

SZAKDOLGOZAT

**Titán és cirkónia osseointegrációjának
vizsgálata *in vitro* körülmények között**

Masa Roland

V. éves fogorvostan-hallgató

Szeged, 2014

Szegedi Tudományegyetem
Fogorvostudományi Kar

SZAKDOLGOZAT

Titán és cirkónia összeintegrációjának vizsgálata
in vitro körülmények között

Készítette: **Masa Roland**

V. éves fogorvostan-hallgató

Témavezetők: **Dr. Laczkóné Dr. Turzó Kinga**, egyetemi docens

Dr. Györgyey Ágnes, egyetemi tanársegéd

Orálbiológiai és Kísérletes Fogorvostudományi Tanszék

Szeged, 2014

Tartalomjegyzék

1. Implantátumok és bioanyagok.....	2
1.1. Az oszeintegráció folyamata	4
1.2. A titán fizikai-kémiai tulajdonságai	5
1.3. Ti implantátumok felületmódosítási lehetőségei	7
1.4. Cirkónium (Zr) és cirkónia (ZrO ₂) fizikai-kémiai tulajdonságai	10
1.5. Cirkónia implantátumok felületmódosításai	13
1.6. A felületi érdesség szerepe az oszeintegrációban.....	14
2. Vizsgálataink célja.....	15
3. Anyagok és módszerek.....	16
3.1. Próbatetek (korongok) jellemzése	16
3.2. Atomierő mikroszkóp (AFM).....	16
3.3. MTT és alamarBlue módszerek	17
3.4. Fluoreszcens mikroszkópia.....	20
4. Eredmények.....	22
4.1. AFM eredmények.....	22
4.2. MG-63 sejt kultúra vizsgálatok	23
4.3. Fluoreszcens mikroszkópia.....	24
5. Összefoglalás	27
6. Irodalomjegyzék	28
7. Köszönetnyilvánítás	32

1. Implantátumok és bioanyagok

A fogorvoslás mai napig egyik legdinamikusabban fejlődő szakterülete az implantológia. A modern orvostudománynak és szociális jólétnek köszönhetően az átlag életkor egyre jobban megnőtt, így egyre több embernek kell fogpótlást készíteni. Már egyetlen fog hiánya is súlyos következményeket vonhat maga után. Ilyen a szomszédos fogak hiány felé dőlése, az antagonista fog elongációja, okklúzió, artikuláció megváltozása, alveoláris csontlebontódás, illetve nem elhanyagolható az esztétikai hátrány sem. A hiányzó fog pótlását a hagyományos protetikai ellátás során elsősorban híd készítésével oldják meg, ami a szomszédos ép fogak lecsiszolását vonja maga után. Az implantátumok szélesebb körű elterjedése olyan alternatívát jelent, amellyel az egészséges szövetek maximálisan megőrizhetőek, és magasabb esztétikájú pótlások készíthetőek. Az implantátum mesterséges foggyökérnek tekinthető, amelyet pontos tervezést követően az eltávolított fog helyére ültetnek be, majd a megfelelő gyógyulási idő után elkészíthető a kívánt felépítmény.

Az első sikeres próbálkozások jóval időszámításunk előttre nyúlnak vissza. Kr.e. 600-ban már három darab, fogformájúra faragott implantátumot ültettek be az alsó állcsontba, amelyekről később kimutatták, hogy valódi szoros kapcsolat alakult ki a pótlás és a csont között (Vajdovich, 2008).



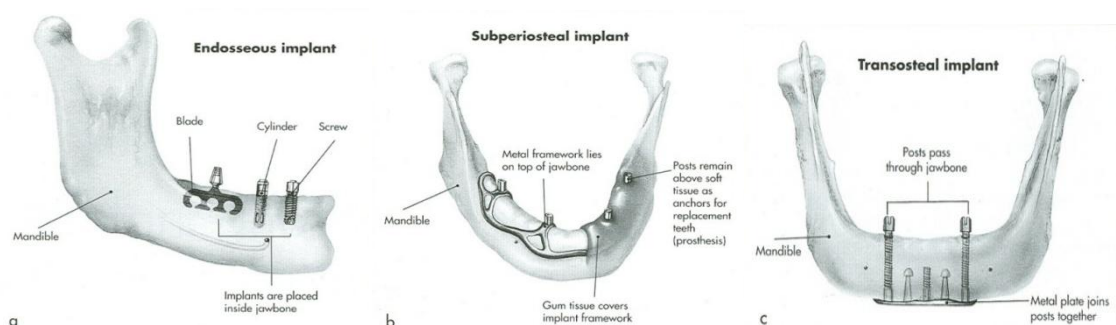
1. ábra. Kagylóból kifaragott implantátumok az alsó metszők helyén (hondurasi lelet) (Vajdovich, 2008).

A 18-19. században számos anyaggal (elhalt donorból eltávolított fogak, arany, porcelán, platina) kísérleteztek, de a sikerességi mutatók nagyon alacsonyak voltak, köszönhetően a kezdetleges technikáknak és a befogadó szervezet heves

immunreakcióinak (Róth L., 2005). Az 1980-as évek közepétől a titán alkalmazása került előtérbe, és maradt mindmáig az egyik legtöbbször alkalmazott implantátum alapanyag. Esztétikailag viszont nem a legmegfelelőbb, hiszen egy vékony biotípusú ínnyel rendelkező páciensnél áttűnhet a fém színe a gingiva alatt. Ennek megoldására fordult a figyelem a fogszínű, biokompatibilis kerámiák, mint például a cirkónia felé.

A dentális implantátumok a bioanyagok csoportjába tartoznak. Bioanyagnak nevezünk minden olyan szintetikus anyagot, amely az élő szervek, szövetek pótlására alkalmas, s közben az egész szervezettel tartós biológiai kapcsolat kialakítására képes (Bronzino, 2000). Per-Ingvar Brånemark svéd professzor nevéhez fűződik az osseointegráció fogalma és a titán bevezetése a mai modern implantológiába. Az osseointegráció azt a közvetlen biológiai kapcsolatot jelenti az élő csont és az implantátum felszíne között, amely lehetővé teszi a rágóerő átvitelét az implantátum testen keresztül a megfelelően szilárd támasztószövetre (Brånemark, 1983). A sikeres, hosszú távú biointegráció feltétele a teljes osseointegráció, a jó periimplantáris zárás, illetve a megfelelő rágóerő átvitel a felépítmény által közvetítve (O'Brien, 2002). Az osseointegráció több hónapot (3-6) vesz igénybe, így a modern kutatások középpontjában az a törekvés áll, hogy a csontosodási periódust valamilyen felületmódosítással rövidítsék.

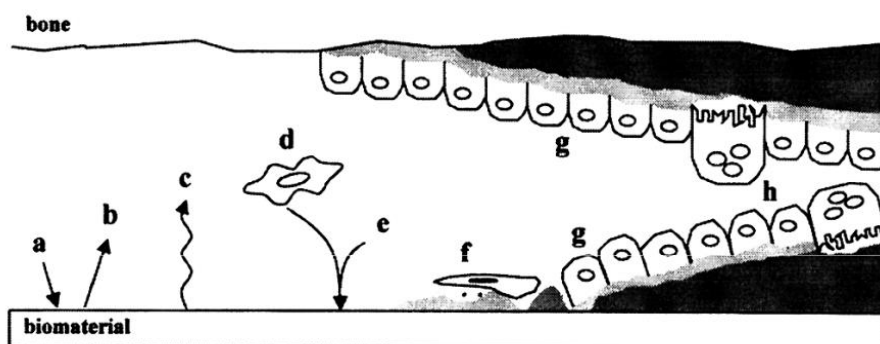
A fogászati implantátumokat több szempont alapján csoportosíthatjuk. Anyaguk, behelyezési helyük és formájuk szerint is. Behelyezés szerint lehetnek szubperiosteális, transzoszeális, endosszeális (enosszeális) implantátumok (2. ábra). Ma már szinte kizárólag az utóbbi típust alkalmazzuk (O'Brien, 2002).



2. ábra. Dentális implantátumok típusai (O'Brien, 2002).

1.1. Az osseointegráció folyamata

A kutatók már több éve vizsgálják különböző alloplastikai anyagok biointegrációjának folyamatát. Számos sejt, mediátor és molekula szerepét azonosították már, de még további kutatások szükségesek a teljes folyamat tisztázása érdekében. Amikor egy bioanyag kapcsolatba kerül a szervezettel, egymásra kölcsönösen ható folyamatok sora veszi kezdetét.



3. ábra. Az osseointegráció folyamata (Puleo és Nanci, 1999).

Elsőként, rögtön a behelyezés után a szöveti nedvekből, vérből származó fehérjék adszorpciója figyelhető meg (3. ábra). Ezen fehérjék egy része aztán leválik a felületről, és a maradék fehérjékkel kialakul az ún. kondicionáló réteg. Az implantátum felszínén ezt követően számos elektrokémiai változás játszódik le. Az oxid réteg akár két-háromszorosára is vastagodhat, kalcium, foszfát és kén atomok épülhetnek be, sőt fém részecskék is felszabadulhatnak, amelyek kezdetben lokálisan, ám később szisztémásan is szóródhatnak. A szervezet válaszaként különböző gyulladásos és kötőszöveti sejtek érkeznak az implantátum felszínéhez, majd az adszorpciós fehérjék, mint az oszteopontin valamint a bone sialoprotein tapadnak ki. Az oszteogén sejtek megjelenésével párhuzamosan kialakul a lamina limitans, egy kollagénrost-mentes mátrix, valamint nem-kollagén fehérjék választódnak ki (OPN, BSP). A fehérjék részvételével zajlik le a nukleáció fázisa, kalcium-foszfátok rakódnak le a kötőhelyeken. A következő fázisban a kristály növekedni kezd, majd újabb kollagén rostok szintézise és mineralizációja teszi teljessé az új csont kialakulását. Kutatások kimutatták, hogy az új csont képződése az implantátum felszínéről akár 30%-al is gyorsabb lehet, mint az állkapocs-csonttól a bioanyag felé (Puleo és Nanci, 1999).

