

Biologické testy chromkobaltové slitiny povrchově upravené nitridem titanu a nitridem zirkonia

Vaněk J., Prachár P., Bartáková S., Březina V., Freyburg L.

Stomatologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, Brno,
přednosta prof. MUDr. J. Vaněk, CSc.

Věnováno k významnému životnímu jubileu prof. MUDr. J. Bildera, CSc.

Souhrn

V současnosti platí, že materiály užívané běžně v ústní dutině, pouze na sliznicích, k můstkovým konstrukcím atd. jsou co do mechanicko-fyzikálních vlastností odpovídající. Lze s nimi velmi dobře pracovat. Jsou technologicky ideálními materiály, protože jejich úprava a manipulace je snadná. Pro kontakt pouze na povrchu gingivy a sliznice ústní dutiny je jejich biotolerantnost plně akceptovatelná. V kostěné části při kontaktu s implantovaným materiálem je situace z důvodu požadované osseointegrace složitější a náročnější. Je nutné využívat minimálně bioinertní materiály, nebo bioaktivní materiály.

Proto bylo v rámci našeho výzkumu vytvořeno jádro z chromkobaltové slitiny běžně užívané ve stomatologické praxi, povrchově upravené nitridem titanu nebo nitridem zirkonia. Tyto povlakované vrstvy byly testovány pro možnost využití v orální implantologii. Výsledek biologického testování prokázal biologickou přijatelnost pro implantologické účely.

Klíčová slova: osseointegrace – nitrid zirkonia – nitrid titanu – biologické testy

Vaněk J., Prachár P., Bartáková S., Březina V., Freyburg L.: Biological Tests of Chromium-cobalt Alloy Coated with Zirconium Nitride and Titanium Nitride

Summary: It is well established in recent clinical stomatology that the materials used routinely in oral cavity, mucosa, and bridges constructions have proper mechanical and physical characteristics. The materials are ideal from technological point of view and it is easy to work with them in clinical practice. Their processing and surface finishing is easy. The materials show high biocompatibility when used in gingival and mucosal surfaces. In a jaw, the contact of implant materials with bone tissue and required osseointegration represent more complex and demanding issue than in soft tissues. In bone tissue, there is a necessity to use the materials exhibiting a high level of bioactivity. Within the frame of a long-term research project, we tested a modification of material routinely used in stomatological practice. A chromium-cobalt alloy was coated with titanium nitrate or zirconium nitrate. The two above-specified surface layers were tested for a prospective application in dental implantology. The results of standard biotests demonstrated a biocompatibility sufficient for the requirements of dental implantology.

Key words: osseointegration – zirconium nitrate – titanium nitrate – biological tests

Čes. Stomat., roč. 105, 2005, č. 6, s. 149–153.

ÚVOD

Materiály v dentální implantologii prošly mnoha testováními co do biologických vlastností, tak mechanicko-fyzikálních vlastností [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Existuje sedm skupin materiálů při testování. Skupina, která je pro studii potřebná je II. – materiály protetické (chirurgicko-protetické) a v ní třída implantačních materiálů – segmentálních, enoseálních, subperiostálních, endodontických implantátů.

Materiály pro implantologii rozdělujeme podle biologických vlastností (2) na:

1. biotolerantní,
2. bioinertní,
3. bioaktivní.

Biotolerantní materiály jsou tolerovány, což znamená, že při jejich vhojení dochází k fibrointegraci. Jedná se o vazivovou mezivrstvu mezi dentálním implantátem a kostí. Takové spojení je z dlouhodobého hlediska pro implantologii nepřijatelné. Takovými materiály jsou drahokovové

slitiny, slitiny obecných kovů, chromkobaltové slitiny.

Bioinertní materiály jsou tkáni akceptovány plně biologicky. Vlastní vhojení dentálního implantátu se děje pomocí oseointegrace. Do této skupiny patří titan se svými slitinami, tantal, uhlíkové materiály, polykrystalická a monokrystalická keramika, zirkoniumoxidová keramika.

