wpływać na procesy immunologiczne, aktywując przede wszystkim „ścieżkę” prozapalną, bez udziału cytokin przeciwzapalnych.

Działanie przeciwzapalne tej cytokiny i wzrost jej poziomu na powierzchni zębów oszlifowanych ze stopniem, gdzie dochodzi do bezpośredniego kontaktu porcelany z dziąsłem może świadczyć o tym, że jednym z najbardziej biokompatybilnych materiałów używanych w protetyce jest glazurowana porcelana.

U osób z długotrwałą ekspozycją na nikiel może rozwijać się zjawisko tolerancji immunologicznej na ten pierwiastek. Rustemeyer i wsp. w swoim badaniu wykazali zwiększony poziom IL-10 we krwi u osób z ujemnymi wynikami testów płatkowych, u których występował długotrwały kontakt śluzówki z niklem (Rustemeyer i wsp., 2004). Podobne obserwacje przedstawili Minang i wsp., którzy wykazali, że nikiel indukuje produkcję IL-10, IL-4, IL-13, IFN- γ , a ilość tych cytokin, a zwłaszcza IFN- γ korelowała z poziomem IL-10, co wskazuje na wagę tej cytokiny w przeciwdziałaniu reakcji alergicznej (Minang i wsp. 2006). W badaniach Górskiej i wsp. u pacjentów z zapaleniem przyzębia poziom IL-4 i IL-10 był na niskim poziomie lub był niewykrywalny. W tkankach zdrowych dziąseł poziom IL-4 (88% próbek dodatnie) i IL-10 (72%) była znacznie wyższy (Gorska i wsp. 2003). Podobne wnioski wysunęli Gamonali i wsp., którzy stwierdzili, że poziomy IL-8 oraz IL-10 wzrosły w miejscach z zapaleniem przyzębia, ale nie były to różnice znamienne statystycznie (Gamonali i wsp., 2000).

Należy jednak podkreślić, iż poziomy IL-10 w płynie kieszonki dziąsłowej (jak również IL-12 i IFN- γ) były bardzo niskie, stąd ich interpretacja i analiza statystyczna była bardzo trudna i może być przez to obarczona pewnym błędem statystycznym.

5.2.5 Interleukina 12

IL-12, będąca heterodimerem o masie ok. 75 kDa, jest ważnym składnikiem odpowiedzi immunologicznej produkowanym m.in. podczas infekcji spowodowanej przez zewnątrzkomórkowy patogen. Indukowanie odpowiedzi Th1 jest w głównej mierze zależne od IL-12 produkowanej przez makrofagi, limfocyty B i komórki dendrytyczne. Interleukina ta powoduje wzrost cytotoksyczności komórek NK i limfocytów T poprzez wzrost sekrecji interferonu gamma i TNF. Dlatego też jej efekt jest synergistyczny z IL-2, natomiast

antagonistyczny (najczęściej) z IL-10. IL-12 wspólnie z IL-18 indukuje różnicowanie i proliferację limfocytów Th1 kontrolując w ten sposób odpowiedź Th1 i wydzielanie IFN- γ oraz IL-2. Wyniki niniejszej pracy wskazują, iż poziomy tej cytokiny w płynie kieszonki dziąsłowej, są bardzo niskie. Dodatkowo nie zaobserwowano znaczących różnic w stężeniu tej cytokiny w zależności od typu korony. W nielicznych badaniach dotyczących tej cytokiny i metali, wykazano natomiast, iż osteoblasty stymulowane LPS zwiększały produkcję IL-12 i TNF po inkubacji z Co i Cr (Stashenko i wsp., 1991). Jak widać cytokiny, których stężenia pozostają niewielkie, a które raczej wywierają subtelną rolę w różnicowaniu, kierunkowaniu komórek układu immunologicznego nie są syntezowane w odpowiedzi na słabe bodźce egzogenne. Do takiej syntezy, komórki wydają się potrzebować silniejszych bodźców aktywujących, np. LPS.

5.3 Wpływ jonów metali na hodowle keratynocytów

Środowisko jamy ustnej jest bardzo zmienne stąd też ocena wpływu metali wchodzących w skład stopów koron na wydzielanie cytokin w warunkach *in vivo* może być trudna do zobjektywizowania. Dlatego też w przedstawianych badaniach postanowiono posłużyć się równolegle modelem hodowli komórkowej. Keratynocyty inkubowano z jonami metali przez okres 48 godzin, po czym medium analizowano pod kątem stężenia wybranych cytokin. Wykazano, iż w warunkach *in vitro* jony badanych metali miały niewielki wpływ na produkcję cytokin przez keratynocyty, ponieważ nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic w stosunku do hodowli kontrolnych. Jednakże badane jony, a szczególnie jony niklu, wywierały wyraźny wpływ na morfologię komórek. Podobne eksperymenty, chociaż na zupełnie innym rodzaju komórek prowadzili inni badacze. Np. Messer i wsp. oceniali wpływ jonów metali na żywotność i wydzielanie IL-1 β w hodowanych ludzkich fibroblastach (Messer i wsp., 1999). Fibroblasty inkubowano przez 24 i 48 godzin z jonami Ni, Fe, Mo, Cu, In, Au, stopu Cr-Ni-Co i Au-Pt. Stwierdzono, że jony złota nie wpływały na badane parametry. Natomiast inkubacja fibroblastów z jonami Ni, Fe, Mo i Cu obniżała żywotność komórek odpowiednio o 22%, 9%, 84% i 58%. Po inkubacji komórek ze stopami Cr-Ni-Mo oraz Au-Pt żywotność fibroblastów ulegała redukcji odpowiednio o 17 i 6%. W przypadku inkubacji komórek z jonami miedzi i niklu wykazano 10-krotnie wyższe stężenie IL-1 β w medium hodowlanym w porównaniu do

kontroli (Messer i wsp., 1999). Przytoczone wyniki wskazują na to, że niektóre jony metali mogą negatywnie oddziaływać na komórki wchodzące w skład tkanek przyzębia i zmieniać ich aktywność w zakresie sekrecji cytokin.