1.2. A titán fizikai-kémiai tulajdonságai

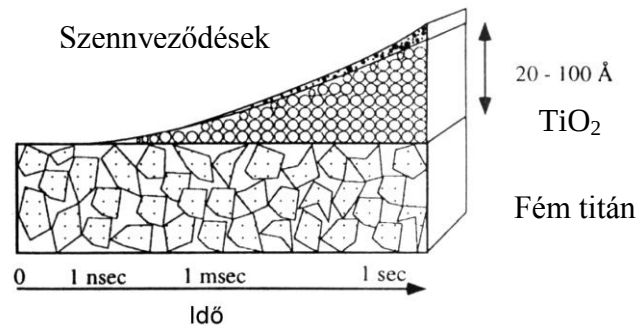
Az implantológiában az egyik legelterjedtebb fém az átmeneti fémek csoportjába tartozó titán. A földkéreg 0,6 %-át alkotja, elemi formában gyakorlatilag nem fordul elő, vegyületei többek között az anatóz, a brookit, a rutil (TiO_2) és az ilmenit (FeTiO_3). Ezen ércekből történő kivonására a Kroll- (TiCl_4 redukciója Mg által) és a jodid-eljárások használatosak (Lautenschlager és Monaghan, 1993). A titán az utóbbi időkben az egyik legfontosabb ipari alapanyaggá vált köszönhetően a vonzó mechanikai tulajdonságainak és kitűnő korrózióálló képességének.

Elsőként az űrkutatásban és a hadiiparban vált nélkülözhetetlenné, majd a figyelem a titánból készült ízületek, végtagok, szívbillentyűk és fogászati implantátumok felé fordult. Alacsony sűrűsége ($4,43 \text{ g/cm}^3$) ellenére, bizonyos ötvözetek olyan erősek, mint az acél. A kereskedelmi tisztaságú (commercially pure – CP) titán fizikai és mechanikai tulajdonságai kis mennyiségű oxigén, vas és nitrogén hozzáadásával változtathatóak, amely alapján négy típust különböztetünk meg (Grade 1-4). Az ortopédiában elterjedt ötvözet a Ti6Al4V, amelyben a tömeg 90% -át titán, 6 %-át alumínium, 4 %-át vanádium alkotja. A titán és ötvözeteinek folyáshatára 240 és 890 MPa között változik, míg a csonté 83 (szivacsos) és 117 (lemez) MPa között, így alkalmas a megfelelő funkció ellátására (Wang és Fenton, 1996).

A titán széleskörű alkalmazásához hozzájárul még a csonthoz közeli rugalmassági állandója (110 GPa) amely az alumínium-oxid (400 GPa) és cirkónium-oxid (200 GPa) kerámiákhoz képest jóval kedvezőbb. A különböző rugalmasságú anyagok azonos terhelés hatására eltérő mértékben deformálódnak, amely különbség növekvő feszültség hatására tovább nő. Az implantátum és a csont különböző mértékű alakváltozása feszültséget generál a két anyag közötti határfelületen. Rugalmasságát tekintve, tehát a titán az egyik legalkalmasabb implantátum alapanyag (Vajdovich, 2008).

A titán magas korróziórezisztenciája egy vékony, kémiai stabil felületi oxid rétegnek köszönhető. Amennyiben a felszín megsérül, ez a felületi oxidréteg azonnal újraképződik levegő vagy víz jelenlétében (Wang és Fenton, 1996). A titán és ötvözeteinek kitűnő biokompatibilitása ennek a magas korróziórezisztenciának köszönhető. Védő oxidréteg más fogászati fémek (rozsdamentes acél, Co-Cr-ötvözet)

felszínén is képződik, de a titánon képződő rétegek különösen inertelek elektrokémiai hatásokkal szemben. Ez a védőréteg már nanoszekundumok alatt kialakul, és egy másodperc alatt akár 2-10 nm vastagságot is elérhet (4. ábra).



4. ábra. TiO_2 -réteg kialakulása titán felszínén (Turzó, 2012).

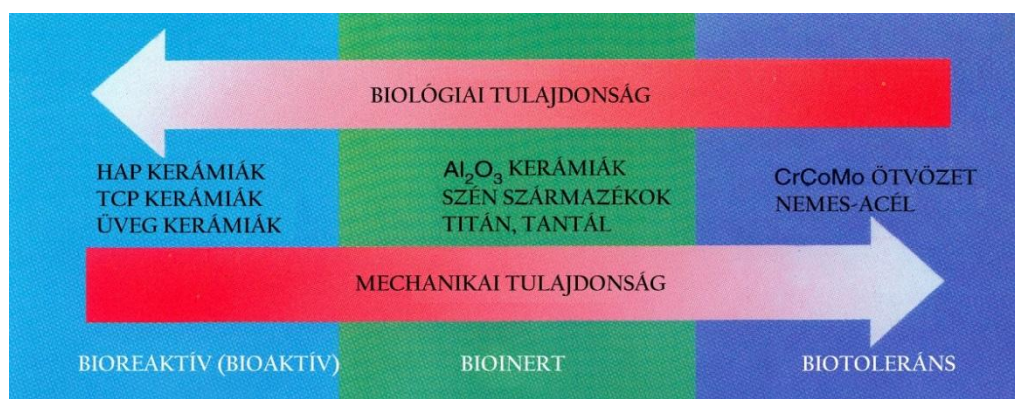
Az oxidréteg, amelyet főleg TiO_2 alkot, azért alakul ki ilyen gyorsan, mert a titán oxidációjának nagyon magas a reakcióhője: $\Delta H = -912 \text{ kJ/mol}$. Erősen tapad a felülethez, további oxigén molekulák és szennyeződések számára átjárhatatlan és igen magas a dielektromos állandója (50-170). A TiO_2 segítségével az implantátum van der Waals kötések kialakítására lesz képes a környezetében lévő molekulákkal. Nagyon jó röntgenárnyéka fogászati szempontból szintén előnyös tulajdonság. (Lautenschlager és Monaghan, 1993).

1.3. Ti implantátumok felületmódosítási lehetőségei

Egy bioanyag (implantátum) sikeres biointegrációja számos tényező függvénye:

- az anyag térfogati és felületi tulajdonságai
- kivitelezése
- biokompatibilitása
- a beültetés technikája
- a beteg egészségi állapota, életmódja (Bronzino, 2000).

Az implantátum biológiai környezete számára az anyag felületi tulajdonságai nagyon fontosak. A titán bioinertnek tekinthető, megfelelő mechanikai és biológiai tulajdonságokkal (5. ábra).



5. ábra. Bioanyagok tulajdonságai (Spiekerman és mtsai, 1995).

Egy fogászati implantátumnál a sikerességet az egész életen át tartó biztos csontos rögzülés jelenti, amelyet minél rövidebb gyógyulási idővel, és a betegek számára minél kevesebb megterheléssel próbálunk elérni. Helytelen anyagválasztás és nem megfelelő felület kialakítás krónikus gyulladásokhoz vezethet, amely tovább rontja a sebészi behelyezés miatt egyébként is elkerülhetetlen gyulladásos folyamatot. Ennek eredményeképpen kötőszövetes tok veszi körül az implantátumot a csont helyett, amely csökkenti a mechanikai stabilitást és az implantátum elvesztéséhez is vezethet (Kasemo, 2002). A felület kialakítása nagy fontossággal bír a biointegráció szempontjából. Több kutatás is bizonyítja, hogy a környező biológiai szövetek az implantátum legkülső atomi rétegeivel (általában 0,1-1 nm) lépnek közvetlen interakcióba (Puleo és Nanci, 1999).

A felületmódosítások célja a felület jellemzőinek megváltoztatása, anélkül, hogy a térfogati tulajdonságok sérülnének. Az évek során kifejlesztett módszereket két csoportba lehet sorolni.

Az egyik módszer a fizikai-kémiai felületmódosítás. Ennek során a felület töltését, morfológiáját vagy kémiai összetételét változtatják meg. Ide sorolható a savmaratás, oxidáció, felszín bevonás szervesetlen anyagokkal, homokfűvás, titán plazmaszórás, ion-implantáció és a lézer-ablációk. A homokfűvást és savmaratást rendszeresen alkalmazzák titán fogászati implantátumok gyökéri részének kialakítására (Denti[®] System, Camlog[®]).

A lézeres ablációra jó példa az a módszer, amelyet a Fogorvostudományi Kar (FOK) munkatársai alakítottak ki a TTIK Optikai és Kvantumelektronikai tanszékével közösen. Bereznai és munkatársai két különböző hullámhosszúságú excimer lézer által kialakított felületet vizsgáltak. Kimutatták, hogy míg az ArF lézerkezelés ($\lambda=193$ nm, impulzus félértékszélesség = 8 ns, impulzus energia = 100 mJ) koronaszerű kitüremkedéseket okozott, addig a KrF lézer ($\lambda=248$ nm, impulzus félértékszélesség = 0,5 ps, impulzus energia = 10 mJ) kezelés után ezek a tisztítást megnehezítő kitüremkedések nem jelentek meg. A lézer kezelés hatásos volt még a felszíni szén szennyeződések csökkentésében, valamint az oxid réteg vastagításában is, miközben az eredeti kristályszerkezet nem változott (Bereznai és mtsai, 2003).