Bioaktivní materiály vytvářejí pravděpodobně fyzikálně-chemické spojení mezi dentálním implantátem a kostí – biointegraci. Patří sem materiály jako jsou hydroxyapatitová keramika, tri a tetrakalciová keramika, bioaktivní sklokeramika.

Jako další kritérium vhodnosti implantačních materiálů pro klinické účely jsou mechanicko-fyzikální vlastnosti. Tyto jsou dány přesnou specifikací. Podle nich lze materiály rozdělit v opačném sledu. To znamená, že nejlepší mechanicko-fyzikální vlastnosti mají drahokovové slitiny, slitiny obecných kovů a slitiny na bazi kobaltu.

Tyto všechny aspekty nás vedly k definování bazálního materiálu, který bude dobře zpracovatelný s finanční dostupností. Stala se jím chromkobaltová slitina běžně užívaná v každodenní praxi. Zlepšení biokompatibility materiálu jsme řešili povlakováním základního materiálu nitridem titanu nebo nitridem zirkonia, které podle předpokladů měly splňovat bioinertnost [7, 8].

MATERIÁL A METODIKA

Cílem bylo zkoušení biologických vlastností nanosených vrstev pro možnost přijatelnosti materiálů. Nutné bylo stanovit pozitivní i negativní kontrolu pro biologické testování.

Bylo navrženo testování materiálů podle platných FDI biologických testů [9]. Jednalo se o testy úvodní jak s nitridem titanu a nitridem zirkonia. Jednotlivé vrstvy byly na chromkobaltové jádro nanoseny metodou magnetronového naprašování (PVD – Physical Vapour Deposition). Adhezibilita takto povlakovaných materiálů je velmi vysoká.

Realizovali jsme testy **cytotoxicity testovaného materiálu** ve třech metodách.

1. Test toxicity (inhibice růstu buněk) – byl proveden na živočišných buňkách heteroploidní buněčné linie. Účelem bylo zjistit toxicitu výluhu testovaného materiálu. Růst buněčné kultury byl stanoven jako růstová křivka kultury, vyjádřená počtem buněk v jednom mililitru. Počet buněk byl proveden v Burkerově počítací komůrce po oddělení buněk od substrátu pomocí versenu a jejich promíchání. Každý den pokusu byly spočítány buňky z každé varianty ve trojím opakování a údaje průměrovány.

2. Test dilatace buněk – byl proveden na živočišných buňkách heteroploidní buněčné linie. Účelem bylo zjistit, do jaké míry jsou buňky výluhem testovaného materiálu ovlivněny ve své schopnosti adherovat. To znamená přichytit se a rozšířit svoje membrány. Test vypověděl o míře schopnosti buněk tolerovat výluh testovaného materiálu. Vzorek testovaného materiálu byl umístěn do Petriho misky, přelit suspenzí buněk v mediu a kultivován. Po určené době se v mikroskopu v dopadajícím světle vyhodnocoval přímý charakter adheze buněk k testovanému substrátu.

3. Test adaptace buněk k testovanému materiálu – byl proveden na živočišných buňkách a jeho účelem bylo zjistit, zda se v narostlé buněčné kultuře, do níž je přidán pevný vzorek materiálu, tvoří zóna odumírajících buněk a jak je tato zóna velká. Test vypověděl o toleranci rostoucích buněk k pevnému testovanému materiálu. Testovaný kovový materiál byl nanesen na sklo v tenké průhledné formě a buňky byly suspendovány na tento povrch. Vyhodnocovala se oblast v těsné blízkosti daného vzorku a stanovovala se tzv. inhibiční zóna, tedy zóna odumírajících buněk a její velikost.

Genotoxicity testovaného materiálu ve dvou způsobech:

1. Test toxicity (inhibice růstu buněk) – byl proveden na živočišných buňkách heteroploidní buněčné linie. Účelem bylo zjistit toxicitu výluhu testovaného materiálu. Růst buněčné kultury byl stanoven jako růstová křivka kultury, vyjádřená počtem buněk v jednom mililitru. Počet buněk byl proveden v Burkerově počítací komůrce po oddělení buněk od substrátu pomocí versenu a jejich promíchání. Každý den pokusu byly spočítány buňky z každé varianty ve trojím opakování a údaje průměrovány.