Inni autorzy (Wylie i wsp., 2007) badali wpływ jonów Ni uwalnianych z dwóch stopów dentystycznych na hodowlę keratynocytów. Bezpośredni kontakt dwóch różnych materiałów uwalniających jony niklu powodował zahamowanie wzrostu keratynocytów i zmiany ich morfologii. Zauważono również, że uwalnianie jonów niklu nie było jednakowe dla obu stopów. Większe stężenie jonów niklu powodowało większe zahamowanie wzrostu komórek oraz zmniejszone wydzielanie czynnika wzrostu GM-CSF (Wylie i wsp., 2007). Przeprowadzono również doświadczenia, w których badano między innymi żywotność komórek, syntezę DNA i RNA po inkubacji ludzkich dziąsłowych fibroblastów z niektórymi solami metali. Okazało się, że najbardziej toksyczny okazał się beryl 2+, średnio toksyczny był Ni 2+, podczas gdy jony Cr 3+ i Mo 6+ były najmniej toksyczne (Messer, 1999). Inni autorzy stwierdzili znacznie wyższe stężenie IL-8 w hodowlach ludzkich keratynocytów inkubowanych z jonami niklu i kobaltu w porównaniu do komórek kontrolnych, przy czym inkubacja z solami złota zmniejszała stężenie tej cytokiny w medium (Xu i wsp., 2009, Wylie i wsp., 2007). Wyniki te sugerują, że korony na podbudowie złota nie działają szkodliwie na tkanki przyzębia, gdyż nie zwiększają sekrecji silnych cytokin prozapalnych, IL-1B oraz IL-8, w przeciwieństwie do stopów niklu, które mogą powodować stan zapalny dziąseł poprzez wzrost sekrecji cytokin prozapalnych.

Także wydzielanie innej cytokiny prozapalnej, IL-6, pod wpływem jonów metali i stopów szlachetnych było badane w hodowlach ludzkich fibroblastów i keratynocytów. Obserwowany w tych badaniach wzrost stężenia IL-6 pod wpływem jonów Cu, Zn, Co oraz Ni sugeruje ich prozapalny efekt (Schmalz i wsp., 1998).

W badaniach prowadzonych przez Wang i wsp. zaobserwowano natomiast, iż po działaniu jonami Co, Cr oraz Ti na ludzkie komórki U937 (linia zbliżona do monocytów) dochodziło do zwiększonego wydzielania IL-1, TNF-alfa (dla Ti oraz Cr) oraz IL-8 (dla Ti), jak również zmniejszonej produkcji TGF-beta (Wang i wsp., 1996). Natomiast doświadczenia Tkaczyk i wsp., przeprowadzone również na komórkach linii U937, wykazały, iż po działaniu jonami Cr i Co w odpowiednich warunkach może dochodzić do wzrostu ekspresji enzymów antyoksydacyjnych (Tkaczyk i wsp., 2010).

W przedstawianych w pracy badaniach własnych zaobserwowano, że jony mogą hamować proliferację komórek nabłonkowych, jak również zmieniać ich morfologię. Nie

wykazano natomiast by jony zmieniały istotnie profil cytokinowy *in vitro*. Tak więc wyniki własnych badań są tylko częściowo zgodne z danym literaturowymi. Należy jednak zaznaczyć, iż stworzenie warunków w hodowli *in vitro* odzwierciedlających te, które występują *in vivo* stanowi poważny problem metodyczny w wielu modelach doświadczalnych i pracach badawczych. Szczególnie trudny aspekt stanowi wybór stężeń jonów do stymulacji *in vitro*. Należy bowiem pamiętać, iż działanie poszczególnych jonów na tkanki jamy ustnej pacjenta, w tym nabłonek, zachodzi przez wiele miesięcy i lat. Natomiast efekt biologiczny działania jonów w postaci zapalenia lub potencjalnych innych zmian chorobowych ujawnia się najwcześniej po kilku dniach lub nawet tygodniach. W pracy, ze względów metodycznych (specyfika hodowli) przyjęto czas stymulacji na 48 godzin i z tego względu wybrano stosunkowo wysokie stężenia badanych jonów metali.

Dla właściwej interpretacji uzyskanych wyników należy również wymienić wady modeli opartych o jednowarstwowe hodowle komórkowe. Przede wszystkim zwykle nie zawierają one innych rodzajów komórek oraz składników macierzy pozakomórkowej i błony podstawnej (Klausner i wsp., 2007; Chai i wsp., 2010). W pracy wykorzystano do hodowli wyłącznie keratynocyty izolowane z ludzkiej błony śluzowej jamy ustnej. Warto zauważyć, iż również inne komórki, takie jak fibroblasty, granulocyty i monocyty uczestniczą w odpowiedzi zapalnej związanej z obecnością materiałów korony protetycznej w jamie ustnej. Komórki te również stanowią model wykorzystywany przez innych autorów (Imirzalioglu i wsp., 2012). Wybór keratynocytów w niniejszej pracy podyktowany był faktem, iż komórki te są łatwo dostępnym materiałem badawczym, którego rutynowe pobranie przy innych zabiegach chirurgicznych nie stanowi uszczerbku dla zdrowia pacjenta a przez to nie budzi zastrzeżeń natury etycznej. Ponadto, keratynocyty charakteryzują się wysokimi zdolnościami proliferacyjnymi, co umożliwia ich stosunkowo łatwe namnażanie i hodowlę *in vitro*. Należy też wspomnieć, że istnieją też inne możliwości stymulacji komórek jonami metali niż ich rozpuszczalne roztwory użyte w badaniach własnych. Na przykład, McGinley i wsp. stosowali w hodowli komórkowej dyski metalowe zbudowane ze stopów Cr-Ni lub Cr-Co, które miały kontakt z keratynocytami i fibroblastami. W tym układzie stopy zawierające w swoim składzie najwięcej niklu oraz chromu najbardziej indukowały wydzielanie cytokin prozapalnych, w tym IL-1, IL-8 oraz TNF-alfa (McGinley i wsp., 2012).

5.4. *Badania mikrobiologiczne*

Uważa się, iż możliwe działania negatywne uzupełnień protetycznych są skutkiem współdziałania wielu czynników chemicznych, biologicznych i mechanicznych m.in. prądów galwanicznych, mechanicznego drażnienia, obecności innych uzupełnień protetycznych, resztek spożywanych pokarmów oraz innych czynników. Ponadto warunki, jakie stwarzają uzupełnienia (zwiększenie retencji resztek pokarmowych i płytki nazębnej) sprzyjają rozwojowi patogennej flory bakteryjnej i są również jednym z czynników etiologicznych stanów zapalnych błony śluzowej jamy ustnej i przyzębia (Pancerz-Łoś i wsp., 2010; Moretti i wsp., 2011).

