

БИОМЕХАНИЧЕСКАЯ И ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НЕПРОМЫТЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ С РЕЗОРБИРУЕМЫМ НАПЫЛЕНИЕМ И ПОКРЫТЫХ АЛЮМИНИЕВЫМ НАПЫЛЕНИЕМ/ПРОТРАВЛЕННЫХ КИСЛОТОЙ ПОВЕРХНОСТЕЙ

Паулу Г. Коэльо, Отделение биоматериалов и биомиметиков, Нью-Йоркский университет, Нью-Йорк, Нью-Йорк, США
Чарльз Марин, Родриго Гранато, Отделение стоматологии, Федеральный Университет де Санта Катарина, Флорианополис, SC, Бразилия
Габриэла Джиро, Отделение Diagnostico e Cirurgia, факультет одонтологии де Аракауара, UNESP, Аракауара, SP, Бразилия
Марсело Сузуки, Отделение простодонтии, Университетская школа зубной медицины Тафта, Бостон, Массачусетс, США
Эстевэм А. Бонфанте, Отделение простодонтии, Университет Сан-Паулу, Школа стоматологии Бауру, Бауру, SP, Бразилия

Цели

Сравнить биомеханическую фиксацию и гистоморфометрические параметры между двумя поверхностями имплантата: не промытых поверхностей с резорбируемым напылением (NWRBM) и покрытых алюминиевым напылением/протравленных кислотой поверхностей (AB/AE), на попытках собак.

Материалы и методы

Топография поверхностей была оценена растровой электронной микроскопией, оптической интерферометрией и химической рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией (XPS). Использовались шесть собак породы гончей в возрасте около 1.5 лет, каждое животное получило один имплантат каждой поверхности на конечность (места дистальных лучевых костей). После 3 недель заживающего периода животные были подвергнуты эвтаназии, и половина имплантатов была проверена биомеханическим образом (вращающий момент удаления), а у другой половины была проведена

недекальцинированная гистологическая обработка. При гистоморфометрическом анализе рассматривался контакт кости и имплантата (BIC) и размещение фракций в области кости (BAFO). Затем, после проведения анализа нормальности данных с помощью теста Колмогорова-Смирнова, был сделан статистический анализ с помощью спаренных t-тестов на 95%-ом уровне значимости.

Результаты

Поверхностные параметры шероховатости Sa (средняя поверхностная шероховатость) и Sq (среднеквадратичная поверхность), были значительно ниже для NWRBM по сравнению с AB/AE. Спектры XPS показаны наличие Ca и P в NWRBM. В то время, как никакие существенные различия не наблюдались, как для BIC, так и для BAFO параметров ($P > 0.35$ и $P > 0.11$, соответственно), значительно более высокий уровень вращающего момента наблюдался для группы NWRBM ($P = 0.01$). Морфология кости была похожей между группами, что выявило прису-

ствие недавно сформированной соединительной костной ткани вблизи поверхностей имплантата.

Заключение

Значительное увеличение ранней биомеханической фиксации наблюдалось для имплантатов представлявших поверхность NWRBM.

В начале 1980-ых, поверхность имплантата была идентифицирована как один из шести важных факторов для успешной остеоинтеграции (Альбретсон и др., 1981). С тех пор, получили импульс усилия спроектировать топографию и химию поверхности, которые в конечном счете улучшают заживление кости и уменьшает время ожидания между размещением устройства и функциональной нагрузкой, и в настоящее время расцениваются как тема высокого процента в стоматологии имплантатов (Альбретсон и Веннерберг, 2004; Коэльо и др., 2009).

До настоящего времени, существующее разнообразие производственных методов обработки настолько обширно,

что попытки классифицировать поверхности методом модификаций стало трудной задачей (Дохан Эренфест и др., 2010). Поэтому, была развита сложная система кодификации, где поверхностная характеристика, сделанная с помощью стандартных аналитических инструментов, описывает химический состав (то есть состав массы материала и его химических или биохимических модификаций) и физические характеристики поверхности (топография в микро - и миллимикронных масштабах) (Дохан Эренфест и др., 2010). Однако известно, что поверхностная топография меняется в зависимости от различных методов обработки, может измениться поверхностная химия и физика, даже и самопроизвольно (Веннерберг и Альбрехтсон, 2009).