Az implantátum felszín bevonása kalcium-foszfát kristályokkal, szintén egy fizikai-kémiai módszer. Heterogén nukleációval létrehozható olyan kalcium-foszfát bevonat a titán felszínen, amely fokozhatja az extracelluláris proteinek kötődését. Ezt a bevonatot csak az előzőekben bemutatott lézer kezelt, s így vastagabb oxid réteggel rendelkező titán felszínen alakították ki sikeresen (Szekeres és mtsai, 2005).

A fizikai-kémiai módszerek során a felület érdességét is megváltoztatjuk, amellyel megnöveljük az oszteoblasztok kitapadására szolgáló felület nagyságát. Több kutatás is kimutatta, hogy ilyenkor fontos a kialakított lyukak mérete is (Wennerberg és Albrektsson, 2009).

A második csoportba a biokémiai módszerek tartoznak. A módszer lényege, hogy a különböző sejt- és szöveti válaszokat a bioanyagok felületére rögzített fehérjék, peptidek vagy enzimek révén érik el. Tehát az implantátum és a csont közötti határfelület folyamatait a mesterségesen oda irányított molekulákkal próbálják befolyásolni (Puleo és Nanci, 1999).

Egyik lehetőség a receptor-ligand elven működő peptidek és integrin receptorok kapcsolata. Kimutatták az Arg-Gly-Asp (RGD-szekvencia) aminosavak szerepét a sejtek különböző extracelluláris fehérjékhez való kitapadásában, majd ilyen RGD-szekvenciát tartalmazó fehérjéket rögzítettek implantátumok felszínére a jobb sejt kitapadás érdekében. Az ötlet hiányossága, hogy több sejt is rendelkezhet hasonló integrinokkal, így a kapcsolódás nonspecifikus. Ezen a területen további kutatások szükségesek oszteoblasztokra specifikus peptidek kialakítása céljából (Puleo és Nanci, 1999).

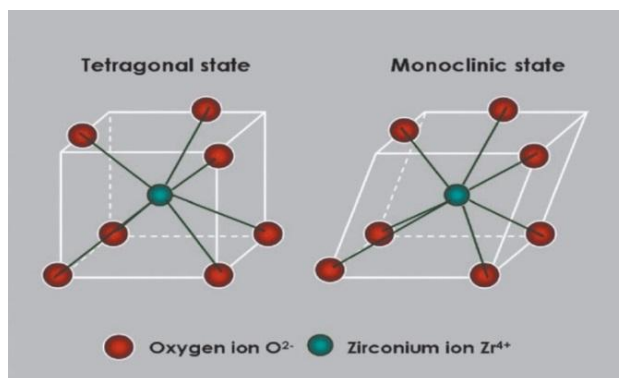
Biokémiai módszerek kialakításával a FOK munkatársai szintén foglalkoztak, mint az önrendeződő polielektrolit filmek kialakítása implantátum felszínén. Pelsőczy és munkatársai váltakozó poli-L-lizin és poli-L-glutamát rétegeket adszorbeáltak üveg és titán felszínre. Mindkét minta vizsgálata atomerő mikroszkóppal szemcsés felszín, fokozott érdességet mutatott függetlenül a felépítés módjától. A filmréteg két hónapos tárolás majd rehidratálás után stabilabbnak bizonyult a titán felületen mint az üvegen. Fontos tulajdonsága ezen filmeknek, hogy rehidratációs kapacitással rendelkeznek, vagyis szárítás után nedves közegbe helyezve képesek visszanyerni eredeti morfológiájukat és aktív állapotukat. Ez egy könnyen kivitelezhető módszer lehet az iparban is, hiszen automatizálható és ellenőrizhető a felszíni töltés, a vastagság és az érdesség is (Pelsőczy és mtsai, 2005).

1.4. Cirkónium (Zr) és cirkónia (ZrO_2) fizikai-kémiai tulajdonságai

A titán implantátumokat harminc éve használják sikeresen a mesterséges foggyökér beültetésekhez. A fémes szürke szín viszont hátrányos tulajdonsága, amely főleg vékony gingiva biotípusnál, esetleg recesszió esetén áttűnhet, így esztétikailag nem lesz megfelelő a pótlás. Egyes szerzők az esetleges korróziós és egyéb felszabaduló titán részecskéket egészségügyi kockázatként tartják számon (Stejskal, 1999; Valentine-Thon, 2003). Az implantátumot körülvevő lágy szövetekben és a környéki nyirokcsomókban is viszonylag magas koncentrációban mutatták ki a titánt. Klinikailag még nem bizonyított a titán toxikus hatása, de mégis egyre több páciens igényli a fémmentes kezelést, amelynek jó alternatívája a fogszínű kerámia implantátum (Wenz és mtsai, 2008).

Az átmeneti fémekhez tartozó cirkónium egy csillogó, szürkésfehér, kiváló korrózióálló képességgel rendelkező fém. A tiszta cirkónium önmagában nem, de mint egyszerű (ZrO_2) és mint szilikáttal alkotott ($\text{ZrO}_2\text{-SiO}_2$) oxidjai formájában fordul elő a földrétegben. A cirkónium-dioxid a cirkónium fehér kristályos oxidja. Természetben megtalálható ásványi formája a baddeleyit (Vagkopoulou és mtsai, 2009).

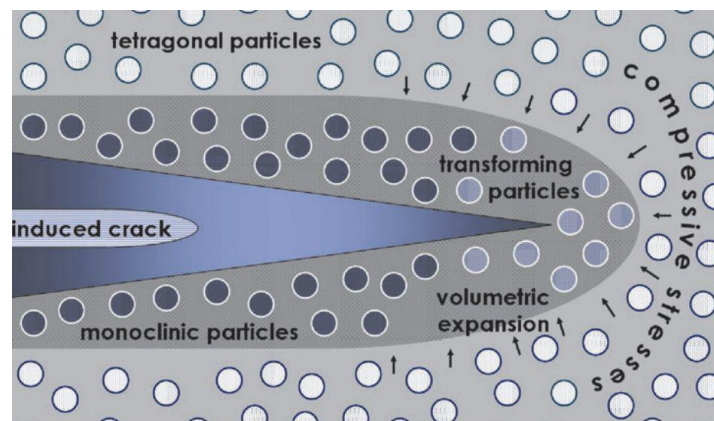
Hőmérséklettől függően három féle kristályszerkezetben fordulhat elő, amely tulajdonságát polimorfizmusnak nevezik. A monoklin formája, amely szobahőmérsékleten stabil 1170°C -ig, mechanikailag a leggyengébb forma. A tetragonális szerkezet 1170 és 2370°C között stabil és mechanikailag a legalkalmasabb orvosi felhasználásra (6. ábra). Ezt a formát tetragonális cirkónia polikristálynak (TZP) nevezzük.



6. ábra. Cirkónium-dioxid kristályszerkezetei (Vagkopoulou mtsai, 2009).

A harmadik forma a köbös, amely 2370°C fölött stabil, közepes mechanikai tulajdonságokkal rendelkezik (Vagkopoulou és mtsai, 2009).

A gyártás során eltérő hőmérsékletek hatnak a cirkóniára. Az anyag hűlése során egy fázisátalakulás játszódik le. A hőmérséklet csökkenéssel párhuzamosan, de akár mechanikai terhelésre is, a köbös forma tetragonálissá, a tetragonális fázis monoklin fázissá alakul át, amelyet átlagosan 3-4%-os térfogat növekedés kísér. Ez a növekedés olyan feszültséget eredményez, ami az anyag belsejében mikrorepedések kialakulását eredményezheti. A repedés terjedésével fázisátalakulás játszódik le (7. ábra), amelyet kezdetben előnyösnek találtak, hiszen az átalakulással a repedés megállt, de később kimutatták, hogy így viszont az anyag szerkezete gyengül meg (Vagkopoulou és mtsai, 2009).



7. ábra. Repedés terjedése cirkóniában (Vagkopoulou és mtsai, 2009).

Különböző stabilizáló oxidok (CaO, MgO, CeO, Y₂O₃) hozzáadásával a tetragonális vagy köbös fázis is szobahőmérsékletre hűthető anélkül, hogy visszaalakulna monoklin fázissá. Ekkor beszélhetünk részlegesen stabilizált cirkóniáról, amelyben a fő fázist a köbös és a monoklin, a kisebb részt pedig a tetragonális fázis alkotja. A részlegesen stabilizált TZP kerámiákban a leggyakoribb stabilizáló oxid, az ittrium-oxid 2-3 mol%-ban található meg (Vagkopoulou és mtsai, 2009).

A jó kémiai és dimenzió stabilitás, nagy mechanikai szilárdság valamint a rozsdamentes acélhoz hasonló Young modulus keltették fel az érdeklődést a cirkónia, mint kerámia bioanyag iránt. Az egyik legjelentősebb orvosi alkalmazási területe a teljes csípő protézisek ízületi fejecsének gyártása (Piconi és Maccauro, 1999).

A cirkónium-dioxid biokompatibilitása kiváló, amelyet negatív karcinogenitási és mutagenitási tesztek is bizonyítottak (Wenz és mtsai, 2008). Előnyös tulajdonságai a magas hajlítószilárdság (>1000 MPa), keménység (1200-1400 Vickers), valamint Weibull modulus (10-12) (Nettleship és Stevens, 1987). További előnye, hogy a színe (elefántcsont szín) hasonlít a természetes fogakhoz, képes átengedni a fényt, így főleg az esztétikailag fontos front régióban használható. Kiváló korrózió rezisztencia, magas kopásállóság és törési szilárdság jellemzi a cirkóniából készülő implantátumokat (Ichigawa és mtsai, 1992).