We własnych badaniach wykazano, iż po okresie 6 miesięcy od zacementowania koron, wyraźnemu zwiększeniu w płynie szczeliny dziąsłowej ulega częstość występowania bakterii beztlenowych, tlenowych i względnie beztlenowych, a także mikroaerofilnych, które mogą wywoływać zapalenia przyzębia. Zapalenie przyzębia jest chorobą, w której główną rolę odgrywa patogen *Porphyromonas gingivalis*. Jest to pałeczka Gram ujemna występująca głównie w płytce poddziąsłowej, chociaż izolowana może być również z powierzchni języka czy migdałków. Jest to agresywny periodontyczny patogen chorobotwórczy człowieka. Do patogenności tej bakterii przyczyniają się m.in. fimbrie, które warunkują adhezję oraz otoczka, która chroni przed fagocytozą. Pałeczka ta wytwarza wiele czynników wirulencji tj. proteazy, które niszczą immunoglobuliny, dopełniacz i białka wiążące hem, a także hemolizynę i kolagenazę (Ravnholt i Jensen 1991). Pierwszą linią komórek narażonych na kontakt z patogenami są komórki nabłonka. Komórki te mogą odgrywać rolę wskaźników zakażenia poprzez wydzielanie IL-1, które indukuje syntezę pozostałych cytokin prozapalnych. Ponadto IL-1 ta może również stymulować wzrost niektórych gatunków bakterii, np. *S. aureus*, wywołujących zapalenie (Pöllänen MT i wsp. 2013). Zapalenie to manifestuje się jako zapalenie dziąseł, a następnie zapalenie przyzębia. A więc regulacja produkcji IL-1B może być skutecznym celem terapeutycznym do zwalczania chorób przyzębia (Stashenko i wsp. 1991). Obecność uzupełnień protetycznych zaburza środowisko mikrobiologiczne w obrębie jamy ustnej. Głównym elementem wpływającym na zasiedlenie tkanek miękkich i twardych przez mikroorganizmy jest wytworzenie płytki nazębnej *dentogingival plaque*, głównie dzięki istnieniu różnego rodzaju adhezyn bakteryjnych typu fimbrie i pilie (Hultin i wsp. 2002). Badanie prowadzenie w zakresie mikrobiologii jamy ustnej, wykazują, iż obecność uzupełnień protetycznych wpływa na zwiększenie

występowania mikroorganizmów poprzez wytwarzanie grubszej płytki nazębnej, niż w innych miejscach jamy ustnej (Kancyper and Koka 2001; Passariello i wsp. 2012). Zwiększona adhezja do uzupełnienia wykonanego z metalu lub innego materiału jest w dużej mierze spowodowana chropowatością materiału. Zespół Bollena wykazał, iż przekroczenie stopnia chropowatości $>0,2$ ($Ra > 0,2$) skutkuje nagłą akumulacją bakterii na powierzchni uzupełnienia, niezależnie od użytych materiałów – stali nierdzewnej, żywicy akrylowej czy też ceramiki (Bollen i wsp., 1997). Zwiększenie chropowatości jest natomiast nieuniknionym wynikiem głównego procesu starzenia się koron metalowych, spowodowanego korozją (Eliades i Athanasiou, 2002). Udowodniono, że czynnikiem umożliwiającym wiązanie mikroorganizmów z powierzchnią jest również bakteryjny LPS, co wykazały badania Knoershilda i wsp., gdzie zaobserwowano znacznie lepszą adhezję przez bakterie *E. coli* i *P. gingivalis* poprzez LPS do powierzchni stali nierdzewnej w stosunku do powierzchni plastikowej (Knoernschild i wsp., 1999). Również obecność mucyny w ślinie wpływa dodatnio na możliwość wiązania się mikroorganizmów do powierzchni protezy, co wykazały badania zespołu J. Li, gdzie wykazano zmniejszoną możliwość mechanicznego usunięcia *C. albicans* z różnych powierzchni oraz zwiększoną adhezję do materiałów hydrofobowych (Li i wsp., 2012).

W niniejszej rozprawie analizowano również wpływ rodzaju stopu na obecność określonych bakterii w płynie szczeliny dziąsłowej. Badania potwierdzają obserwacje innych autorów, iż liczba mikroorganizmów znacząco wzrasta w próbach dla stopów wykonanych z Ni oraz Co w stosunku do prób kontrolnych od tych samych pacjentów. W przypadku stopów Au wykazano natomiast, obniżenie zarówno liczby jak i gatunków drobnoustrojów izolowanych z badanych materiałów. Jest to prawdopodobnie związane ze zmniejszoną korozją stopów złota w stosunku do Ni i Co. Co więcej, prace J. Li wykazały, że stopy Au wykazują podobny to Ti brak adhezji w stosunku do *C. albicans* (Li i wsp., 2012). Z kolei prace zespołu Shah potwierdziły skuteczność TiO_2 w hamowaniu tworzenia płytki nazębnej na przykładzie *L. acidophilus* (Shah i wsp., 2011), z kolei starsze badania zespołu Laurenta wykazały znaczną przewagę stopów Au nad Cr-Ni względem właściwości fizykochemicznych w przypadku kolonizacji bakterią o potwierdzonym wysokim wpływie na korozję stopów - *Actinomyces viscosus* (ATCC19246) w środowisku zarówno czystej śliny, jak i ekstraktu drożdżowego (Laurent i wsp., 2001). Również badania zespołu Goodsona z zastosowaniem hybrydyzacji DNA:DNA potwierdziły znaczną redukcję bakterii na powierzchni pokrytej Au w stosunku do prób kontrolnych od tych samych pacjentów

(Goodson i wsp., 2001).