Среди поверхностных модификаций, изменяющих как химия, так и топографию, покрытие гидроксиапатитом или другими составами СаР были в центре нескольких исследований (Веннерберг и Альбрехтсон, 2009). Частично этот интерес проявляется из-за того факта, что эти элементы являются те же самыми основными компонентами естественной костной ткани и покрытия могут быть применены на поверхности имплантата с помощью различных промышленных методов обработки (Коэльо и др., 2009). На изменения химического состава обращалось внимание в прошлом с покрытиями PSHA, но долгосрочные оценки показали компромисс в соединении между PSHA и титановой поверхностью, приводящему к разрыву связи в дополнение к неоднородному росту/деградация (Кей, 1992; Онг и др., 2004; Янг и др., 2005). Последовательные поверхностные биокерамические покрытия, которые приводят к существенно более тонкой толщине покрытия включают в себя депонирование с помощью

пульсирующего лазера (Ким и др., 2005), депонирование путем травления с ионным стимулированием (Гранато и др., 2009), электрофоретическое депонирование (Лейсфилд, 1998) и другие методы. Для отложения Са и Р на поверхности имплантата и внутри него также использовались дискретные прозрачные покрытия и рассасывающиеся средства напыления (RBM), альтернативные непрерывным тонким покрытиям (Коэльо и др., 2009). Было также исследовано использование дополнительной обработки RBM поверхности с последующим травлением кислотой и без него (непромытые RBM) (Марин и др. 2010). Несмотря на различия в Количестве СаР, появляющиеся в результате последующих за RBM процедур напыления, вращающий момент удаления, контакт кости и имплантата (VIC) и размещение фракций в области кости (BAFO) не существенно отличались в короткие сроки после имплантации в естественных условиях (Марин и др. 2010). Поскольку измеренные параметры шероховатости (Sa - средняя поверхностная шероховатость и Sq - среднеквадратичная поверхность) не значительно отличались между этими поверхностями (RBM и RBM + травление кислотой), то поэтому можно предложить это количество СаР на поверхности RBM не было ни полезно, ни вредно для изученных поверхностей. Таким образом, это исследование выдвинуло гипотезу о том, что увеличенное количество СаР на не промытой RBM поверхности (NWRBM) привело бы к увеличенному вращающему моменту удаления, VIC и BAFO относительно покрытых алюминием и протравленных кислотой поверхностей (AB/AE).

Материалы и методы

В данном исследовании исполь-

зовались поверхности NWRBM и AB/AE имплантатов диаметром 3.75 мм и длиной 10-миллиметров (Touareg, Adin Dental Implants Systems Ltd., Афула, Израиль). По шесть имплантатов каждого типа поверхности были переданы для проведения в физико-химического анализа. Поверхностная топография была оценена растровой электронной микроскопией (SEM) (Philips XL 30, Эйнховен, Нидерланды) при 5000 увеличении и напряжении ускорения 20 кВ (n=3 на каждую поверхность). Параметры шероховатости Sa и Sq были оценены оптической интерферометрией (IFM) (Phase View 2.5, Палезо, Франция). По три имплантата каждого типа поверхности были оценены в плоской области конечностей имплантата (по три измерения на имплантат), и для разделения шероховатости от волнистости и линий формы для цифрового трехмерного измерения, использовался высокочастотный Гауссовский фильтр 50 X 50 мм (Leach 2009). Статистический анализ на 95%-ом уровне значимости был выполнен односторонним аппаратом ANOVA.