1.5. Cirkónia implantátumok felületmódosításai

Amikor egy bioanyag kapcsolatba kerül az élő szervezettel, a biokompatibilitása nem csupán a felület fizikai és kémiai tulajdonságaitól függ, hanem az anyaggal kapcsolatba kerülő sejtek elsődleges válaszára is. Ez az interakció létfontosságú a sikeres oszeintegrációhoz. A sejtek kezdeti kitapadását, adhéziónak követi a szétterülés és a migráció. Ezen kezdeti jelenségek minősége határozza meg a későbbi sejt differenciálódás és sejtosztódás mértékét. Yamashita és munkatársai vizsgálták a felszíni érdesség hatását az oszteoblasztok kitapadására vonatkoztatva két különböző összetételű cirkónia, titán és alumínium-oxid implantátumokon. Azt találták, hogy az érdes felszínen (homokfűvott) szignifikánsan több sejt tapadt ki, mint a sima felszínen, mind a négy esetben. A négy minta között viszont nem volt szignifikáns eltérés (Yamashita és mtsai, 2009).

A cirkónia implantátumok esetén is hasonló felületmódosítási lehetőségek adóttak, mint azt a titán kapcsán már említettem. Állatkísérletekben savmaratott cirkónia implantátumokat vizsgáltak titánhoz viszonyítva, és azt találták, hogy nem volt szignifikáns eltérés a csont-implantátum kapcsolatban 1, 4, és 12 hét után sem a két anyag között (Depprich és mtsai, 2008). Sennerby és mtsai. (2005) rétegzési technikával hoztak létre porózus felszínt cirkónia implantátumokon ($S_a = 0,93-1,24 \mu\text{m}$), és ezt hasonlították össze kezeletlen, esztergált felszínekkel ($S_a = 0,75 \mu\text{m}$), de nem volt szignifikáns különbség az oszeintegráció mértékében.

Az már bizonyított, hogy a titán felületek módosítása (savmaratás, apatit-borítás, anódizáció) javítja a kezdeti sejt válaszokat. A szakirodalom azt támasztja alá, hogy a jövőben a cirkónia felületek módosítása is szükséges lenne a jobb biointegráció elérése érdekében (Yamashita és mtsai, 2009).

1.6. A felületi érdesség szerepe az oszeintegrációban

A felületi morfológia, érdesség megváltoztatása az egyik legfontosabb eszköz a gyógyulási periódus lerövidítése érdekében. A felület megnövelése lehetővé teszi a kötőszöveti és csontképző sejtek számára az erősebb, nagyobb felszínhez történő kitapadást, így a környező szövetekkel egy stabilabb kapcsolat kialakítását (Wennerberg és Albrektsson, 2009).

A hámsejtek a savmaratott felszínhez kevésbé tapadtak, ellenben polírozott, sima felszínen jobban kitapadtak. Fibroblasztok esetén nem mutattak ki különbséget az érdes és a sima felszín között (Klinge és Meyle, 2006). Az oszteoblasztok viszont az érdes felszínt preferálják jobban, így az implantátum egyes részeit ezen sejtek számára kedvező felülettel állítják elő. A nyaki részt simára polírozzák, a plakkmentesíthetőség valamint a hámtapadás számára, amellyel így csökkenthető a peri-implantáris gyulladás kialakulásának esélye (Brånemark és Mäntes, 2011).

Az implantátumtest csontba kerülő felszínét érdesítik (általában savmaratással és homokfúvással) a gyári elkészítést követően. Wennerberg és Albrektsson (2009) profilométeres vizsgálatok alapján csoportosították a felületeket érdesség szerint. Sima ($S_a < 0,5 \mu\text{m}$), minimálisan érdes ($S_a = 0,5\text{-}1 \mu\text{m}$), közepesen érdes ($S_a = 1\text{-}2 \mu\text{m}$) valamint érdes ($S_a > 2 \mu\text{m}$) felszíneket különböztettek meg. Számos tanulmányt elemeztek a témában, amelyekben azt találták, hogy az esztergált felszín felérdesítése fokozta a csontosodást, de egy határ felett már nem volt intenzívebb a csontképződés. A közepesen érdes felszín mutatta a legerősebb csontosodást.

Additív és szubsztraktív módszerek állnak rendelkezésre a felületi érdesség növelése érdekében. A két legelterjedtebb szubsztraktív módszer a homokfúvás és a savmaratás. A két módszer külön-külön is fokozta az oszeintegrációt, de együtt alkalmazva még jobb eredményeket értek el. Buser és Mäntes (1991) összehasonlították a savmaratott-homokfúvott, elektropolírozott és hidroxipatit borítású titán implantátumok csontosodását és a legjobb eredményt a savmaratott-homokfúvott implantátumok mutatták annak ellenére, hogy nem az a felszín volt a legérdesebb.

2. Vizsgálataink célja

Szakedolgozatomban titán és cirkónia korongok összeintegrációját vizsgáltuk *in vitro* körülmények között. A kísérletek során csontsejtek helyett oszteoszarkóma sejtekkel (MG-63 immortalizált humán oszteoblaszt sejtvonal) dolgoztunk. Ezek a sejtek viszonylag könnyen kezelhetők, stabil tulajdonságokkal rendelkeznek *in vitro* körülmények között, valamint kevésbé érzékenyek a környezet változásaira, mint egy humán preparátumból kinyert primer sejt kultúra. Standard körülmények között ugyanolyan ütemben növekednek, szaporodnak.

Célunk az volt, hogy a két eltérő felületen összehasonlítsuk a sejtek letapadását és proliferációját 24 és 72 óra termosztátban történő inkubálás elteltével. Először vizualizáltuk a felületeket AFM-el, majd meghatároztuk ezek érdességét (R_a). Kvantitatív (AlamarBlue, MTT) és kvalitatív (fluoreszcens festés) vizsgálati módszereket alkalmaztunk a kísérletsorozat folyamán. Az eredmények kiértékelését SPSS Statistics 17.0 programmal, ANOVA módszerrel végeztük. A szignifikanciaszintet $p=0,05$ értéken rögzítettük. A sejt kultúra vizsgálatok a FOK sejttenyésztő laboratóriumában, steril fülkében történtek. Az optikai denzitás meghatározásához a spektrofotométert az SZTE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika Lymphocita laboratóriuma biztosította számunkra. A fluoreszcens vizsgálatokhoz a mikroszkópot az MTA SZBK Biokémiai Intézetének Tumorimmunológiai és Farmakológiai Kutatócsoportja biztosította. Az atomerő mikroszkópot az SZTE TTIK, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékén vehettük igénybe.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Próbatetek (korongok) jellemzése

A kísérletben használt korongokat a Denti[®] System biztosította. A titán korongokat kereskedelmi tisztaságú (CP4), 9 mm átmérőjű titán hengerből vágták le 1,5 mm vastagságban. A korongok egyik felét ezután savmaratással és homokfúvással kezelték, akár csak a forgalomba kerülő, csontban rögzülő implantátumtest esetében. A cirkónia korongokat a Kerox cég ZircoStar[®] termékéből esztergálták. Összetételét tekintve 93-94% ZrO₂, 4-5% Y₂O₃, 1-2% HfO₂ alkotja. A végső szinterezést követő átlagos szemcsenagyságot 0,2 és 0,5 µm között határozták meg. A cirkónia korongok mérete megegyezik a titán korongok méretével és ugyanazzal a felületkezeléssel látták el. A titán korongokat szonikátorban 15 percig tömény acetonnal, majd 70 %-os etanollal tisztítottuk, a szonikálás után ultratiszta vízzel lemostuk mindkét reagens esetén, végül szárítás után hőlégsterilizátorban 180 °C-on, 45 percig sterilizáltuk. A cirkónia korongokat 15 perces etanolos tisztítás, ultratiszta vízzel való öblítés, majd szárítás után autoklávban sterilizáltuk.

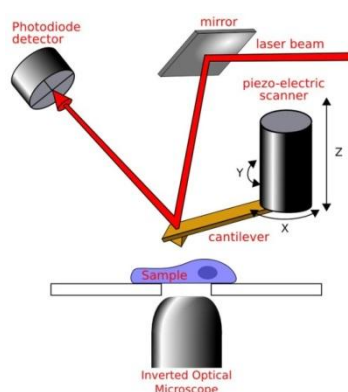
3.2. Atomierő mikroszkóp (AFM)

A felületi érdekességet többféleképpen meg lehet határozni, az irodalomban nincs egységes szabvány ezzel kapcsolatban. A profilométerrel szemben az AFM jobban tájékoztat egy felületről, hiszen nem csupán vonal mentén, hanem egy adott területet vizsgál. A pásztázószondás mikroszkópok közé tartozó atomierő mikroszkópot 1986-ban fejlesztették ki. Rendkívül jó, akár nanométer alatti feloldóképességét nem a hagyományos optikai mikroszkópok leképezése alapján éri el. A képalkotás lényege, hogy egy piezoelektromos rendszer egy nagyon hegyes, laprugóra (cantilever) rögzített tűt mozgat a vizsgált felület közelében, amelyek közötti kölcsönhatást egy jelfeldolgozó rendszer továbbítja a számítógép felé. A pásztázott kétdimenziós felület térbeli, háromdimenziós képként jeleníthető meg a számítógépen. A tűre ható vonzó- és taszítóerők a laprugó elhajlását okozzák, amelyet a rugó tűvel ellentétes felületéről

viisszaverődő lézernyaláb elmozdulása követ. Ezt a lézernyalábot egy négy szegmensre osztott fotodióda érzékeli.