Oprócz korozji galwanicznej występuje też korozja mikrobiologiczna, która przebiega dwutorowo: poprzez metabolizowanie materiału korony oraz poprzez zmianę mikrośrodowiska protezy (głównie pH) – jest jednym z czynników wpływających na przyspieszoną degradację korony, a co za tym idzie również na zwiększenie przylegania płytki bakteryjnej do protezy (Matasa, 1995). Wykazano, że głównymi mikroorganizmami powodującymi korozję mikrobiologiczną są: *E. corrodens*, *Thiobacillum ferrooxidans* oraz *Streptococcus mutans* (Palaghias 1985). W niniejszej rozprawie zaobserwowano brak różnic w udziale *E. corrodens* w badanych trzech typach koron (największy – 41% dla Co, 29% dla Au i 25% dla Ni), natomiast *S. mutans* zidentyfikowano trzykrotnie częściej dla uzupełnień wykonanych z Ni niż dla Co i Au. Obecność tych mikroorganizmów może w znaczący sposób przyczynić się do korozji mikrobiologicznej koron wykonanych ze stopów Co i Ni, natomiast stopy Au wykazują odporność na środowisko korozyjne wytwarzane przez te patogeny (Goodson i wsp., 2001).

Analizowana w pracy pula mikroorganizmów zawierała m. in. patogeny odpowiedzialne za rozwój chorób przyzębia, tj. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (do Nascimento i wsp., 2011; Kohal i wsp., 2004). Zaobserwowane niewielkie obniżenie liczby tych patogenów w stopach wykonanych na bazie Au może być związane ze słabszą korozją koron wykonanych ze stopów na bazie złota w stosunku do Co i Ni, gdzie zaobserwowano wzrost lub brak różnic w liczbie patogenów między badaniem a kontrolą. Stoi to w sprzeczności z wynikami badań Knoershilda i współpracowników, którzy wykazali brak różnic w możliwości kolonizacji *P. gingivalis* na koronach wykonanych ze złota oraz Cr-Ni-Be ($P > 0,05$). Wg autorów związane było to z silnym przyleganiem wydzielanego przez *P. gingivalis* LPS do powierzchni koron obu typów (Knoernschild i wsp. 1995). Z drugiej strony w niniejszej pracy badano próby po 6 miesiącach od zacementowania koron protetycznych, co mogło spowodować zwiększoną korozję koron Cr-Ni i Cr-Co w stosunku do Au, a to mogło skutkować zwiększeniem porowatości i przez to wzrostem kolonizacji gatunków patogennych. Potwierdzeniem częstszej kolonizacji bakterii na koronach o podbudowie metalowej niż pełnoceramicznych jest praca Anhoury i współpracowników, którzy udowodnili, iż na koronach metalowych dominują gatunki takie jak *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum ss vincentii*, *Streptococcus anginosus* oraz *Eubacterium nodatum* (Anhoury i wsp. 2002).

6. **WNIOSKI**

1. Korony metalowo-ceramiczne wykorzystywane rutynowo w stomatologii mogą powodować zmiany w uwalnianiu do szczeliny/kieszonki dziąsłowej zarówno cytokin prozapalnych, jak i antyzapalnych.
2. Korony wykonane ze złota w najmniejszym stopniu indukują sekrecję prozapalnej cytokiny IL-8, co może być związane z jednoczesną stymulacją wydzielania IL-10 oraz działaniem bakteriostatycznym jonów złota.
3. Stopy dentystyczne nieszlachetne zawierające nikiel stosowane do wykonania koron metalowo-ceramicznych powinny być zastępowane przez stopy szlachetne lub nieszlachetne pozbawione niklu.
4. Spośród badanych stopów najbardziej biokompatybilnym materiałem dla wykonywania uzupełnień protetycznych był stop złota.
5. Prawdopodobnym źródłem cytokin produkowanych w odpowiedzi na kontakt z koronami protetycznymi są komórki układu odpornościowego. Wskazują na to badania *in vitro*, które nie wykazały zmian w wydzielaniu cytokin przez ludzkie keratynocyty po stymulacji badanymi jonami.
6. Stwierdzony w badaniach *in vitro* wpływ jonów metali (Au, Ni, Co, Cr) na morfologię i proliferację ludzkich keratynocytów wskazuje, iż jony te wywierają wpływ na aktywność biologiczną tych komórek.
7. Hodowle ludzkich keratynocytów błony śluzowej jamy ustnej mogą być stosowane jako przydatny model do oceny biokompatybilności materiałów stomatologicznych.

7. STRESZCZENIE

Korony protetyczne stanowią bardzo ważne elementy odtwarzające naturalny kształt i funkcjonalność aparatu stomatognatycznego. Zbudowane są one jednak z obcych dla organizmów składników (głównie metali), które mogą być przyczyną różnego rodzaju reakcji niepożądanych. Reakcje te prowadzą często do przewlekłych stanów zapalnych dziąseł i tkanek przyzębia, przy czym słabo poznane są patomechanizmy rozwoju tych zapaleń. Wydaje się, iż duże znaczenie odgrywać tu może aktywacja sieci cytokin, która może prowadzić, poprzez rozwój stanu zapalnego, do uszkodzeń tkanek przyzębia.

Głównym celem wykonanej pracy, stało się określenie wpływu stopów metali koron protetycznych na profil wydzielania cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych do płynu szczeliny dziąsłowej oraz status mikrobiologiczny szczelin dziąsłowych pacjentów. Drugim celem była ocena wydzielania cytokin przez hodowane *in vitro* ludzkie keratynocyty, w odpowiedzi na jony metali stosowane w koronach protetycznych (Au, Ni, Co, Cr).

Materiał biologiczny stanowił płyn szczeliny dziąsłowej wyizolowany od pacjentów (n=65, średnia wieku 42,5 lat) zakwalifikowanych do wykonania koron protetycznych (łączna liczba koron n=95). Płyn pobierano bezpośrednio przed, tydzień po oraz sześć miesięcy po zacementowaniu korony i mrożono do czasu analizy stężenia cytokin. W badaniach wykorzystano również fragmenty prawidłowej błony śluzowej jamy ustnej pobierane w trakcie przy zabiegach chirurgicznych (n=8), z których metodą enzymatyczną izolowano keratynocyty i zakładano *in vitro* ich hodowle. Komórki po pierwszym pasażu inkubowano przez 48 h z odpowiednimi jonami, po czym zbierano media i określano stężenia badanych cytokin. Stężenie cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej i nadsączy z hodowli keratynocytów oceniano metodą cytometrii przepływowej przy wykorzystaniu techniki „FlexSet” (Beckton Dickinson). Po odpowiednim pobraniu płynu szczeliny dziąsłowej na badanie bakteriologiczne, przy pomocy standardowych metod analizy mikrobiologicznej, oceniono częstość występowania w jamie ustnej wybranych gatunków bakterii tlenowych, beztlenowych oraz grzybów drożdżopodobnych.

