ЛАЗЕРНОЕ МОДИФИЦИРОВАНИЕ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ С ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ

■ A. Heinrich
■ K. Dengler
■ T. Koerner
■ B. Stritzker

Кафедра Экспериментальной физики IV, Университет Аугсбурга, Университет штрассе, 1, 86135, Аугсбург, Германия

■ C. Haczek
■ H. Deppe

Клиника МКГ хирургии, Мюнхенский технический университет, «Клиникум Рехтс дер Изар» («Клиника на правом берегу реки Изар»), Исманингер Штрассе 22, 81675, Мюнхен, Германия

При использовании систем зубной имплантации основной проблемой является адгезия прилежащей к имплантату слизистой оболочки в области шейки. Цель данного исследования заключалась в изучении использования лазера для воздействия на титановые имплантаты с целью обеспечения адгезии слизистой, которая является необходимым биологическим барьером, препятствующим развитию бактериальной инфекции.

В стоматологии внутрикостные имплантаты приобрели огромное значение. В то время как внедрение в кость обеспечивает стабильность имплантата, состояние краевых мягких тканей, прилегающих к имплантату, является важным фактором долговременного эффекта имплантации. Существует множество различий между десневыми и окружающими имплантат тканями. Тогда как около зубов субэпителиальные пучки коллагеновых волокон ориентированы перпендикулярно к цементному веществу корня зуба, при установке зубного имплантата волокна располагаются параллельно поверхности имплантата [1]. Более того, соединительная ткань слизистой оболочки вокруг имплантатов содержит значительно большее количество коллагена и меньше фибробластов, чем соответствующий компонент десневой ткани [2].

Таким образом, инфекции, возникающие вследствие образования зубного налёта, приводят к разрушению ткани, которое более выражено в зоне около имплантатов, и быстро распространяются на костный мозг, без поражения зубов [3].Причиной такого различия может быть отсутствие соединения в основании границы между мягкой тканью и имплантатом, а также отсутствие связи цемента и коллагеновых волокон. Это способствует более быстрому распространению налёта вниз вдоль имплантата по сравнению с распространением вдоль зуба. Неспособность прилегающих к имплантату тканей к заживлению после «субгингивальной» инфекции приводит к распространению инфекционного процесса и потере инфицированного имплантата. Для предотвращения развития подобных ситуаций была разработана хирургическая технология для элиминации подвижной слизистой оболочки, которая в наибольшей степени подвержена воспалительным изменениям [4]. Однако было показано, что в отличие от естественной периодонтальной ткани даже кератинизированный эпителий, прилегающий к имплантату, не содержит гемидесмосом [5] и перпендикулярных пучков волокон [6].

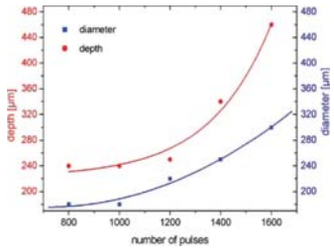
Таким образом, очевидно, что необходимы биологические улучшения поверхностей зубных имплантатов, применение которых приведет к перпендикулярному росту коллагеновых волокон и сосудов по отношению к имплантату, и врастанию их в имплантат. Такие распространенные техники, как вытравливание или пескоструйная обработка не подходят для образования сложных 3D-подобных структур [7,8]. Последние модификации поверхности имплантатов касались частей, внедряемых в кость, но не частей, прилегающих к слизистой оболочке. В некоторых из этих исследований воздействовали лазерным излучением на внутрикостную титановую поверхность [9–13], или касались вопросов повторной остеоинтеграции [14, 15]. В связи с этим, целью данного исследования было изменение коронковых частей зубных имплантатов путем воздействия на них эксимерным лазером. В дополнение к предыдущим экспериментам, в данном проводили исследование взаимодействия клеток и поверхности имплантата [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЗУБНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ

Стандартные 15-миллиметровые зубные имплантаты с плазменным напылением, каждый 4,5 мм в диаметре (Фриалит 2, «Фриадент АГ», Маннхайм, Германия), были извлечены из упаковки и зафиксированы за внутрикостный участок в штатив для образцов (смотри ниже). Затем коронковые шлифованные поверхности имплантатов были обработаны лазером.

