

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

**Postgraduální doktorské studium biomedicíny při UK a
AV ČR v Praze**

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

**Biologické vlastnosti titanové slitiny povlečené
hydroxyapatitem ve vztahu k přímému zatížení
dentálního implantátu**

MUDr. Michaela Beznosková Seydlová

Praha 2006

Školitel: Prof. MUDr. Tatjana Dostálová, DrSc., MBA
Přednostka Dětské stomatologické kliniky
Fakultní nemocnice v Motole
150 06 Praha 5 – Motol, V Úvalu 84

Prohlašuji, že tato práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího disertační práce.

V Praze dne 4.12.2006

Handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Boncová". The signature is written over a horizontal dotted line.

podpis

Tato disertační práce by nemohla vzniknout bez neocenitelného odborného vedení a konzultací Prof. MUDr. Taťjany Dostálové, DrSc., MBA, které si dovoluji touto cestou velice poděkovat. Za odborné i praktické rady a ochotnou pomoc patří dík také Prof. MUDr. Karlu Smetanovi, DrSc. a RNDr. Barboře Dvořánkové. Za přípravu vzorků bych ráda poděkovala skupině z Fyzikálního ústavu AV ČR pod vedením Doc. Ing. Miroslava Jelínka, DrSc.

Disertační práce vznikala v letech 2003 – 2006 za přispění grantového projektu IGA MZ ČR 8512-3: *Využití parametrů biokeramických vrstev a buněčné terapie při integraci dentálního implantátu.*

1. ÚVOD.....	1
2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE.....	5
3. TEZE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	6
4. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	7
4.1 Přímé zatížení.....	7
4.2 Reakce kostní tkáně na implantát.....	10
4.3 Faktory ovlivňující vhojení implantátu oseointegrací.....	11
4.3.1 Charakter pacienta.....	12
4.3.2 Tvar, velikost a povrchová úprava implantátu.....	14
4.3.3 Chirurgické zavedení implantátu.....	17
4.3.4 Kvalita a kvantita kosti.....	18
4.4 Indikace přímého zatížení.....	23
4.5 Kontraindikace přímého zatížení.....	25
4.6 Pulzní laserová depozice.....	25
4.7 Adheze buněk.....	27
4.8 Extracelulární matrix.....	28
5. MATERIÁL A METODY.....	30
5.1 Test cytotoxicity.....	30
5.2 Barvení buněk.....	33
5.3 Test adheze.....	33
5.5 Průkaz exprese fibronektinu.....	34
5.6 Test proliferace, MTT.....	35
6. VÝSLEDKY.....	37
6.1 Test cytotoxicity.....	37
5.2 Test adheze a proliferace.....	43
5.3 Průkaz exprese fibronektinu.....	44
5.4 Proliferace LEP₁₉, MTT.....	45
7. DISKuze.....	48
8. ZÁVĚR.....	54
9. SUMMARY.....	55
10. LITERATURA.....	56
11. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORKY, VĚDECKÁ OCENĚNÍ.....	63

1. Ú V O D

Dentální implantologie se zabývá zavedením biokompatibilního materiálu na povrch kosti nebo do kosti horní či dolní čelisti. Cílem je dokonalá integrace implantovaného materiálu zajišťující dlouhodobý léčebný efekt [1].

Snaha o rekonstrukci chrupu pomocí alogenního materiálu je stará několik tisíc let, v dřívějších dobách však často končila nezdarem. Implantologii limitují tři zásadní problémy, které se podařilo úspěšně zvládnout až v poslední době. Jsou to: inkorporace materiálu jako cizího tělesa, rekonstrukce periodontia a náhrada dentogingiválního úponu [2]. Díky oseointegrovaným implantátům je inkorporace materiálu vyřešena. Periodoncium, ani kvalitní dentogingivální úpon však zatím nahradit současná implantologie neumí. Spojení ústní sliznice s implantátem se tedy stává nejslabším místem současné implantologie.