Wyniki badań wskazują na to, iż korony protetyczne indukują *in vivo* zmiany w sekrecji cytokin, przy czym dotyczą one przede wszystkim cytokin prozapalnych. Korony wykonane na bazie stopów niklu powodowały przede wszystkim wzrost poziomu cytokin prozapalnych: TNF, IFN- γ oraz IL-8. W przypadku koron wykonanych na bazie jonów

kobaltu dochodziło do wzrostu poziomu IFN- γ , IL-8 oraz IL-10, cytokiny o charakterze przeciwzapalnym. Natomiast dla koron na bazie stopów złota obserwowano głównie wzrost stężeń w płynie szczeliny dziąsłowej IL-8 oraz IL-10. Zaobserwowano różnice w stężeniach cytokin w zależności od lokalizacji korony w jamie ustnej (wyższy poziom IL-8 dla koron zlokalizowanych w żuchwie). Wykazano również, iż korony bez stopnia powodują wyższy wzrost wydzielania IL-8 w porównaniu do koron ze stopniem. Obserwacje przeprowadzone na hodowlach keratynocytów wykazały, iż jony metali wpływają negatywnie na morfologię komórek (głównie jony niklu), mimo to nie zaobserwowano znacznego wpływu badanych jonów na wydzielanie cytokin. Badania mikrobiologiczne wykazały, iż korony wykonane ze stopów niklu oraz kobaltu powodują zwiększoną kolonizację bakteriami zarówno tlenowymi jak i beztlenowymi. Natomiast korony wykonane ze stopów złota powodowały zmniejszenie występowania niektórych rodzajów bakterii, w tym m. in. *Porphyromonas gingivalis*.

W podsumowaniu można stwierdzić, że uzyskano nowe dane, które częściowo charakteryzują wpływ materiałów budujących korony protetyczne na odpowiedź cytokinową i mikrobiologiczną w obrębie otaczających tkanek przyzębia. Uzyskane wyniki wskazują, iż korony protetyczne mogą indukować odpowiedź immunologiczną, głównie związaną z reakcją zapalną, przy czym w najmniejszym stopniu wydzielanie cytokin wzrastało w przypadku koron wykonanych ze stopów złota. Obserwacja ta powinna mieć istotne znaczenie w praktyce protetycznej. W świetle uzyskanych wyników konieczne wydaje się przeprowadzanie oceny wpływu nowo opracowywanych biokompatybilnych materiałów dentystycznych pod względem ich wpływu na komórki układu odpornościowego tkanek przyzębia, tak aby wydzielane przez nie cytokiny w możliwie niewielkim stopniu zmieniały mikrośrodowisko jamy ustnej.

8. PIŚMIENNICTWO

- Adorini L (1999) Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 55 (12):1610-1625.
- Ajuebor MN, Swain MG (2002) Role of chemokines i chemokine receptors in the gastrointestinal tract. *Immunology* 105 (2):137-143.
- al-Hiyasat AS, Bashabsheh OM, Darmani H (2002) Elements released from dental casting alloys i their cytotoxic effects. *Int J Prosthodont* 15 (5):473-478.
- Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL (2002) Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod* 72 (4):338-343.
- ASSOCIATION ANSI/ADA (2005) Specification for Biological Evaluation of Dental Materials. AMERICAN DENTAL ASSOCIATION.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 307 (1):97-101.
- Baricevic M, Mravak-Stipetic M, Stanimirovic A, Blanusa M, Kern J, Loncar B, I abak A, Baricevic D (2011) Salivary concentrations of nickel and chromium in patients with burning mouth syndrome. *Acta Dermatovenerol Croat* 19 (1):2-5
- Bauer J, Costa JF, Carvalho CN, Gri e RH, Loguercio AD, Reis A (2012) Characterization of two Ni-Cr dental alloys and the influence of casting mode on mechanical properties. *J Prosthodont Res* 56 (4):264-271.
- Begerow J (1999) Long term urinary platinum, palladium, gold excretion of patients after insertion of noble metal dental alloys. *Biomarkers* 4 (1):27-36.
- Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M (1997) Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 13 (4):258-269
- Bordignon V, Palamara F, Cordiali-Fei P, Vento A, Aiello A, Picardo M, Ensoli F, Cristaudo A (2008) Nickel, palladium and rhodium induced IFN-gamma and IL-10 production as assessed by in vitro ELISpot-analysis in contact dermatitis patients. *BMC Immunol* 15(9):19.
- Can G, Akpinar G, Aydin A (2007) The release of elements from dental casting alloy into cell-culture medium and artificial saliva. *Eur J Dent* 1 (2):86-90
- Chai WL, Moharamzadeh K, Brook IM, Emanuelsson L, Palmquist A, van Noort R (2010) Development of a novel model for the investigation of implant-soft tissue interface. *J Periodontol* 81 (8):1187-1195.
- Choi JJ, Park MY, Lee HJ, Yoon DY, Lim Y, Hyun JW, Zouboulis CC, Jin M (2012) TNF-alpha increases lipogenesis via JNK and PI3K/Akt pathways in SZ95 human sebocytes. *J Dermatol Sci* 65 (3):179-188.
- Combe E (1997) Wstęp do materiałoznawstwa stomatologicznego. Sanmedica, Warszawa
- Contreras RG, Sakagami H, Nakajima H, Shimada J (2010) Type of cell death induced by various metal cations in cultured human gingival fibroblasts. *In Vivo* 24 (4):513-517.
- Cooper RG, Harrison AP (2009) The uses and adverse effects of beryllium on health. *Indian J Occup Environ Med* 13 (2):65-76.
- Craig RG, Powers M, Wataha JC (2000) Materiały Stomatologiczne. I edn. Wydawnictwo medyczne Urban& Partner, Wrocław.
- Dejak B, Kacprzak M, Suliborski B, Śmielak B (2006) Struktura i niektóre właściwości ceramik dentystycznych stosowanych w uzupełnieniach pełnoceramicznych w świetle literatury. *Protetyka stomatologiczna* 6 (LVI):471-477.