2. Test dilatace buněk – byl proveden na živočišných buňkách heteroploidní buněčné linie. Účelem bylo zjistit, do jaké míry jsou buňky výluhem testovaného materiálu ovlivněny ve své schopnosti adherovat. To znamená přichytit se a rozšířit svoje membrány. Test vypověděl o míře schopnosti buněk tolerovat výluh testovaného materiálu. Vzorek testovaného materiálu byl umístěn do Petriho misky, přelit suspenzí buněk v mediu a kultivován. Po určené době se v mikroskopu v dopadajícím světle vyhodnocoval přímý charakter adheze buněk k testovanému substrátu.

3. Test adaptace buněk k testovanému materiálu – byl proveden na živočišných buňkách a jeho účelem bylo zjistit, zda se v narostlé buněčné kultuře, do níž je přidán pevný vzorek materiálu, tvoří zóna odumírajících buněk a jak je tato zóna velká. Test vypověděl o toleranci rostoucích buněk k pevnému testovanému materiálu. Testo-

vaný kovový materiál byl nanesen na sklo v tenké průhledné formě a buňky byly suspendovány na tento povrch. Vyhodnocovala se oblast v těsné blízkosti daného vzorku a stanovovala se tzv. inhibiční zóna, tedy zóna odumírajících buněk a její velikost.

Genotoxicity testovaného materiálu ve dvou způsobech:

1. Test morfologických atypií mitóz – byl proveden v heteroploidní buněčné linii. V mikroskopu se odečítala frekvence tripolárních či multipolárních mitóz, frekvence mitotických buněk s migrujícím chromozomem, nebo shlukem chromozomů a mitotický index. Test vypověděl o možném karcinogenním působení testovaného agens. Buňky byly resuspendovány v testovaném mediu a kultivovány do stadia konfluence. Poté je medium odsáto a buňky na skle jsou fixovány a obarveny. V preparátu jsou hodnoceny a počítány mitózy s vyjádřením počtu atypických metafázových figur. Referenčním vzorkem byly buňky kultivované v neovlivněném mediu.

2. Test indukce chromozomálních aberací – byl proveden jak na lidských lymfocytech, tak na heteroploidní buněčné linii. Účelem bylo zjistit, zda výluh testovaného materiálu indukuje změny na chromozomech v dlouhodobé kultivaci. Test vypověděl o schopnosti materiálu indukovat chromozomové aberace, a tedy o jeho mutagenních vlastnostech. Byly užity lymfocyty dobrovolníka – muže 30 let, pracovně neexponovaného mutagenním látkám, nekuřáka, který nekonzumuje alkohol. Lymfocyty byly kultivovány standardním způsobem, to je po 48 hodinách byl přidán kolcemid a po dalších třech hodinách bylo provedeno standardní cytogenetické zpracování. V každé variantě bylo hodnoceno 100 mitóz a stanoven počet a typ chromozomálních aberací. Jako mutagenní je hodnocen materiál, který indukuje více než 5 % aberantních mitóz a je-li prokázána závislost na dávce.

Byly připraveny válečky z chromkobaltové slitiny o průměru 8 mm a výšce 3 mm. Na toto jádro byly nanášeny vrstvy 1. nitridu titanu a 2. nitridu zirkonia. Dále zde byly pozitivní kontrola a negativní kontrola.

VÝSLEDKY

Test toxicity (inhibice růstu buněk)