Az AFM előnye, hogy számos anyag vizsgálatára alkalmas, nem igényel sem vákuumkörnyezetet, sem vezető felületű mintát. A leképezni kívánt sejtek és molekulák így akár levegőn, vagy természetes folyadék közegekben is vizsgálhatók. Hátránya viszont a korlátozott képfelvételi sebesség, emiatt csak statikus konformációk vizsgálatára ad lehetőséget (Keresztes és mtsai, 2004).

Kísérleteink során a PSIA XE100 AFM-et használtuk, tapping üzemmódban. 20x20, 10x10 és 5x5 μm -es területeket vizsgáltunk 2 db titán és 2 db cirkónia korongon.



8. ábra. Az AFM sematikus ábrája. [1. internetes hivatkozás]

3.3. MTT és alamarBlue módszerek

MG-63-sejtek adhézióját és proliferációját vizsgáltuk *in vitro* módon titán és cirkónia korongokon. Az előkészített sejtszuszpenzióból korongonként 0,5 ml médiumban 10.000 sejtet pipettáztunk, majd termosztátban inkubálás után 24, ill. 72 óra elteltével vizsgáltuk a letapadást és a proliferációt MTT és alamarBlue segítségével. A kísérletet háromszor ismételtük meg, 3-3 db titán és cirkónia koronggal.

Az MTT alkalmas az élő sejtek mennyiségének meghatározására. Az élő sejtek a tetrazólium sót formazánná redukálják, amelyet feloldva a színreakcióból következtethetünk a felületen található sejtek mennyiségére. A módszer előnye, hogy csak az élő sejteket méri, azonban hátránya, hogy a folyamat során a sejtek elhalnak, mivel az MTT a légzési lánc nem minden elemével lép reakcióba, így az elektron-

transzport lánc megszakad (8. ábra). A redukált forma vízben oldhatatlan, azonban sósavas izopropanolban és nátrium-dodecil-szulfátban oldva jellegzetes lila színként jelenik meg, amelynek optikai denzitását 540 nm hullámhosszon spektrofotométerrel határozzuk meg. Az optikai denzitás mértéke egyenesen arányos a redukció mértékével (Mosmann, 1983).

Half-reaction			EO' (mV) pH7.0 25°C
NAD+2H ⁺ +2e ⁻	↔	NADH+H ⁺	-320
NADP+2H ⁺ +2e ⁻	↔	NADPH+H ⁺	-320
FAD+2H ⁺ +2e ⁻	↔	FADH ₂	-220
FMN+2H ⁺ +2e ⁻	↔	FMNH ₂	-210
MTT _{ox} + 2H ⁺ + 2e ⁻	↔	MTT _{red}	-110
cytochromes _{ox} +1e ⁻	↔	cytochromes _{red}	+80 to +290
AlamarBlue [®] _{ox} +2H+2e ⁻	↔	AlamarBlue [®] _{red}	380
O ₂ +4H ⁺ +4e ⁻	↔	2H ₂ O	820

9. ábra. Oxido-redukciós potenciálok az elektrontranszport láncban, AlamarBlue, MTT. [2. internetes hivatkozás]

Az AlamarBlue egy nem-toxikus, vízzoldékony, rezazurin tartalmú festék, amely folyamatos redox reakciókban vesz részt. Alkalmas különböző humán és állati sejtek, baktériumok és gombák proliferációjának vizsgálatára. A légzési lánc minden elemével reakcióba lép, pozitív oxido-redukciós potenciálja révén le tudja adni az elektront, így nem öli meg a sejteket, azokkal folyamatosan együtt inkubálható. Előnye hogy kolorimetriás és fluoreszcens módszerrel is meghatározható. A kísérletben spektrofotométerrel 570 és 600 nm hullámhosszon határoztuk meg az optikai denzitást mind a redukált, mind az inkubált AlamarBlue esetében. Az inkubált AlamarBlue jelenti azt a redukáltsági szintet, amely sejtek nélkül, 4 óra termosztátban történő inkubálás után kialakult. Az autoklavozás után kapott redukált AlamarBlue volt a kontroll, a 100% redukált állapot, amelyhez viszonyítottunk. A számításhoz használt képlet a 9. ábrán látható. A redukció mértékéből következtettünk a sejtek mennyiségére. [3. internetes hivatkozás]

Percentage reduction of alamarBlue® (equation 1)	=	$\frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(R1 \times N2) - (R2 \times N1)}$	x 100
---	----------	---	--------------

Where: O1 = molar extinction coefficient (E) of oxidized alamarBlue (Blue) at 570nm*

O2= E of oxidized alamarBlue at 600nm*

R1 = E of reduced alamarBlue (Red) at 570nm

R2= E of reduced alamarBlue at 600nm

A1 = absorbance of test wells at 570nm

A2 = absorbance of test wells at 600nm

N1 = absorbance of negative control well (media plus alamarBlue but no cells) at 570nm

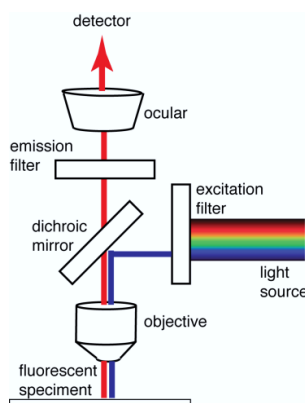
N2 = absorbance of negative control well (media plus alamarBlue but no cells) at 600nm

* Only one appropriate substitute wavelength may be used.

10. ábra. Az alamarBlue redukció százalékanak kiszámítása.[3. internetes hivatkozás]

3.4. Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópia bizonyos anyagoknak (festékek) azt a tulajdonságát használja ki, hogy meghatározott hullámhosszú, gerjesztő fénnel megvilágítva hosszabb hullámhosszú, ún. emissziós fényt bocsátanak ki. Ezt nevezik fluoreszcenciának. A módszer nagyon érzékeny, segítségével már kis mennyiségű fluoreszkáló festék is kimutatható. A korábbi alsó megvilágítás helyett, a mai modern fluoreszcens mikroszkópok felső megvilágítással működnek. A fényforrás általában higanygőzlámpa, az objektív feletti síkban van elhelyezve. A kibocsátott fény egy gerjesztő szűrőn keresztül a mikroszkóp optikai tengelyéhez képest 45°-ban elhelyezett félig áteresztő tükörről (dikroikus szűrő) vetül az objektívbe. Az objektív feladata a sugarakat a vizsgált tárgyra fókuszálni. A gerjesztő fény hatására a vizsgált mintából hosszabb hullámhosszú sugarak lépnek ki, amelyeket már átenged a dikroikus szűrő, és egy emissziós szűrőn átjutva, az okuláron keresztül vizsgálható a kívánt minta (Röhlich, 2006).



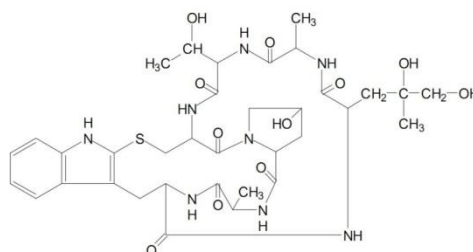
11. ábra. Fluoreszcens mikroszkóp sematikus ábrája. [4. internetes hivatkozás]

Bizonyos szövetekben eleve is előfordulhatnak fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező anyagok (karotinoidok, lipofuszcín), ebben az esetben autofluoreszcenciáról beszélünk, de legtöbb esetben a festékeket utólagosan adjuk hozzá a rendszerhez, ekkor beszélünk másodlagos fluoreszcenciáról. Ma már számos fluoreszcens festék létezik, amelyekkel más-más sejtes vagy szöveti komponenst festhetünk meg, vagy más molekulához, általában fehérjéhez kötve jelzőanyagként használhatunk (Röhlich, 2006). A festékek egyik csoportjába kis molekulájú anyagok tartoznak, amelyek intrinszik fluoreszcensek és bizonyos biológiai molekulákhoz kötődnek. Ide tartozik a nukleinsavhoz kötődő, így a sejtmagot megfestő DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

és a Hoechst festék. A másik csoportba bizonyos toxinok tartoznak, amelyek specifikus sejtsztruktúrákhoz kötődnek, mint az aktin filamentumhoz kötődő falloidin, amelyhez fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező konjugátum kapcsolható. [5. internetes hivatkozás]

A Hoechst festék a DNS-t festő kék fluoreszcens festékek családjába tartozik, kémiaiailag biszbenzidin. Vízben és szerves oldószerben (dimetil-szulfoxid) is oldódik. A festék a DNS kettős spirál adenin és timin gazdag kis árok régiójához kapcsolódik. Képes átjutni a sejtmembránokon, így élő és fixált sejtek DNS-ét is megfesti (Portugal,1988). A Hoechst festék kevésbé toxikus mint a DAPI, ezért a megfestett sejteknek nagy a túlélési aránya. [6. internetes hivatkozás]

A falloidin egy ciklikus heptapeptid, a fallotoxinok közé tartozik, mely az amatoxinok mellett a gyilkos galóca egyik fő méreganyag csoportja. A falloidin az F-aktinhoz kötődik meggátolva annak a depolimerizálódását, ezáltal stabilizálja az F-aktin szerkezetet (Cooper, 1987). Gátolja az F-aktin ATP-hidráz aktivitását is, mozgásképtelenné teszi, így mérgezi meg a sejtet (Barden, 1987). A falloidin fluoreszcens konjugátummal kiegészített változata alkalmas a sejtek aktin filamentum rendszerének, sejtváznak ábrázolására. Egy aminosav oldallánc teszi lehetővé a falloidin szerkezetének módosítását anélkül, hogy az aktin-filamentum iránti affinitása megváltozna. Csak a módosított falloidin képes hatékonyan áthatolni a sejtmembránokon. Kumarin, FITC (fluorescein isothiocyanate) valamint a TRITC (tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate) alkalmas erre a konjugációra. [7. internetes hivatkozás] Ezek közül a TRITC-falloidin festékekkel dolgoztunk (12. ábra), amely vörös színnel jelenítette meg a vizsgált sejtek sejtvázat a fluoreszcens mikroszkóp alatt.