- Delves P, Martin S, Roitt I (2006) Roitt's Essential Immunology. vol 11. Blackwell Publishing, Birmingham.
- do Nascimento C, Monesi N, Ito IY, Issa JP, de Albuquerque Junior RF (2011) Bacterial diversity of periodontal and implant-related sites detected by the DNA Checkerboard method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30 (12):1607-1613.
- Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL (1998) Increased presence of interleukin-6 (IL-6) i IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol* 69 (8):899-910.
- Eliades T, Athanasiou AE (2002) In vivo aging of orthodontic alloys: implications for corrosion potential, nickel release, i biocompatibility. *Angle Orthod* 72 (3):222-237.
- Feferskov O, Kidd E (2006) Wydzielanie i skład śliny. W: Kaczmarek U (ed) Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne. Elsevier Urban & Partner, Wrocław.
- Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A (2000) Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid in cell populations in adult periodontitis patients the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 71 (10):1535-1545.
- Garhammer P, Hiller KA, Reitingner T, Schmalz G (2004) Metal content of saliva of patients with i without metal restorations. *Clin Oral Investig* 8 (4):238-242.
- Geurtsen W (2002) Biocompatibility of dental casting alloys. *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (1):71-84.
- Gołab J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T (2013) Cytokiny. W: Immunologia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Gołębiewska M (2003) Materiałoznawstwo protetyczne: skrypt dla studentów Oddziału Stomatologii Wydziału Lekarskiego AMB. AMB, Białystok.
- Goodson JM, Shoher I, Imber S, Som S, Nathanson D (2001) Reduced dental plaque accumulation on composite gold alloy margins. *J Periodontal Res* 36 (4):252-259.
- Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K (2003) Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 30 (12):1046-1052.
- Granchi D, Ciapetti G, Stea S, Savarino L, Filippini F, Sudanese A, Zinghi G, Montanaro L (1999) Cytokine release in mononuclear cells of patients with Co-Cr hip prosthesis. *Biomaterials* 20 (12):1079-1086.
- Graves DT, Cochran D (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 74 (3):391-401.
- Hajeer AH, Hutchinson IV (2000) TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 50 (3):216-228.
- Hannig M (1999) Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107 (1):55-64.
- Hędzielek W, Urbanek M, Wasiak W (1998) Uwalnianie się jonów metali z wybranych stopów dentystycznych w środowisku sztucznej śliny. Doniesienie wstępne. Paper presented at the III Konferencja Biomateriały i Mechanika w stomatologii, Ustroń, 8-11.10.1998.
- Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC (1977) Anaerobe Laboratory Manual. V.P.I., 4th Ed. Blacksburg, Virginia.
- Hultin M, Gustafsson A, Hallstrom H, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B (2002) Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 13 (4):349-358.
- Imirzalioglu P, Alaaddinoglu E, Yilmaz Z, Oduncuoglu B, Yilmaz B, Rosenstiel S (2012)

- Influence of recasting different types of dental alloys on gingival fibroblast cytotoxicity. *J Prosthet Dent* 107 (1):24-33.
- ISO, Organization IS ISO 1993. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods. International Standards Organization, Geneva.
- Jacobs JJ, GILbert JL, Urban RM (1998) Corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 80 (2):268-282.
- Kancyper SG, Koka S (2001) The influence of intracrevicular crown margins on gingival health: preliminary findings. *J Prosthet Dent* 85 (5):461-465.
- Kim DH, Novak MT, Wilkins J, Kim M, Sawyer A, Reichert M (2007) Response of monocytes exposed to phagocytosable particles and discs of comparable surface roughness. *Biomaterials* 28: 4231-4239.
- Kim W, Min S, Cho M, Youn J, Min J, Lee S, Park S, Cho C, Kim H (2000) The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 119 (1):175-181.
- Kirkpatrick CJ, Barth S, Gerdes T, Krump-Konvalinkova V, Peters K (2002) Pathomechanisms of impaired wound healing by metallic corrosion products. *Mund Kiefer Gesichtschir* 6 (3):183-190.
- Klausner M, Ayehunie S, Breyfogle BA, Wertz PW, Bacca L, Kubilus J (2007) Organotypic human oral tissue models for toxicological studies. *Toxicol In Vitro* 21 (5):938-949.
- Kmieć Z (2006) *Histologia i cytofizjologia zęba i jamy ustnej*. vol 1. Elsevier Urban & Partner, Wrocław.
- KnoernschILD KL, Rogers HM, Lefebvre CA, Fortson WM, Schuster GS (1999) Endotoxin affinity for orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 115 (6):634-639.
- KnoernschILD KL, Tompkins GR, Lefebvre CA, Schuster GS (1995) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide affinity for two casting alloys. *J Prosthet Dent* 74 (1):33-38.
- Kohal RJ, Pelz K, Strub JR (2004) Effect of different crown contours on periodontal health in dogs. Microbiological results. *J Dent* 32 (2):153-159.
- Kono Y, Beagley KW, Fujihashi K, McGhee JR, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, Kiyono H (1991) Cytokine regulation of localized inflammation. Induction of activated B cells and IL-6-mediated polyclonal IgG and IgA synthesis in inflamed human gingiva. *J Immunol* 146 (6):1812-1821.
- Kordasz P, Wolanek Z (1998) *Materiałoznawstwo protetyczno-stomatologiczne: podręcznik dla średnich szkół medycznych*. PZWL, Warszawa.
- Korobowicz A (2006) Biologia czynnika martwicy nowotworów typu alfa (TNF alfa). *Pol Merk Lek* XXI:358.
- Krawczyk P (2006) Metale w technice dentystycznej. *Nowoczesny Technik Dentystyczny* 1:19.
- Krieg NR, Holt JG eds. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1, Baltimore; Williams and Wilkins.
- Krzysiak P., Skóra M., Macura A.B.: *Atlas grzybów chorobotwórczych dla człowieka*. MedPharm, Wrocław, 2011.
- Lange D. *Wskaźniki stanu przyzębia w parodontologii*. 1996, Urban&Partner, Wrocław.
- Lang NP (1995) Periodontal considerations in prosthetic dentistry. *Periodontol* 9:118-131.
- Laurent F, Grosgeat B, Reclaru L, Dalard F, Lissac M (2001) Comparison of corrosion behaviour in presence of oral bacteria. *Biomaterials* 22 (16):2273-2282.
- Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T (2012) Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent* 40