Химическое исследование было выполнено путем рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (XPS). Имплантаты были вставлены в вакуумную шлюзовую камеру и дегазированны до 10^{-7} торр. Образцы, затем, были переведены под вакуумный спектрометр XPS (Kratos Axis 165 multi-technique, Kratos Analytical Inc., Чеснат Ридж, Нью-Йорк, США). Обозреваемый спектр был получен с помощью 165 мм среднего радиуса концентрического полусферического анализатора включенного при постоянной энергии прохода в 160 эВ для обзора и 80 эВ для просмотров с высокой разрешающей способностью. Был применен угол взлета 90° и размер пятна 150 X 150 μm .

Поверхности имплантата были оценены в различных местах (по три на имплантат).

В качестве подопытных животных использовались восемь собак гончей породы возрастом около 1.5 лет. После одобрения комитета по этике Федерального университета де Санта Катарина, каждому животному установили один имплантат каждого типа поверхности на конечность (места лучевых костей) (n=16 всего имплантатов за эксперимент). Перед общим наркозом, были применены сульфат атропина IM (0.044 мг/кг) и хлорат ксилацина (8 мг/кг). Затем, использовалась доза 5 мг/кг хлората кетамина, чтобы достигнуть общего наркоза.

Хирургические операции для доступа к кости и по закрытию раны были уже подробно описано в другом месте (Коэльо и др., 2010; Марин и др., 2010). Для моделирования естественных условий, были использованы по 16 имплантатов каждого типа поверхности. В каждом радиусе, стартовая поверхность имплантата взаимно менялась, для того чтобы минимизировать отклонения от различных мест имплантации, что позволило сравнить результаты вращающегося момента у того же самого числа поверхностей имплантата через 3 недели на конечность, место хирургического вмешательства (1 или 2) и животное. Установка имплантата происходила следуя инструкциям изготовителей.

Послеоперационное антибиотическое и противовоспалительное лечение включало единственную дозу бензатин бензила пенициллина (20UI/kg) IM и кетопрофена 1% (1 мл/5 кг). Животные были подвергнуты эвтаназии по истечению постхирургического периода в 3 недели с помощью смертельной дозы анестетика и конечности были удалены путем отрезания. Мягкая ткань была удалена хирургическими лезвиями, и

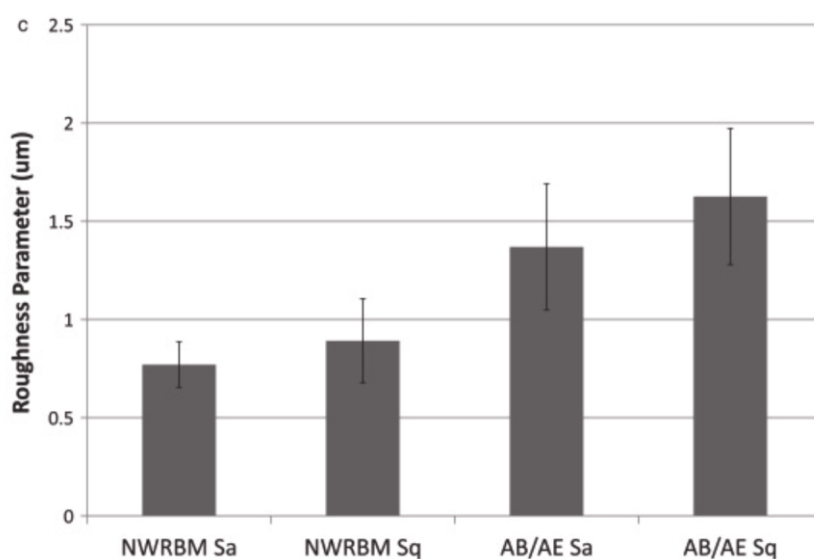
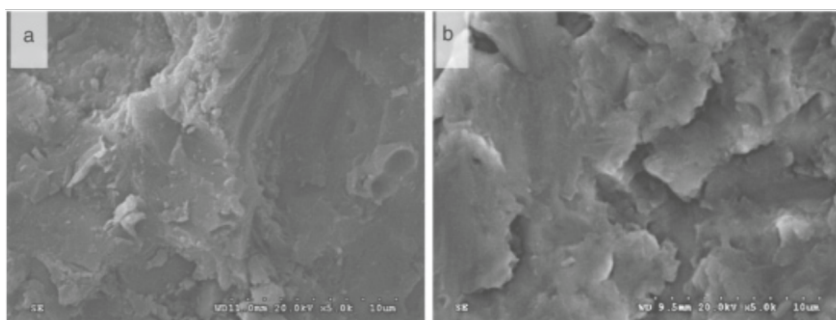