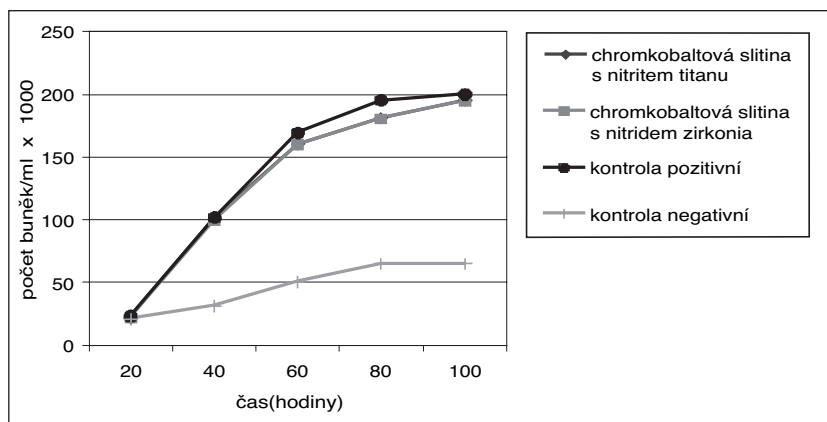
V rámci tohoto testu nebyla zjištěna růstová deprese v žádném ze zkoumaných materiálů proti pozitivní kontrole. Kontrola s definovanou toxickou složkou vykazuje standardní růstovou depresi. Růstové křivky jsou zobrazeny v grafu 1.

Test dilatace buněk

Dilatace, adherence buněk k jednotlivým zkoušeným materiálům se neliší od pozitivní kontrolní varianty, není zde deprese v křivkách hodnocení počtu adherovaných buněk za daný čas. Negativní kontrola odpovídá depresi dané toxicitou. Výsledky jsou zobrazeny v grafu 2.

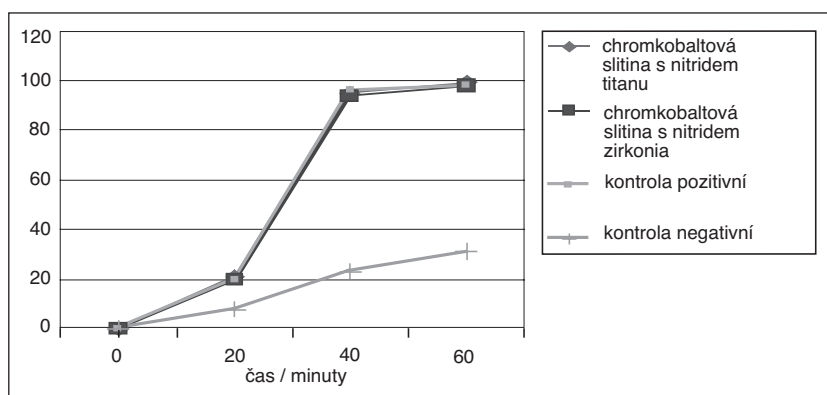
Test adaptace buněk k testovanému materiálu

Oblast, tzv. inhibiční zóna, není rozdílná u daných zkoušených materiálů oproti kontrolní pozitivní variantě, nevytváří se tedy patrná vrstva odumírajících buněk. V negativní kontrolní



Graf 1. Charakter růstu buněk HeLa v závislosti na povrchové úpravě materiálu.

Graph 1. Character of the HeLa cells growth in relation to the surface coating of the material.



Graf 2. Charakter dilatační křivky v závislosti na užití povrchové vrstvy.

Graph 2. Character of the dilatation curve in relation to the surface layer used.

Tab. 1. Výsledky testů mutagenity v závislosti na ředění

Tab. 1. Results of mutagenicity in relation to dilution

Varianta	Opakování		Mitóz	Aberantních	%
	1	2	3	mitóz	aberantních
	Počet mitóz		Celkem	Celkem	Celkem
ZrN + neředěné medium (m.)	0	3	1300	4	1,33
ZrN + ředěné 50% (m.)	1	1	2300	4	1,33
ZrN + ředěné 25% (m.)	1	2	2300	5	1,67
TiN + neředěné (m.)	1	1	2300	4	1,33
TiN + ředěné 50% (m.)	2	1	2300	5	1,67
TiN + ředěné 25% (m.)	2	0	1300	3	1,00
Pozitivní kontrola	2	1	1300	4	1,33
Negativní kontrola	9	11	12 300	32	10,67

variantě je tato vrstva odumírajících buněk zřetelná.

Test morfologických atypií mitóz

Při tomto testu nebylo zjištěno možné karcinogenní působení testovaných agens. Oproti kontrolní pozitivní variantě nebyly zjištěny rozdíly při hodnocení.