- (8):686-692.
- Li MC, He SH (2004) IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 10 (5):620-625.
- Lopez-Alias JF, Martinez-Gomis J, Anglada JM, Peraire M (2006) Ion release from dental casting alloys as assessed by a continuous flow system: Nutritional and toxicological implications. *Dent Mater* 22 (9):832-837.
- Lucas LC, Lemons JE (1992) Biodegradation of restorative metallic systems. *Adv Dent Res* 6:32-37.
- Mahnon CR, Lehman DC, Manuselis G.: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3rd ed. Sanders Elsevier, St.Louis, 2007.
- Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2003) Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 30 (7):644-654. doi:376
- Majewski SW (2005) Rekonstrukcja zębów uzupełnieniami stałymi. Wydawnictwo Rozwoju Protetyki, Kraków.
- Majewski SW, Loster B, Majewski P (1999) Reaktywność tkanek okołowszczepowych na implantowane stopy metali szlachetnych w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach. *Protetyka stomatologiczna XLVIX* (3):131-136.
- Matasa CG (1995) Microbial attack of orthodontic adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 108 (2):132-141.
- Matikainen S, Paananen A, Miettinen M, Kurimoto M, Timonen T, Julkunen I, Sareneva T (2001) IFN- α i IL-18 synergistically enhance IFN- γ production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation i IFN- γ gene expression by IFN- α i IL-12. *Eur J Immunol* 31 (7):2236-2245.
- McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, McCormick PA, Sheahan K, Baird AW (2001) Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 50 (10):491-495.
- McGinley EL, Coleman DC, Moran GP, Fleming GJ (2011a) Effects of surface finishing conditions on the biocompatibility of a nickel-chromium dental casting alloy. *Dent Mater* 27 (7):637-650.
- McGinley EL, Fleming GJ, Moran GP (2011b) Development of a discriminatory biocompatibility testing model for non-precious dental casting alloys. *Dent Mater* 27 (12):1295-1306.
- McGinley EL, Moran GP, Fleming GJ (2012) Base-metal dental casting alloy biocompatibility assessment using a human-derived three-dimensional oral mucosal model. *Acta Biomater* 8 (1):432-438.
- McMahon RE, Ma J, Verkhoturov SV, Munoz-Pinto D, Karaman I, Rubitschek F, Maier HJ, Hahn MS (2012) A comparative study of the cytotoxicity and corrosion resistance of nickel-titanium and titanium-niobium shape memory alloys. *Acta Biomater* 8 (7):2863-2870.
- Messer RL, Bishop S, Lucas LC (1999) Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials* 20 (18):1647-1657.
- Minang JT, Arestrom I, Troye-Blomberg M, Lundberg L, Ahlborg N (2006) Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- i Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin Exp Immunol* 146 (3):417-426.
- Moretti LA, Barros RR, Costa PP, Oliveira FS, Ribeiro FJ, Novaes AB Jr, Palioto DB (2011) The influence of restorations and prosthetic crowns finishing lines on inflammatory levels after non-surgical periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol* 13(3):65-72.
- Muller AW, Maessen FJ, Davidson CL (1990) Determination of the corrosion rates of six dental NiCrMo alloys in an artificial saliva by chemical analysis of the medium using

- ICP-AES. Dent Mater 6 (1):63-68.
- Muller HP, Eger T (2002) Masticatory mucosa and periodontal phenotype: a review. Int J Periodontics Restorative Dent 22 (2):172-183.
- Natarajan M, Padmanabhan S, Chitharanjan A, Narasimhan M (2011) Evaluation of the genotoxic effects of fixed appliances on oral mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: an in-vivo study. Am J Orthod Dentofacial Orthop 140 (3):383-388.
- Noh MK, Jung M, Kim SH, Lee SR, Park KH, Kim DH, Kim HH, Park YG (2013) Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. Exp Ther Med. 6(3):847-851.
- Palaghias G (1985) Oral corrosion and corrosion inhibition processes--an in vitro study. Swed Dent J Suppl 30:1-72.
- Pancerz-Łoś M, Kmiec Z, Bereznowski Z (2004) Czynniki biologiczne i immunologiczne uczestniczące w patogenezie *periimplantitis*. Implantoprotetyka 5 (2):39-42.
- Pancerz-Łoś M, Kmiec Z, Bereznowski Z, Witalis A (2010) Miejscowe i ogólnoustrojowe konsekwencje periodontitis i peri-implantitis: przegląd piśmiennictwa. Protet. Stomatol. 60 (1):44-49.
- Passariello C, Puttini M, Virga A, Gigola P (2012) Microbiological and host factors are involved in promoting the periodontal failure of metaloceramic crowns. Clin Oral Investig 16 (3):987-995.
- Pöllänen MT, Paino A, Ihalin R (2013) Environmental Stimuli Shape Biofilm Formation and the Virulence of Periodontal Pathogens. Int J Mol Sci 14:17221-17237.
- Raap U, Stiesch M, Kapp A (2012) Contact allergy to dental materials. J Dtsch Dermatol Ges 10 (6):391-396;
- Rao CN, Biswas K (2009) Characterization of nanomaterials by physical methods. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif) 2:435-462.
- Ravnholt G (1998) Corrosion current, pH rise around titanium implants coupled to dental alloys. Sci J Dent Res 96:466-472.
- Ravnholt G, Jensen J (1991) Corrosion investigation of two material for implant. Supraconstructions coupled to a titanium implant. Sci J Dent Res 99:181-186.
- Reddy NR, Abraham AP, Murugesan K, Matsa V (2011) An invitro analysis of elemental release and cytotoxicity of recast nickel-chromium dental casting alloys. J Indian Prosthodont Soc 11 (2):106-112.
- Reddy NR, Ponsekar AA (2011) An in vitro analysis of elemental release and cytotoxicity of recast Ni-Cr dental casting alloys. J Indian Prosthodont Soc 11 (2):106-112.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P (1999) Are metals dietary carcinogens? Mutat Res 443 (1-2):157-181.
- Rosenstiel S, Li M, Fujimoto J (2002) Współczesne protezy stałe. Czelej, Lublin.
- Rustemeyer T, von Blomberg BM, van Hoogstraten IM, Bruynzeel DP, Scheper RJ (2004) Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel. Clin Exp Allergy 34 (9):1458-1466.
- Ryberg D, Alexi er J (1990) Mechanisms of chromium toxicity in mitochondria. Chem Biol Interact 75 (2):141-151.
- Samaranayake LP (2004) Podstawy mikrobiologii dla stomatologów. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Satou J, Fukunaga A, Satou N, Shintani H, Okuda K (1988) Streptococcal adherence on various restorative materials. J Dent Res 67:588-591.
- Sawicki W (2009) Histologia. wyd. 5. 2009, PZWL, Warszawa.
- Schmalz G, Garhammer P (2002a) Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. Dent Mater 18 (5):396-406.