Таблица Д

| Химический элемент (%) | NWRBM | AB/AE |
|------------------------|-------|-------|
| Al2p | 1.04 | 3.94 |
| C1s | 32.91 | 40.25 |
| Ca2p | 9.84 | 0.4 |
| O1s | 41.27 | 37.79 |
| P2p | 8.28 | 0.24 |
| Ti2p | 3.01 | 9.22 |
| V2p3 | 0.16 | 0.41 |

Рис. 1. Микрографии электронного сканирования (a) NWRBM поверхности изображающие признаки внедренных частиц и (b) AB/AE. (c) Измеримые параметры шероховатости (Sa и Sq) в основном показали более высокий профиль шероховатости для группы AB/AE по сравнению с NWRBM (P<0.001).

Таблица Д. Средний химический состав для различных поверхностей, наблюдавшийся в спектрах XPS.

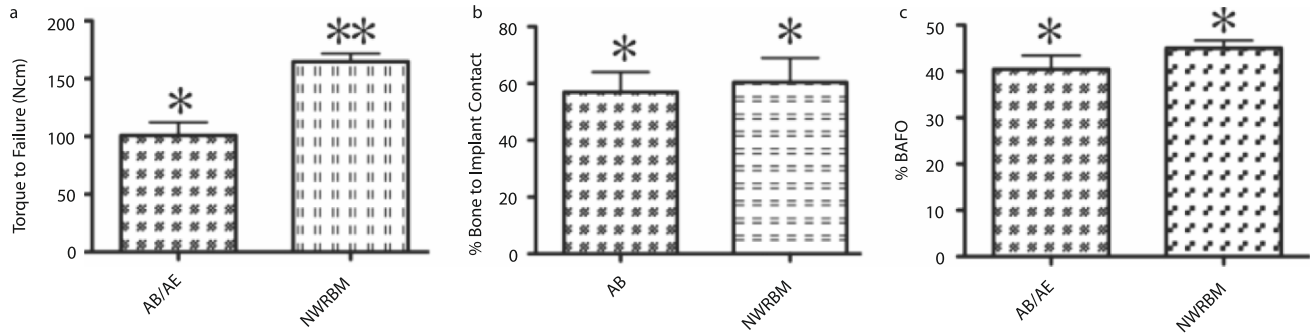


Рис. 2. (а) по ветрикали - Вращающий момент до отказа (Н\см)

Рис. 2. (b) по ветрикали - % Костной ткани в контакте с имплантатом

Рис. 2. (а) Значительно более высокий вращающий момент удаления ($P=0.01$) наблюдался для поверхности NWRBM по сравнению с AB/AE, тогда как статистическая сумма (b) BIC и (c) BAFO ($P>0.35$ и $P>0.11$, соответственно) (в среднем \pm 95%-ые интервалы значимости) не представила существенных различий.

была выполнена первичная клиническая оценка, чтобы определить стабильность имплантата. Если имплантат был клинически нестабилен, то он был исключен из исследования. Половина имплантатов были биомеханическим образом проверены (на вращающий момент удаления), а другая половина передана для проведения недекальцинированной гистологии, как уже сообщалось (Козель и др., 2010; Марин и др., 2010). Гистоморфометрический анализ учитывал показания BIC и BAFO. После проведения анализа нормальности данных с помощью теста Колмогорова-Смирнова, был сделан статистический анализ с помощью спаренных t-тестов на 95%-ом уровне значимости.