Test indukce chromozomálních aberací

Nebyla zjištěna zvýšená frekvence chromozomálních aberací, tedy zkoumané materiály nepůsobí mutageně. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 1.

DISKUSE

V dentální implantologii existuje několik druhů povrchové úpravy dentálních implantátů. Snahou je dokonalá biokompatibilita [1, 6]. Tedy z pohledu dentální či orální implantologie biointertnost nebo lépe oseointegrace daného materiálu.

Při užití hydroxyapatitu bylo dosaženo i bioaktivity z pohledu biologických vlastností materiálu. Bohužel u tohoto materiálu po stránce mechanicko-fyzikální nebylo dosaženo potřebné kvality, především adheze vrstvy nanesené na bazální vrstvu [2, 5, 10, 11]. Proto jsou hledány stále nové možnosti povrchové úpravy implantátů. K těm patří i nitrid titanu a nitrid zirkonia [11, 12, 13]. Biologická přijatelnost těchto materiálů byla absolutně potvrzena. Podobně je tomu i u mechanicko-fyzikálních vlastností především tak důležité adheze těchto vrstev na základní chromkobaltovou strukturu. Výsledky jsou pozitivní a lze předpokládat úspěšnost takového užití v klinické praxi.

ZÁVĚR

Doporučené úvodní biologické testy pro implantační materiál, tvořený chromkobaltovým jádrem povrchově upraveným nitridem titanu

nebo nitridem zirkonia, potvrdily inertnost takto strukturovaného materiálu. Je možné tento materiál využít pro dentální implantologii. Jednou z možností mohou být subperiostální implantáty. Využitím takto strukturované slitiny může také být zhotovování prote-

tických skeletových náhrad. V tomto směru začínáme s preklinickými zkouškami.

Celá studie je součástí grantového výzkumu IGA MZ ČR ND/7356-3.

LITERATURA

1. **Vaněk, J., Prachár, P., Bartáková, S., Fassmann, A., Freyburg, L.:** Kvalita osseointegrace zavedených enosseálních dentálních titanových implantátů a celkový zdravotní stav. *Čes. Stomat.*, 102, 2002, 2, s. 48–52, ISSN 1210-7891.
2. **Šimůnek, A. a kol.:** Dentální implantologie. Nucleus, Hradec Králové, 2001, 192, ISBN 80-86225-15-1.
3. **Fassmann, A., Dvořáková, N.:** Nové metody terapie kostních defektů orofaciálního skeletu. *Čes. Stomat.*, 99, 1999, s. 88–93.
4. **Fassmann, A. a kol.:** Řízená tkáňová a kostní regenerace ve stomatologii. Grada Publishing, a.s., 2002, ISBN 80-247-0316-5.
5. **Dostálová, Z., Himmlová, L., Jelínek, M., Bártová, J.:** Spojení titanových implantátů a biokeramiky na bázi hydroxyapatitu – hodnocení in vitro. *Čes. Stomat.*, 95, 1995, s. 89–96.
6. **Vaněk, J., Prachár, P., Bartáková, S., Fassmann, A.:** Vyhodnocení osseointegrace zavedených enosseálních jednofázových čepelkových implantátů do dvou let po implantaci. *Čes. Stomat.*, 102, 2002, 1, s. 11–17, ISSN 1210-7891.
7. **Prachár, P., Vaněk, J., Bartáková, S., Březina, V.:** Růst buněk stabilizované linie HeLa ve výluhu chromkobaltové slitiny povrchově upravené nitridem titanu a nitridem zirkonia. *Prakt. zub. Lék.*, roč. 53, 2005, č. 1, s. 12–14.
8. **Mengel, R., Meer, C., Flores-de-Jacoby, L.:** The treatment of uncoated and titanium nitride-coated abutments with different instruments. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants*, 19, 2004, 2, s. 232–238.
9. **Vaněk, J., Březina, V., Freyburg, L.:** Testování biokompatibilita nových stomatologických materiálů. *Auto-referát, Scripta Medica*, 65, 1992, 2, s. 124.
10. **Kopecká, D., Šimůnek, A.:** Současné názory na povlakování dentálních implantátů hydroxyapatitem. *Čes. Stomat.*, 100, 2000, s. 29–35.
11. **Wie, H., Hero, H., Solheim, T.:** Hot isostatic pressing-processed hydroxyapatite-coated titanium implants: light microscopic and scanning electron microscopy investigations. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants*, 13, 1998, 6, s. 837–844.