Рис. 1. Экспериментальная установка



* Ось абсцисс: количество импульсов; ось ординат слева направо: глубина (мкм), диаметр (мкм), подписи на графике сверху вниз: диаметр, глубина.

Рис. 2. Зависимость глубины и диаметра поры от количества лазерных импульсов при постоянной энергии лазера

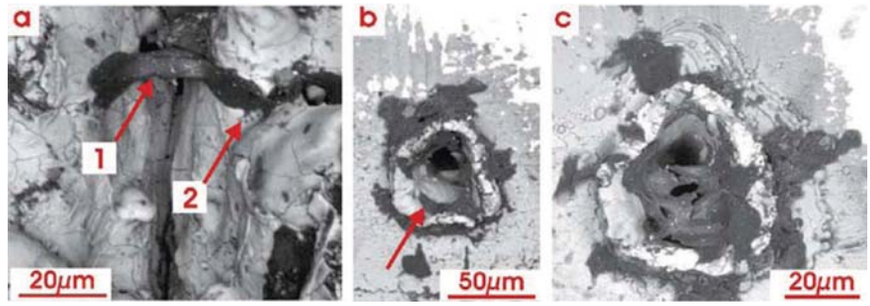


Рис. 5. Имплантат, окруженный клетками:
a. Клетки достигают внутренней поверхности поры и начинают образовывать мостики (клетка – 1, псевдоподии – 2);
b. Если диаметр поры слишком большой, клетки внутри поры прикрепляются к боковой стенке;
c. Из-за продолжающейся адгезии клеток в поре образуется капсула с пустым подлежащим пространством

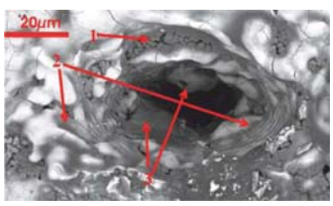


Рис. 3. Типичное изображение поры

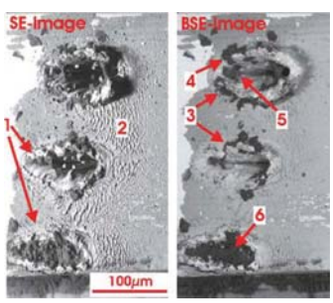


Рис. 4. Изображение пор в режимах SE и BSE

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

Экспериментальная установка показана на Рисунке 1. В данном исследовании использовали эксимерный лазер KrF (1) (248 нм, длина импульса 30 нс, 50 Гц) (LPX 305, «Лямбда физикс», Гёттинген, Германия). Для уменьшения дивергенции света лазерный луч сначала пропускали через линзу (2) (f = 10 м). Далее, поперечное сечение луча света уменьшали с помощью отверстия (3) (3 x 3 мм^2) и расщепляли на три пучка с помощью утраивающей линзы (4). Кроме того, с помощью двух линз [(5) f = 0,1 м/(6) f = 0,15 м)] свет фокусировали на коронковой части имплантата, установленного на вращающемся столике. Лазерный свет хорошо поглощался титаном, так что использование в процессе прижигания наибольшей пульсовой энергии (≈15–17 Дж/см^2) приводило к ограниченному термическому воздействию на толщу металла. Таким образом, образовывались три поры с диаметром до 50 мкм (на расстоянии < 100 мкм) на поверхности имплантата.

КЛЕТОЧНАЯ АДГЕЗИЯ

Прежде всего имплантаты были очищены при помощи изопропанола и автоклавирования при 134 °C в течение 20 минут. Затем они были помещены в культуру клеток фибробластов на несколько часов. Эту процедуру проводили насколько можно быстро, для того, чтобы оценить начальную и предпочтительную область клеточной адгезии.

ОПИСАНИЕ

Образцы исследовали при помощи экологического сканирующего электронного микроскопа (ESEM; XL 30, «ЭфИАй Кампани») для визуализации всей поверхности обработанных лазером имплантатов, а также адгезионного поведения клеток. Здесь могут быть использованы две различных модели: для топологического исследования используют детектор вторичных электронов (SE детектор). При этом больший контраст достигался при измерении рассеянных электронов (режим BSE). Во всех случаях исследования проводили при остаточном давлении воды 1,4 мм. рт. ст.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первую очередь была исследована зависимость глубины и диаметра пор от количества лазерных импульсов при одинаковой энергии лазера (см. Рис. 2). Было ясно показано значительное увеличение глубины и одновременно их диаметра с увеличением количества импульсов. Далее, имплантаты помещали в культуру клеток, и исследовали клеточную адгезию с использованием экологического сканирующего электронного микроскопа. Типичное изображение поры продемонстрировано на Рис. 3. В принципе, изображение представлено узнаваемыми светлыми полями, которые соответствуют титановому имплантату, и более тёмными участками.