Результаты

Электронные микрографии обеих поверхностей имплантата, и их полученные в результате параметры IFM шероховатости поверхности, представлены на Рис. 1. Поверхностная структура, наблюдаемая на микрографиях SEM, при высоком увеличении показала наличие остаточных внедренных частиц на NWRBM (Рис. 1а), но не вкрапленных частиц алюминия на AB/AE (Рис. 1б). Значения S_a и S_q были значительно ниже для NWRBM по

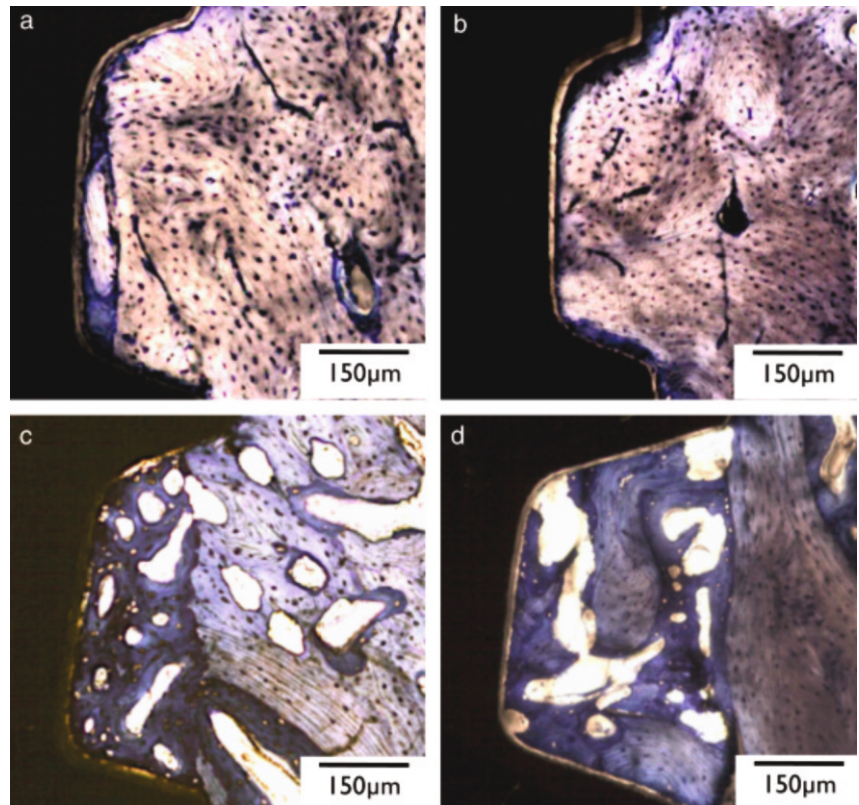


Рис. 3. Оптическая микроскопия выявила похожий отклик костной ткани на имплантат для NWRBM (а – кортикальный и с – трабекулярный) и AB/AE (b – кортикальный и d – трабекулярный), где наблюдается недавно сформировавшаяся соединительная ткань вблизи обеих поверхностей.

сравнению с АВ/АЕ (Рис. 1с) ($P < 0.001$). Спектры XPS показали присутствие Са и Р в NWRBM (80% TCP 20% HA) (Рис. 1d).

Никаких осложнений во время операций на животных и в послеоперационный период не наблюдалось, и все имплантаты были клинически стабильны сразу после экзтаназии. В то время, как никаких существенных различий не наблюдалось и для BIC, и для параметров BAFO ($P > 0.35$ и $P > 0.11$, соответственно), значительно более высокий уровень вращающего момента наблюдался у группы NWRBM ($P = 0.01$) (Рис. 2). Морфология костной ткани была похожей между группами, что выявило появление недавно сформировавшейся соединительной ткани вблизи поверхностей имплантата (Рис. 3).