12. **Groessner-Schreiber, B., Neubert, A., Muller, W. D., Hopp, M., Griepentrog, M., Lange, K. P.:** Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an in vitro study. *J. Biomed. Mater. Res.*, 15, 2003, 64A(4), s. 591–599.
13. **Nagai, M., Hayakawa, T., Fukatsu, A., Yamamoto, M., Fukumoto, M., Nagahama, F., Mishima, H., Yoshinari, M., Nemoto, K., Kato, T.:** In vitro study of col-

lagen coating of titanium implants for initial cell attachment. *Dent. Mater. J.*, 21, 2002, 3, s. 250–260.

Prof. MUDr. Jiří Vaněk, CSc.

*Stomatologická klinika LF MU a FN u sv. Anny
Pekařská 53
656 91 Brno*

Další práci jubilatovi věnovali:

Fassmann A., Slapnička J., Izakovičová-Hollá L., Augustín P., Celerová J.:
Plazma bohatá na trombocyty v tkáňovém inženýrství

RECENZE KNIHY

Kastenbauer, E. R., Tardy, M. E.: Ästhetische und plastische Chirurgie an Nase, Gesicht, Ohrmuschel
Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 2005, 470 s., ilustrace v textu, barevná obrazová příloha.

Známé německé vydavatelství uvádí na knižní trh již třetí vydání monografie, která je společným dílem německých a amerických autorů. Kniha je rozdělena do dvaceti tematicky zaměřených kapitol. První část knihy je věnována chirurgii nosu – od korekčních operací nosního septa přes korekční chirurgické výkony k odstranění stenóz až po rhinoplastiky. Podrobně jsou probrány také možnosti korekčních operací rozštěpových vad, chirurgické postupy při rekonstrukci zevního nosu a estetická chirurgie očních víček. Pozornost je věnována také komplikacím blefaroplastik a jejich léčení.

Pasáže věnované rhytidoplastice (faceliftu) informují o všem podstatném od výběru pacienta přes psychologické aspekty operace až po detaily operační techniky. Následují informace o využití laseru v estetické chirurgii, možnostech korekce kožních jizev a tranplantace tukové tkáně. Zvláštní kapitola je věnována estetice obličejového profilu.

Podrobné informace o možnostech rekonstrukce defektů měkkých tkání obličeje ocení každý, kdo se zabývá maxilofaciální onkochirurgií. Maxilofaciálního chirurga budou zajímat především možnosti rekonstrukce defektů tváře a rtů.

Po krátké kapitole věnované plastické a rekonstrukční chirurgii ušních boltců následují pasáže věnované chirurgickým možnostem estetické rehabilitace poruch motorické inervace. Probrány jsou možnosti rekonstrukce motorických nervů i korekční chirurgické výkony na měkkých tkáních. Knihu uzavírá stručná informace o možnostech fotodynamické laserové terapie maligních tumorů kůže.

Každý čtenář jistě ocení krásnou grafickou úpravu knihy, desítky názorných ilustrací i jasný a srozumitelný text. I když je monografie určena především plastickým chirurgům, bude jistě zdrojem inspirace a poučení i pro maxilofaciální chirurgy a otolaryngology. Recenzent v knize jen obtížně hledá chyby nebo slabé stránky až na jednu maličkost: fotografické přílohy umístěné na 39 stranách v závěru knihy mají mnohdy posunuté barevné spektrum a jejich barvy tak působí nepřírodně. Odstranit tento drobný nedostatek by v éře dokonalých počítačových programů nemělo být problémem.

Prof. MUDr. Jindřich Pazdera, CSc.

*Klinika ústní, čelistní a obličejové
chirurgie LF UP, Olomouc*