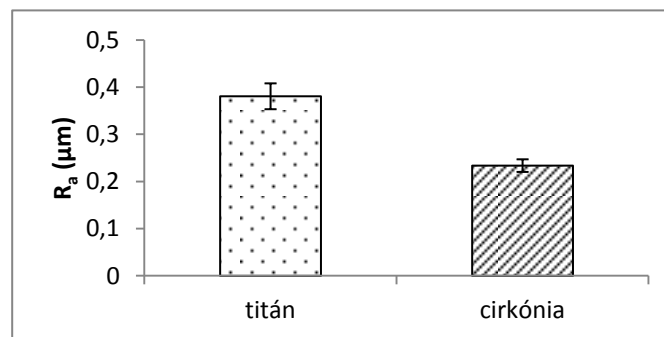
12. ábra. A TRITC-falloidin kémiai szerkezete. [7. internetes hivatkozás]

A két eltérő színű fluoreszcens festékekkel készített felvétel egymásra vetítésével kapott kompozit képen hatékonyan vizsgálhatjuk a sejtek morfológiáját.

4. Eredmények

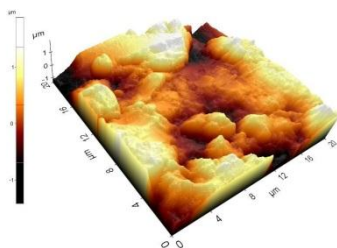
4.1. AFM eredmények

Az AFM méréseket 2 db titán és 2 db cirkónia korong felületén végeztük. Mindkét korong felületét homokfúvással és savmaratással kezelték. 20x20 μm -es területeken számított R_a értékekből határoztuk meg a korongok felületi érdességét, öt különböző helyen vizsgálva. A 13. ábrán látható az eredményeink átlaga és az átlag szórása (SEM-standard error of the mean).

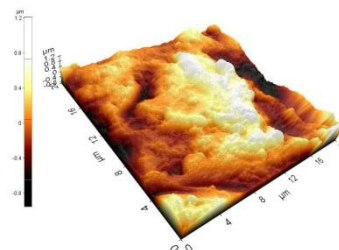


13. ábra. Titán és cirkónia korongok összesített R_a értékei.

A titán felszíne tapintásra is érdesebbnek tűnt mint a cirkónia felszíne, amelyet az AFM mérések is bizonyítottak. A titán korongok felülete volt az érdesebb, amelyhez hasonlítva a cirkónia korongok felületének érdessége szignifikánsan kisebb volt. A felületekről készített 3D-s képeken látható a két felület közötti különbség.



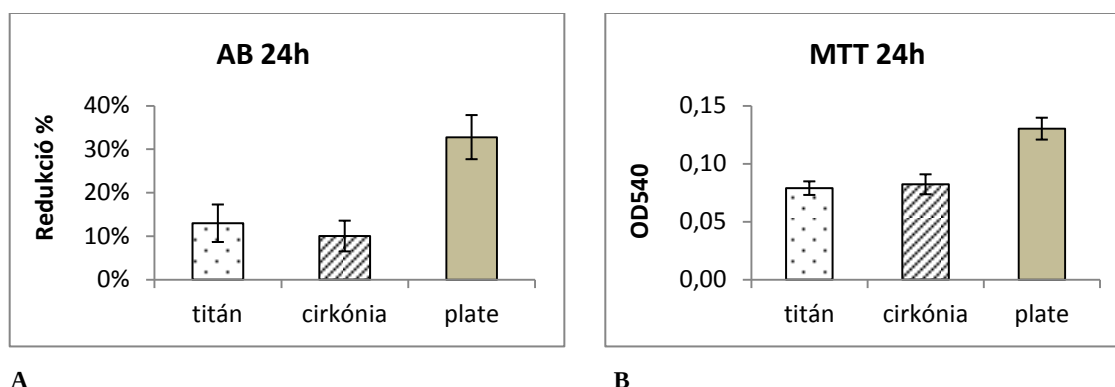
14. ábra. Titán korong felülete (20x20 μm).



15. ábra. Cirkónia korong felülete (20x20 μm).

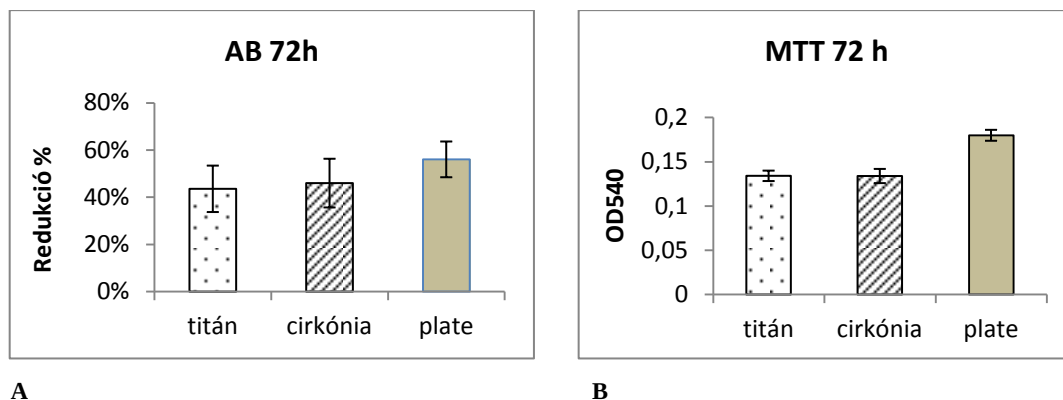
4.2. MG-63 sejtkultúra vizsgálatok

AlamarBlue és MTT segítségével vizsgáltuk az MG-63-sejtek letapadását 24 óra elteltével titán és cirkónia korongokon. Kontrollként a sejtenyésztéshez kialakított polilizinrel bevont műanyag felszínt használtuk (plate). A redukció százalékból és az optikai denzitás értékéből következtettünk a letapadt sejtek mennyiségére és aktivitására (16. A és B ábra). A titán és cirkónia korongokon hasonló mennyiségű sejtet mutattunk ki, közöttük nem volt szignifikáns különbség. A kontroll plate-en mind a titánhoz, mind a cirkóniához képest szignifikánsan több sejt tapadt le, mindkét vizsgálati módszer szerint. Ez a sejtek számára kedvező, polilizinrel bevont felületnek tulajdonítható. Az előző fejezetben láttuk, hogy a titán korongok érdesebbek voltak mint a cirkónia, ez magyarázhatja az MG-63 sejtek kedvezőbb letapadását a titán felszínen.



16. ábra. AlamarBlue redukció százaléka, MTT optikai denzitás értékei 24 óra elteltével.

72 óra elteltével vizsgáltuk a sejtek proliferációját (17. A és B ábra). Mindhárom esetben jelentősen nőtt a sejtszám, tehát a sejtek számára optimális felületekkel dolgoztunk. A kezdeti különbség a letapadásban az idő elteltével csökkent, alamarBlue vizsgálattal már nem volt szignifikáns különbség a vizsgált minták között. Ez bizonyítja mindkét anyag összeintegrációra való alkalmasságát.



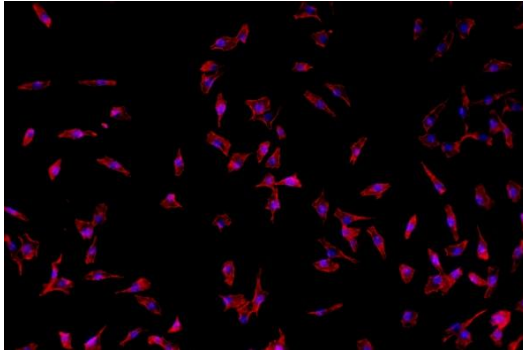
17. ábra. AlamarBlue redukció százaléka, MTT optikai denzitás értékei 72 óra elteltével.

4.3. Fluoreszcens mikroszkópia

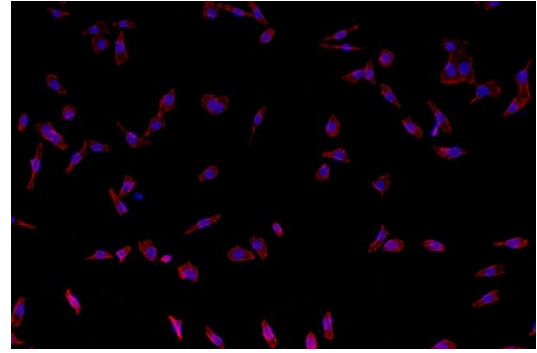
Nikon E600 fluoreszcens mikroszkóppal 100, 200 és 1000x-es nagyítással készítettünk képeket 24 és 72 óra elteltével. A citoszkeletonban található aktin fehérjéhez TRITC-vel jelölt falloidint kötöttünk, amely pirosan fluoreszkál, a sejtmag DNS tartalmához pedig kéken fluoreszkáló Hoechst reagenst kapcsoltunk.

A felvételeken jól látható (18-23. ábra), hogy 24 óra elteltével minden sejt letapadt. A letapadás korai fázisának megfelelően számos gömbölyű sejtet látunk, de jelentős mennyiségű az elnyújtott, a proliferációs folyamat kezdeti szakaszát mutató forma is. 24 óra után a titán felszín kedvezőbbnek tűnik, mivel nagyobb arányban figyelhető meg az elnyújtott sejtforma (18; 20; 22. ábra).