Обсуждение

Оценка шероховатости поверхности IFM показала более высокий Sa и Sq для АВ/АЕ по сравнению с NWRBM, что находится в согласии с предыдущим исследованием (Марин и др., 2010). Хотя более высокая блокировка кости и вращающий момент удаления ожидался бы для более шероховатой поверхности АВ/АЕ, никакие существенные различия в том, предыдущем исследовании, не наблюдались, при сравнении с RBM и RBM+травленными кислотой поверхностями (Марин и др., 2010). Эти результаты предполагают, что либо количество СаР было слишком низким, и/или что шероховатость поверхностей была одинаково эффективна для обеспечения сопротивления вращающему моменту удаления. Для того, чтобы далее оценить этот вопрос, повторное исследование оценило получающийся BIC и вращающий момент удаления поверхности RBM, теперь со значительно более высоким Sa и Sq по сравнению с АВ/АЕ, и, что

примечательно, никакого различия у подопытной собаки не наблюдалось на 2-ю или 4-ю недели в естественных условиях (Бонфанте и др., в печати).

Учитывая вопросы, поднятые в предыдущих исследованиях RBM, целью данного исследования была дальнейшая оценка эффекта увеличенных количеств СаР процедурой RBM без промывания при сравнении с поверхностью АВ/АЕ. Несмотря на более высокую шероховатость последней поверхности, которая оказалась в умеренном диапазоне шероховатости, показанный ранее, для того чтобы представить самую сильную реакцию костной ткани (Са приблизительно $1.5 \mu\text{m}$) (Веннерберг и др., 1995a, 1995b, 1996; Веннерберг и Альбрехтсон 2009), полученный в результате более высокий вращающий момент удаления для более гладкой поверхности NWRBM предполагает, что остаточный СаР был полезен для биомеханической фиксации имплантата, но не для BIC и BAFO. Как уже подчеркивалось ранее в литературе, интерпретация статических гистоморфометрических параметров, таких как BIC и BAFO должна проводиться с осторожностью, потому что они являются индикаторами остеоинтеграции, которые не отражают точно биомеханическое взаимодействие кость/имплантат (Коэльо и др., 2009).

Гистоморфологические срезы отразили тот факт, что кость находится в тесном контакте с обеими поверхностями имплантата в трабекулярных и кортикальных костях через 3 недели, предполагая, что поверхности были биологически совместимы и остеокондуктивны.

Более высокий вращающий момент удаления наблюдался для NWRBM по сравнению с АВ/АЕ, но не существенно отличающийся от измерений BIC и BAFO, ведя к частичному

у признанию гипотезы данного исследования. Поскольку RBM обработка поверхностей с постбластировочной доводкой, которая привела к различным количествам Са и Р на поверхности (меньшим, чем в данном исследовании), была предпринята ранее, то результаты полученные в данном исследовании ободрают, и желательно проводить дальнейшее исследование относительно состава NWRBM, связанное с работой естественных условиях.

Выражения признания

Данное исследование было частично поддержано Отделением стоматологии (отделение оральной и хирургической стоматологии) в Федеральном университете де Санта Катарины, FAPESP (#2010/06152-9) и компанией Adin Dental Implants.