Для того чтобы определить, соответствуют ли эти участки фибробластам, был использован рентгеноспектральный анализ на основе метода энергетической дисперсии. Он выявил значительные различия между (1) солевыми кристаллами, (2) раствором как таковым и (3) фибробластами. На Рис. 4 (снимки в режимах SE и BSE) показана клеточная адгезия к трем порам, образованная тремя пятнами. Преимущество снимка в режиме SE (левый) в том, что он ясно показывает структуру поверхности.

Очевидно, что каждая пора окружена валиком (1), который образован скоплением разрушенного при абляции материала. Кроме того, волнообразная структура поверхности, образованная между порами (2), характерна для расплавленного и вновь застывшего металла. Таким образом, лазерное воздействие не было ограничено только областью поры. Фибробласты скапливаются особенно часто вокруг края пор (3), что лучше видно на снимке в режиме BSE (правый). В области между порами клеточная адгезия практически не определяется. (Имплантат помещали в раствор, содержащий культуру клеток, только на короткое время). Таким образом, валик вокруг пор является местом предпочтительной фиксации клеток. Более того, клетки могут накладываться на валик и прилегать к внутренней стенке поры (4). Также возможно образование мостиков внутри пор (5) или полное покрытие пор (6).

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании представлены данные, полученные при проведении экологической сканирующей электронной микроскопии, о клеточной адгезии к порам, проделанным в имплантатах с использованием лазера. В первую очередь, мы наблюдали увеличение диаметра и глубины пор с увеличением количества лазерных импульсов при одинаковой энергии лазера (смотри Рис. 2). В этом контексте следует помнить, что скорость абляции зависит от размера пятна и энергетической плотности. Таким образом, увеличение глубины пор с увеличением количества импульсов коррелирует с увеличением скорости перфорации и, соответственно, более высокой энергетической плотностью образца.

Поскольку во время эксперимента оптическая установка не изменялась, более высокая скорость абляции или энергетическая плотность были результатом изменения поверхности. В самом начале поверхность была плоской. С первым импульсом происходило расплавление и частичное удаление материала. Начинала формироваться структура поры; то есть в структуре имплантата формировалась пора цилиндрической формы. С этого момента не только свет лазера достигал дна поры в материале, подвергаемом абляции. Также на дно попадал свет, отраженный от боковых стенок. Таким образом, энергетическая плотность на дне повышалась с образованием цилиндрической боковой стенки, что приводило к более высокой скорости перфорирования. Понятно, что этот свет, а также свет, отраженный от дна на боковые стенки, увеличивал и диаметр пор. Так можно интерпретировать увеличение диаметра пор с увеличением количества импульсов. Как показано на Рис. 4, клетки начинают прикрепляться в первую очередь к валику вокруг пор. Поток среды, в которой находилась культура клеток, в качестве причины можно исключить, поскольку эксперимент проводили без какого-либо движения установки. Таким образом, повышенная неровность поверхности провоцировала клетки к прикреплению именно на этих определенных областях.

После этого развитие клеточной адгезии будет описано следующим образом. В среде, содержащей культуру, имплантат был окружен клетками. Они начинали прикрепляться в основном в областях неровностей, поскольку псевдоподии клеток легче приклеиваются в таких местах. Также клетки достигали внутренней поверхности поры и начинали образовывать мостики (смотри Рис. 5a).