O nejvýznamnější přelom v dentální implantologii se zapříčinil Švéd Per-Ingvar Brånemark, který okolo roku 1952 jako mladý vědecký pracovník objevil při studiu krevních buněk víceméně náhodný jev, který byl později nazván osteointegrace (bude vysvětleno níže). Začátkem 80. let 20. století ovládly osteointegrované implantáty téměř celou dentální implantologii. Jedinou významnější novinkou bylo zavedení hydroxyapatitového povlaku na titanový povrch implantátu (1984).

Biomateriály obecně jsou definovány jako syntetické materiály, které navodí specifickou biologickou aktivitu. Dříve se biokompatibilním materiálem nazýval takový materiál, který vyvolal minimální biologickou odpověď. Nyní je biokompatibilita popsána jako schopnost materiálu chovat se uspokojivě v požadovaných aplikacích. Biokompatibilní materiál musí splňovat několik základních podmínek - musí odolávat korozi a chemickým vlivům ve

fyziologických tekutinách, vydržet mechanický stres, který je na něj během jeho životnosti vynakládán, dále musí být jednoduše formovatelný do požadovaného tvaru, nesmí vyvolávat alergickou či toxickou reakci a nesmí interferovat s imunitním systémem a krevními elementy zejména ve smyslu zvýšené srážlivosti [3].

Vzhledem k implantátům je možno rozdělit biomateriály do čtyřech základních kategorií [3, 4, 5]:

1. biologicky inaktivní – okolní tkáň reaguje tak, že je zaobalí do neadherující fibrosní tkáně (enkapsulace), sem patří chromkobalt, chromnikl, Al_2O_3 keramika, polyethylen a další.

2. porézní – umožňují vrůstání tkáně do pórů (biologická fixace), sem patří: hydroxyapatit a hydroxyapatitem povlakované kovy.

3. bioaktivní – vážou se k tkáním (biologická fixace díky chemické vazbě mezi implantátem a kostí). Bioaktivní materiál vyvolá specifickou biologickou odpověď, která vede posléze ke vzniku de novo tvořené mineralizované kosti. Tato skupina zahrnuje: denzní kalciumfosfátovou keramiku, bioaktivní sklo, bioaktivní sklo-keramiku a další.

4. resorbovatelné – ty jsou postupně časem nahrazovány tkání: např. trikalciumfosfát.

Titan disponuje vynikajícími parametry fyzikálními, ale z hlediska biologických vlastností známe materiály výhodnější. Jako perspektivní se ukázal postup, který představila v roce 1984 kalifornská firma Calcitek, kdy zkonstruovala kovové jádro implantátu z titanové slitiny a metodou plasmového naprašování ji pokryla tenkou vrstvou hydroxyapatitu [2]. Křehká struktura HA

vybízí k nanesení tohoto materiálu na více odolný substrát jako je titan či titanová slitina Ti6Al4V [6].

Kalcium hydroxyapatit (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, neboli hydratovaný kalciumfosfát je svojí strukturou podobný minerálnímu složení kostí a zubů. Hydroxyapatitová keramika se užívá v medicínských aplikacích pro její rychlou a přímou vazbu na kostní tkáň [6]. Je nositelem základních znaků bioaktivity – osteokondukce a možná i osteoindukce [7]. Osteokondukčními vlastnostmi rozumíme schopnost sloužit osteoblastům a osteocytům jako mřížka pro překlenutí tkáňového defektu při postupující novotvorbě kosti. Tato vlastnost tvoří základ využití tohoto materiálu k povlakování v ortopedii a v dentální implantologii [7]. Osteoindukce pak znamená podporu tvorby nové kostní tkáně prostřednictvím chemického agens. Schopnost vázat kostní tkáň je právě unikátní vlastností bioaktivní keramiky. Analýzy na rozhraní implantát-kost prokázaly přítomnost hydroxyapatitu jako klíčového pro vznik mezivrstvy [8]. Chemická interakce mezi HA a kostní tkání umožňuje úspěch terapie [7].