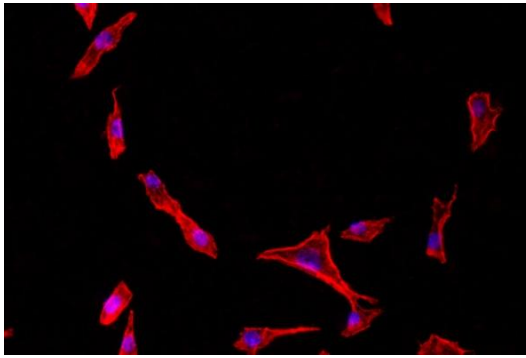
72 óra elteltével mindkét korongon számos elnyújtott sejtet látunk, megjelennek a kisebb nyúlványok is (24-27. ábra). Jellegzetesen a sejtek csoportokba rendeződnek, és nagyobb a proliferációs aktivitás azokon a részein a korongoknak, ahol szigetszerűen több sejt található. A sejtek száma megnőtt és nagyobb, osztódásra kész sejtmagokat láthatunk (29. ábra). A titánon és a cirkónián látható sejtek alakjában már nem találtunk különbséget. Sok olyan sejtet is láthatunk, amelynek egyértelmű a mitotikus aktivitása (26. ábra).



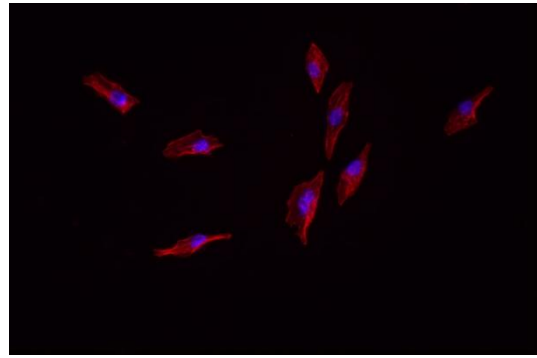
18. ábra. MG-63 sejtek titán korongon, 24 h, 100x-os nagyítás.



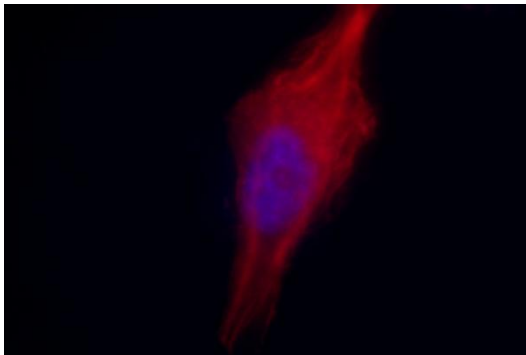
19. ábra. MG-63 sejtek cirkónia korongon, 24 h, 100x-os nagyítás.



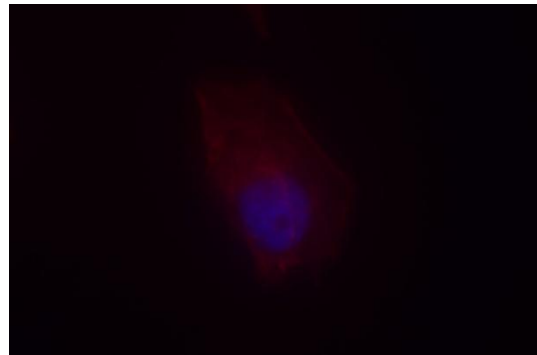
20. ábra. MG-63 sejtek titán korongon, 24 h, 200x-os nagyítás.



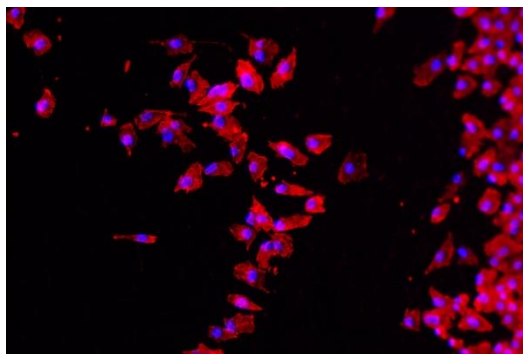
21. ábra. MG-63 sejtek cirkónia korongon, 24 h, 200x-os nagyítás.



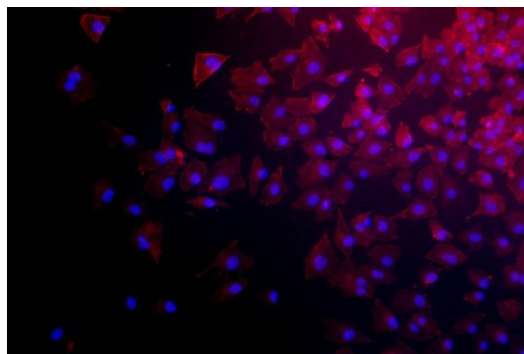
22. ábra. MG-63 sejtek titán korongon, 24 h, 1000x-es nagyítás.



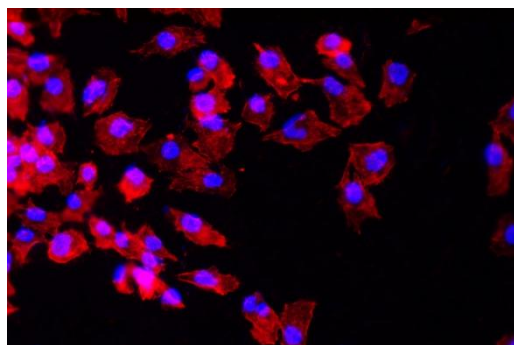
23. ábra. MG-63 sejtek cirkónia korongon, 24 h, 1000x-es nagyítás.



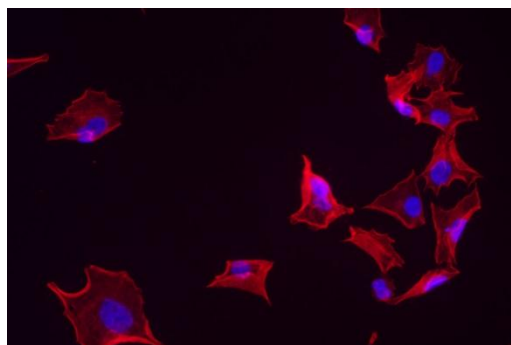
24. ábra. MG-63 sejtek titán korongon, 72 h, 100x-os nagyítás.



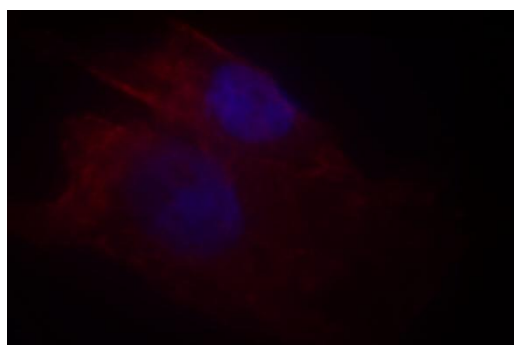
25. ábra. MG-63 sejtek cirkónia korongon, 72 h, 100x-os nagyítás.



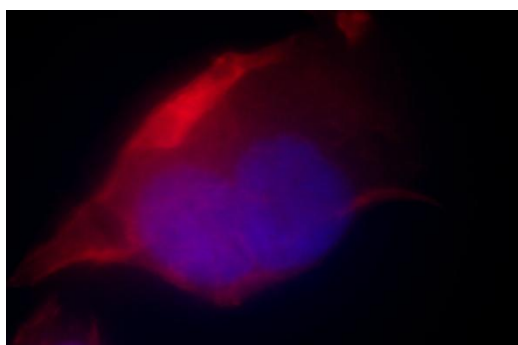
26. ábra. MG-63 sejtek titán korongon, 72 h, 200x-os nagyítás.



27. ábra. MG-63 sejtek cirkónia korongon, 72 h, 200x-os nagyítás.



28. ábra. MG-63 sejtek titán korongon, 72 h, 1000-es nagyítás.



29. ábra. MG-63 sejtek cirkónia korongon, 72 h, 1000x-es nagyítás.

5. Összefoglalás

Diplomamunkám során a karon folyó, titán felületmódosításokkal kapcsolatos kísérletekhez kapcsolódtam be. Először vizsgáltuk a cirkóniát, mint implantátum anyagot *in vitro* körülmények között. A kísérlet során sejtkultúra vizsgálatokat, fluoreszcens mikroszkópos valamint atomierő mikroszkópos méréseket végeztünk. Az MTT vizsgálatok kimutatták, hogy a titán és a cirkónia felületeken azonos módon tapadtak le és proliferálódtak az MG-63 sejtek. Az alamarBlue vizsgálatok 24 óránál kisebb letapadást mutattak a cirkónián mint a titánon, amelyet az érdességbeli különbség is magyarázhat. Azonban 72 óránál (proliferációs fázis) ez a különbség megszűnt. Ez az eltérés abból adódik, hogy amíg az MTT statikusan egy adott időpillanatban méri a sejt aktivitását, azaz jobban korrelál a sejtszámmal, addig az alamarBlue dinamikusan követi a sejtek aktivitását. A fluoreszcens mikroszkópos felvételek alátámasztják az alamarBlue vizsgálatokat, mivel 24 óránál ezek a vizsgálatok is kedvezőbbnek mutatták a titán felületet. Azonban 72 óra elteltével mindkét korongon jól proliferálódtak az MG-63 sejtek. Möller és mtsai. (2012) vizsgálták a cirkónia biokompatibilitását *in vitro* és az összeintegrációt *in vivo*, és azt találták, hogy az oszteoblasztok képesek voltak megtapadni, proliferálni és differenciálódni a cirkónián, amellyel igazolták a megfelelő biokompatibilitását is. Rothamel és mtsai. (2007) viszont kimutatták, hogy az oszteoblaszt szerű SAOS-2 sejtek szignifikánsan jobban növekedtek esztergált cirkónia felületen, mint akár a savmaratott cirkónián, akár a polírozott titán felszínen.