Литература

1. Альбректсон Т., Бранемарк П.И., Хансон Х.А. И Линдстром Дж. (1981) «Остеоинтегрированные титановые имплантаты. Требования для гарантии длительного, прямого прикрепления кости к имплантату у человека». *Acta Orthopaedica Scandinavica* 52:155–170.
2. Альбректсон Т. и Веннерберг А. (2004) «Поверхности зубных имплантатов: часть 1 – обзор, сосредоточенный на топографических и химических свойствах различных поверхностей, и реакция на них в естественных условиях». *International Journal of Prosthodontics* 17:536-543.
3. Бонфанте Е.А., Марин С., Гранато Р., Сузуки М., Хьерп Дж., Витек Л. и Коэльо, П.Г. «Биомеханическая и гистологическая оценка покрытых алюминиевым напылением/протравленных кислотой поверхностей и не промытых поверхностей с резорбируемым напылением». *Journal of Oral Implantology*, doi: 10.1563/AAID-JOI-D-10-00105.
4. Коэльо П.Г., Граньеро Дж.М., Романос Г.Е., Сузуки М., Силва Н.Р., Кардараполи Г., Томпсон В.П. И Лемонс Дж.Е. (2009) «Основные методы исследования и текущие тенденции поверхностей зубных имплантатов». *Journal of Biomedical Materials Research Часть Б: прикладные биоматериалы* 88:579-596.
5. Коэльо П.Г., Сузуки М., Гимараеш М.В., Марин С., Гранато Р., Жиль Дж.Н. и Миллер Р.Дж. (2010) «Быстрое заживление костной ткани вокруг различных дизайнов корпусов и хирургических методов имплантатов: исследование на собаках». *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 12: 202–208.
6. Дохан Эренфест Д.М., Коэльо П.Г., Канг Б.С., Сул Й.Т. и Альбректсон Т. (2010) классификация поверхностей остеоинтегрированных имплантатов: материалы, химия и топография. *Trends Biotechnology* 28:198–206.
7. Гранато Р., Марин С., Сузуки М., Жиль Дж.Н., Джанал М.Н. и Коэльо П.Г. (2009) «Биомеханическая и гистоморфометрическая оценка тонкого ионного луча биокерамического отложения у имплантатов платовидной формы корня: экспериментальное исследование на собаках». *Journal of Biomedical Materials Research Часть Б: прикладные биоматериалы* 90:396–403.
8. Кау Дж. (1992) «Покртия из фосфата кальция для зубных имплантатов». *Dental Clinics of North America* 36: 1–18.
Ким Н., Камата Р.П., Вора Й.К. и Лейсфилд В.Р. (2005) «Контроль состава фазы в двухфазных тонких покрытиях из гидроксиапатита/фосфата тетракальция для биомедицинских применений». *Journal of Materials Science Материалы в Медицине* 16: 961–966.
9. Лейсфилд, В.Р. (1998) «Текущий статус керамических покрытий для зубных имплантатов. *Implant Dentistry* 7:315–322.
10. Лич Р. (2009) «Характеристика топографии поверхности». в: Elsevier «Основные принципы инженерной нанометрологии», 211–258. Бостон: William Andrew Pub.
11. Марин С., Гранато Р., Сузуки М., Джанал М.Н., Джил Дж.Н., Немковски С., Бонфанте Е.А. и Коэльо П.Г. (2010) «Биомеханический и гистоморфометрический анализ протравленных и не протравленных резорбируемых обработанных средствами напыления поверхностей имплантатов: экспериментальное исследование на собаках». *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 3: 382–391.
12. Онг Дж.Л., Карнс Д.Л. и Бессо К. (2004) «Оценка титановых имплантатов с плазменным напылением и имплантатов из гидроксиапатита с плазменным напылением в естественных условиях. *Biomaterials* 25: 4601–4606.
13. Веннерберг А. и Альбректсон Т. (2009) «Структурное влияние покрытий из фосфата кальция и их возможный эффект на расширенную интеграцию костной ткани». *Acta Odontologica Scandinavica* 31: 1–8.
14. Веннерберг А., Альбректсон Т. и Андерсон В. (1995а) «Исследование на животных винтов из титана вворачивает с различными топографиями поверхности». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 6: 302–309.
15. Веннерберг А., Альбректсон Т., Андерсон В. и Крол Дж.Дж. (1995b) «Гистоморфометрическое исследование и исследование вращающего момента удаления имплантатов из титана в форме винта с тремя различными топографиями поверхности». *Clinical Oral Implants Research* 6: 24–30.
16. Веннерберг А., Альбректсон Т., Йоханссон С. И Андерсон В. (1996) «Экспериментальное исследование витых и с абразивным напылением имплантатов в форме винта со специальным акцентом на эффекты напыленного вещества и топографии поверхности. *Biomaterials* 17: 15–22.
17. Ян Й., Ким К.Х. и Онг Дж.Л. (2005) «Обзор покрытий из фосфата кальция изготовленных с помощью процесса напыления – альтернатива плазменному распылению». *Biomaterials* 26: 327–337.