- Schmalz G, Garhammer P (2002b) Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Dent Mater* 18 (5):396-406
- Schmalz G, Schuster U, Schweikl H (1998) Influence of metals on IL-6 release in vitro. *Biomaterials* 19 (18):1689-1694.
- Shah AG, Shetty PC, Ramachandra CS, Bhat NS, Laxmikanth SM (2011) In vitro assessment of photocatalytic titanium oxide surface modified stainless steel orthodontic brackets for antiadherent and antibacterial properties against *Lactobacillus acidophilus*. *Angle Orthod* 81 (6):1028-1035.
- Spiechowicz E (2010) Protetyka stomatologiczna. PZWL, Warszawa
- Starosvetsky D, Shenhar A, Gotman I (2001) Corrosion behavior of PIRAC nitrided Ti-6Al-4V surgical alloy. *J Mater Sci Mater Med* 12 (2):145-150.
- Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS (1991) Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* 18 (7):548-554.
- Steinberg D, Sela MN, Klinger A, Kohavi D (1998) Adhesion of periodontal bacteria to titanium, and titanium alloy powders. *Clin Oral Implants Res* 9 (2):67-72.
- Schwartzman-Morris J, Putterman C (2012). Gender differences in the pathogenesis and outcome of lupus nephritis. *Clin Dev Immunol* 2012:604892.
- Śramkiewicz J (1998) Ocena kliniczna i bakteriologiczna koron złożonych licowanych porcelaną. Rozprawa doktorska, Gdańsk, Gdański Uniwersytet Medyczny.
- Taylor R, Maryan C, Verran J (1998) Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *J Prosthet Dent* 80 (5):592-597.
- Tejchman H (1968) Ocena histochemiczna błony śluzowej jamy ustnej przylegającej do koron metalowych poddziąsłowych. Rozprawa doktorska, Gdańsk, Gdański Uniwersytet Medyczny.
- Tkaczyk C, Huk OL, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Petit A, Tabrizian M (2010) Effect of chromium and cobalt ions on the expression of antioxidant enzymes in human U937 macrophage-like cells. *J Biomed Mater Res A* 94 (2):419-425.
- Tonetti MS, Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP (1998). Neutrophil Migration Into the Gingival Sulcus Is Associated With Transepithelial Gradients of Interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol* 69 (10): 1139-1147.
- Traisnel M, le Maguer D, Hildebrand HF, Iost A (1990) Corrosion of surgical implants. *Clin Mater* 5 (2-4):309-318.
- Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM (2011) Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 38 (3):219-228.
- Ucar Y, Brantley WA, Johnston WM, Dasgupta T (2011) Mechanical properties, fracture surface characterization, and microstructural analysis of six noble dental casting alloys. *J Prosthet Dent* 105 (6):394-402.
- Urbanek-Brychczyńska M, Hędzielek W (2000) Skutki uboczne działania stopów metali stosowanych w leczeniu stomatologicznym. *Czas Stomat* (5):311-314.
- Vahey JW, Simonian PT, Conrad EU, 3rd (1995) Carcinogenicity and metallic implants. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 24 (4):319-324.
- Wang JY, Wicklund BH, Gustilo RB, Tsukayama DT (1996) Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials* 17(23):2233-40.
- Wataha JC, Hanks CT, Craig RG (1993) Uptake of metal cations by fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res* 27 (2):227-232.

- Wataha JC, Lockwood PE, Messer RL (2008) Brushing-induced surface roughness of nickel-, palladium-, and gold-based dental casting alloys. *J Prosthet Dent* 99 (6):455-460.
- Wilcoxon JP, Abrams BL (2006) Synthesis, structure and properties of metal nanoclusters. *Chem Soc Rev* 35 (11):1162-1194.
- Wirz J, Diedrichs G (2002) Galwanoprotetyka – nowe możliwości wytwarzania protez biologicznych. Kwintesencja, Warszawa.
- Wirz J, Jungo M (1996) Zahnärztliche Materialien und Werkstoffe auf dem Prüfstand. *Quintessenz* 47 (6):837-846.
- Wirz J, Steinemann S (1987) Korrosionsvorgänge in der Mundhöhle. *Philip* 2:81.
- Wolf HF, Rateitschak E, Rateitschak K (2006) *Periodontologia*. vol 1. Czelej, Lublin.
- Wylie CM, Shelton RM, Fleming GJ, Davenport AJ (2007) Corrosion of nickel-based dental casting alloys. *Dent Mater* 23 (6):714-723.
- Xu Q, Izumi K, Tobita T, Nakanishi Y, Feinberg SE (2009) Constitutive release of cytokines by human oral keratinocytes in an organotypic culture. *J Oral Maxillofac Surg* 67 (6):1256-1264.
- Yamazoe M (2010) Study of corrosion of combinations of titanium/Ti-6Al-4V implants and dental alloys. *Dent Mater J* 29 (5):542-553.
- Yu L, Su J, Zou D, Mariano Z (2013) The concentrations of IL-8 and IL-6 in gingival crevicular fluid during nickel-chromium alloy porcelain crown restoration. *J Mater Sci Mater Med* 24(7):1717-1722.
- Zabel M (2001) *Histologia. Podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii*. vol 1. Elsevier Urban & Partner, Wrocław.