Összefoglalva *in vitro* vizsgálataink kimutatták, hogy mind a titán, mind pedig a cirkónia alkalmas összeintegrációra. Bár még számos *in vivo* állatkísérlet szükséges a továbbiakban, az eddigi eredmények bizonyítják azt, hogy a cirkónia jó alternatíva lehet dentális implantációra, kiváltképpen olyan páciensek esetében, akiknek fémallergiája, vagy vékony gingiva biotipusa van.

6. Irodalomjegyzék

1. BARDEN J A, MIKI M, HAMBLBY B D, DOS REMEDIOS C G: Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *Eur. J. Biochem*, 1987; 162(3): 583–8.
2. BEREZNAI M, PELSŐCZI I, TÓTH Z, TURZÓ K, RADNAI M, BOR Z, FAZEKAS A: Surface modifications induced by ns and sub-ps excimer laser pulses on titanium implant material, *Biomaterials*, 2003; 24: 44197-4203.
3. BRÅNEMARK P I: Osseointegration and its experimental background. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1983; 50: 399-410.
4. BRÅNEMARK R, EMANUELSSON L, PALMQUIST A, THOMSEN P: Bone response to laser-induced micro-and nano-size titanium surface features. *Nanomedicine*, 2011; 7: 220-227.
5. BUSER D, SCHENK R K, STEINEMANN S, FIORELLINI H P, FOX C H, STICH H: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. Histomorphometric study in miniature pigs. *J. of Biomed. Mat. Res.*, 1991; 25: 889-902.
6. COOPER J A: Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.*, 1987; 105(4): 1473–8.
7. DEPPRICH R, ZIPPRICH H, OMMERBORN M, NAUJOKS C, WIESMANN H P, KIATTAVORNSCHAROEN S, LAUER H C, MEYER U, KÜBLER N R, HANDSCHEL J: Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head and Face Medicine*, 2008; 4:30; 1-8.
8. ICHIGAWA Y, AKAGAWA Y, NIKAI H, TRUSU H: Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic *in vivo*. *J. Prosthet. Dent*, 1992; 68:322-326.
9. KASEMO B: Biological surface science. *Surface Science*, 2002; 500, 656-677.
10. KERESZTES ZS, KÁLMÁN E, ERNST A, SZÉKÁCS A: Atomierő mikroszkóp alkalmazása OWLS alapú immunszenzor felületének vizsgálatára. *Biokémia*, 2004; 28:2-4.
11. KLINGE B, MEYLE J: Soft tissue integration of implants. *Clin. Oral Implants Res.*, 2006; 17: 93-96.

12. LAUTENSCHLAGER E P, MONAGHAN P: Titanium and titanium alloys as dental materials, *International Dental Journal*, 1993; 43; 245-253.
13. MOSMANN T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. of Immuno. Methods.*, 1983; v65, i1-2: 55-63.
14. MÖLLER B, TERHEYDEN H, ACIL Y, PURCZ N M, HERTRAMPF K, TABAKOV A, BEHRENS E, WILTFANG J: A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an *in vivo* and *in vitro* study. *Int. J. of Oral & Max. Surg.*, 2012; 41: 638-645.
15. NAGY K, TOLDI F: Az implantológia fejlődésének rövid történeti áttekintése. In: RÓTH L (szerk.): *Implantációs fogpótlások*. Dental Press Hungary Kft., 2005; 14-18.
16. NETTLESHIP I, STEVENS R: Tetragonal zirconia polycrystal (TZP)—A review. *International Journal of High Technology Ceramics*, 1987; V3, I1:1-32.
17. O'BRIEN W J: Dental Materials and Their Selection, *Quintessence Pub Co.* Chicago, ILLINOIS, 2002; 294-308.
18. OROSZ M: A dentális implantológia rövid története, fontosabb alapfogalmak. In: VAJDOVICH I (szerk.): *Dentális implantológia*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2008; 1-5.
19. PARK J B: Biomaterials In: Bronzino J D (ed.) *The Biomedical Engineering*, CRC Press, and IEEE Press, Boca Raton, Florida, 2000, IV.-1-8.
20. PELSŐCZI I, TURZÓ K, GERGELY CS, FAZEKAS A, DÉKÁNY I, CUISINIER F: Structural characterization of self-assembled polypeptide films on titanium and glass surfaces by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 2005; 6; 3345-3350.
21. PICONI C, MACCAURO G: Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, 1999; 20:1-25.
22. PORTUGAL J, WARING M J: Assignment of DNA binding sites for 4',6'-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1988; 949(2): 158–68.
23. PULEO D A, NINCI A: Understanding and controlling the bone implant interface, *Biomaterials*, 1999; 20: 2311-2321.

24. ROTHAMEL D, FERRARI D, HERTEN M, SCHWARZ F, BECKER J: Biokompatibilität und Hartgewebsintegration einphasiger oberflächenstrukturierter Zirkoniumoxidimplantate-Eine kombinierte *in vitro*- und *in vivo* Studie. *Implantologie*, 2007; 15: 405-14.
25. RÖHLICH P: *Szövevény*, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006; 6-7.
26. SENNERBY L, DASMAH A, LARSSON B, IVERHED M: Bone tissue responses to surface-modified zirconia implants: A histomorphometric and removal torque study in the rabbit. *Clin. Impl. Dent. Relat. Res.*, 2005; 7:13-20.
27. SPIEKERMAN H, DONATH K, HASSEL T, JOVANOVIC S, RICHTER J: *Implantology*. In Rateitschak KH, Wolf HF (Eds.) *Color Atlas of Dental Medicine*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.
28. STEJSKAL J, STEJSKAL V D: The role of metals in autoimmunity and the link to neuroendocrinology. *Neuroendokrinol Lett.*, 1999; 20:351-364.
29. SZEKERES M, FODOR G, FAZEKAS A, RADNAI M, TURZÓ K, DÉKÁNY I: Formation of octacalcium phosphate by heterogenous nucleation on a titania surface. *Colloid Polym. Sci.*, 2002; 283, 587-592.
30. TURZÓ K: Surface Aspects of Titanium Dental Implants. *Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*, Prof. Reda Sammour (Ed.), 2012; ISBN: 978-953-51-0151-2, InTech, DOI: 10.5772/29288.
31. VAGKOPOULOU T, KOUTAYAS S O, KOIDIS P, STRUB J R: Zirconia in dentistry part 1: Discovering the Nature of an Upcoming Bioceramic. *The European J. of E. D.*, 2009; v.4, n.2: 130-151.
32. VAJDOVICH Á: A fogorvosi implantátumok beültetésének filozófiája a biomechanika szempontjából. In: VAJDOVICH I (szerk.): *Dentális implantológia*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2008; 153-163.
33. VAJDOVICH I, TÓTH ZS: A cirkónium-oxid biokerámiáról a dentális implantáció kapcsán; *Implantológia*, 2006; 3. évf.1. szám, 18-19.
34. VALENTINE-THON E, SCHIWARA H W: Validity of MELISA for metal sensitivity testing. *Neuro.End. L.*, 2003; 24:57-64.
35. WANG R R, FENTON A: Titanium for prosthodontic applications: A review of the literature, *Quintessence International*, 1996; v27, n6 ;401-408.

36. WENNERERG A, ALBREKTSSON T: Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *John Wiley & Sons*, 2009; 172-184.
37. WENZ H J, BARTSCH J, WOLFART S, KERN M: Osseointegration and Clinical Success of Zirconia Dental Implants: A Systematic Review. *The International Journal of Prosthodontics*, 2008; v21, n1; 27-36.
38. YAMASHITA D, MACHIGASHIRA M, MIYAMOTO M, TAKEUCHI H, NOGUCHI K, IZUMI Y, BAN S: Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dental Materials Journal*, 2009; 28 (4): 461-470.

Internetes hivatkozások:

1. <http://www.freesbi.ch/en/illustration/figures>
2. <http://www.abdserotec.com/redox-principle-for-alamarblue.html>
3. <http://static.abdserotec.com/uploads/ifu/buf012b.pdf>
4. http://biologywiki.apps01.yorku.ca/index.php?title=File:Fluorescence_Microscopy_01.png
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope
6. <http://www.bdbiosciences.com/eu/documents/Immune-Function-Application-Handbook-2ndEd.pdf>
7. http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p1951pis.pdf

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni **Dr. Turzó Kinga** tanárnőnek a konzultációk során adott hasznos tanácsokat, a számos kiváló szakirodalmat. Köszönöm, hogy csatlakozhattam a karon folyó kutatásokhoz, továbbá köszönöm, hogy ellenőrizte és javította a készülő munkámat.

Köszönet illeti **Dr. Györgyey Ágnest**, aki mindvégig segítségemre volt a sejtkultúra vizsgálatokban, fluoreszcens mikroszkópos mérésekben. Köszönöm a munkám során adott hasznos tanácsait és a felmerülő problémákban nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom **Dr. Heszlerné Kopniczky Juditnak** (SZTE TTIK, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék), hogy betekintést nyerhettem az atomierő mikroszkópos vizsgálatokba.

Továbbá köszönöm **Dr. Buzás Krisztinának** (MTA SZBK, Biokémiai Intézet Tumorimmunológiai és Farmakológiai Kutatócsoport), hogy rendelkezésünkre bocsájtotta a fluoreszcens mikroszkópot.

Köszönet illeti **Horváth Máriát és Ádám Andrást** a kísérletek előkészítésében nyújtott segítségükért.