Но существует максимальное расстояние, которое не может быть превышено при образовании мостиков. Если диаметр поры слишком велик, клетки внутри поры прикрепляются к ее внутренней стенке, как показано на Рис. 5b. Интересно отметить, что клетки не прикрепляются к дну поры. Этот феномен может быть связан со стремлением клеток растягиваться настолько широко, насколько это возможно. Таким образом, это может быть минимальный диаметр поры. При продолжении клеточной адгезии пора капсулируется с образованием пустого подлежащего пространства, как показано на Рис. 5c.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лазерное облучение титановых имплантатов позволяет создавать 3D изменения поверхности. При воздействии экспериментальной установки в стандартных зубных имплантатах одновременно проделывали три поры с диаметром до 50 мкм (минимум) на расстоянии 100 мкм. Таким образом, скорость абляции в большой степени зависит от формы образца. Она увеличивается в процессе проведения процедуры из-за формирования структуры поры. Начальная и предпочтительная области прикрепления клеток были исследованы при использовании экологической сканирующей электронной микроскопии.

Было ясно показано, что фибробласты в первую очередь прикрепляются к краю поры из-за повышенной неровности поверхности на этом участке. Внутри поры клетки образуют мостики и полностью капсулируют пору с образованием пустого подлежащего пространства. В эксперименте было показано, что при использовании пористых структур можно достичь лучшего прикрепления клеток к имплантату. В этом случае будет предотвращен рост налёта вдоль имплантата вниз, что является важным фактором долговременного успеха установки имплантата. Выражение признательности. Эта работа была поддержана Баварским исследовательским фондом, Мюнхен, Германия.

Статья предоставлена ООО «Открытая стоматология», Москва, т. (495) 663-86-88, www.opendentistry.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello 1. CP, Liljenberg B, Thomsen P (1991) The soft tissue barrier at implants and teeth. Clin Oral Implants Res 2:81–90

2. Berglundh T, Linde J, Marinello C, EricssonI, Liljenberg B (1992) Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res 3:1–8

3. Lindhe J, Berglundh Th, Ericsson I, Liljenberg B, 3. Marinello C (1992) Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in beagle dogs. Clin Oral Implants Res 3: 9–16

4. Bruggencate CM, Krekeler G, van der 4. Kwast WA, Oosterbeek HS (1991) Palatal mucosa grafts for implant devices. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 72:154–158

5. Mыller N (1997) Parodontium und 5. periimplantдres Gewebe. ZWR 106:22–31

6. Ruggeri A, Franchi M, Marini N, Trisi P, Piatelli 6. A (1992) Supracrestal circular collagen fiber network around osseointegrated nonsubmerged titanium implants. Clin Oral Implants Res 3:169–175

7. Wennerberg A, Albrektsson T (2000) Suggested 7. guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. Int J Oral Maxillofac Implants 15:331–344

8. Pilliar RM (1998) Overview of surface variability 8. of metallic endosseous dental implants: textured and porous surfacesstructured designs. Implant Dent 7:305–314

9. Chauvy PF, Hoffmann P, Landolt D (2003) 9. Electrochemical micromachining of titanium using laser oxide filmlithography: excimer laser irradiation of anodic oxide. Appl Surf Sci 211: 113–127

10. Gaggl A, Schultes G, Mыller WD, Kдrcher H (2000) 10. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces—a comparative study. Biomaterials 21:1067–1073

11. Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, 11. Wennerberg A (2003) An in vivo study of bone response to implants topographically modifie by laser micromachining. Biomaterials 24: 701–710

12. Karacs A, Fancsaly AJ, Divinyi T, Peto G, Kovach 12. G (2003) Morphological and animal study of titanium dental implant surface induced by blasting and high intensity pulsed Nd-glasslaser. Mater Sci Eng C 23:431–435

13. Peto G, Karacs A, Paszti Z, Guczi L, Divinyi T, 13. Joob A (2003) Surface treatment of screw shaped titanium dental implants by high intensity laser pulses. Appl Surf Sci 186:7–13

14. Deppe H, Horch HH, Henke J, Donath K (2001) 14. Peri-implant care of ailing implants with the carbon dioxide laser. Int J Oral Maxillofac Implants 16:659–667

15. Deppe H, Greim H, Brill T, Wagenpfeil S (2002) 15. Titanium deposition after peri-implant care with the carbon dioxide laser. Int J Oral Maxillofac Implants 17:707–714

16. Deppe H, Warmuth S, Heinrich A, Koerner 16. T (2005) Laserassisted three-dimensional surface modifcations of titanium implants: preliminary data. Lasers Med Sci 19:229–233