Povlakování je z technologického hlediska velmi obtížný úkol. Bylo vyvinuto několik technik k povlakování: plasma naprašování, iontové naprašování nebo depozice pomocí elektroforézy [7]. Nejvíce komerčně používanou technikou je právě výše zmíněná technika plazmového naprašování. Nejslibnější technikou při nanášení tenkých vrstev na kovové jádro se jeví pulzní laserová depozice, která dokáže nanášet velmi tenké vrstvy krystalického HA [7].

Přednosti povlakování byly prokázány histologickými, histomorfometrickými a biomechanickými studiemi a jsou všeobecně uznávány [2]. Vhojení bioaktivního hydroxyapatitu do kosti (biointegrace) je kvalitnější spojení než osteointegrace a podle mnohých autorů má dokonce povahu

chemickou [2]. Probíhá přibližně dvakrát rychleji, což dovoluje pak u povlakovaného implantátu zkrátit vhojovací období. Povlakované implantáty jsou zároveň podstatně tolerantnější k nepřesnostem vzniklých při preparaci kostního lože.

V recentních studiích autoři prokázali, že krystalické vrstvy nanesené pomocí PLD jsou schopné vytvořit pevnou vazbu s okolní kostní tkání [9, 10].

Mnozí autoři považují hydroxyapatitem povlakované implantáty z hlediska dlouhodobé stability za kontroverzní a jsou předmětem mnoha kritik. Ve studii Šimůnek et al. (2005) byla prezentována šestiletá retrospektivní studie, kde hydroxyapatitem povlakované implantáty ve srovnání s implantáty nepovlakovanými dosáhly srovnatelné výsledky [11]. Předmětem zájmu však byla i ztráta marginální kosti, kde bude však třeba dlouhodobější pozorování. Celosvětově stále nebyl upřesněn vliv krystalinity hydroxyapatitu na osteointegraci vlastního implantátu. Oh et al. ve studii na potkanech prokázali větší sílu vazby na povrch implantátu a rozsáhlejší obsah kosti u implantátů povlečených hydroxyapatitem s větší krystalinitou [12].

Studium adheze a proliferace buněk na povrch implantátu umožní zjistit cytocompatibilitu užitého materiálu [13]. Mechanismus, kterým tvrdé tkáně interagují s implantátem, je komplexní děj a zahrnuje mnoho procesů. Modifikovaný povrch implantátu podněcuje okolní buňky k sekreci matrix, buňky se poté začnou diferencovat v osteoblasty. Kalcifikace pak proběhne za 3-6 dní a kost se začíná remodelovat za 21 dní [13].

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Byl vyvinut nový typ implantátu z titanové slitiny Ti6Al4V se speciální úpravou povrchu - laserově nanesenou tenkou vrstvou krystalického hydroxyapatitu s mezivrstvou zirkonu.

Cílem mé disertační práce bylo otestovat tento nový povrch implantátu z hlediska biologické snášenlivosti. Mým úkolem bylo především provést základní testy cytotoxicity a na jejich základě pokračovat v biologické charakteristice povrchu implantátu. Bylo nutno vybrat vhodné buňky ke kultivaci a příslušné metodiky *in vitro* a s jejich pomocí zároveň zhodnotit, zda lze tento materiál splňuje základní kritéria k provádění testů *in vivo*, které by mohly do budoucna vést k jeho využití v klinické praxi.

3. TEZE DISERTAČNÍ PRÁCE

- ❖ Přímé zatížení implantátu je stále více žádanou metodou ošetření.
- ❖ Abychom mohli implantát přímo zatížit, je nutné zejména dosáhnout dobré primární stability implantátu a mít takový povrch implantátu, který umožní rychlejší osteointegraci.
- ❖ Povlakování implantátu je jednou z možností, jak vylepšit vlastní povrch implantátu, pulzní laserová depozice umožňuje vytvořit tenkou vrstvu vysoce denzního krystalického hydroxyapatitu.
- ❖ Nejčastějším a zároveň nejslibnějším materiálem se jeví hydroxyapatit.
- ❖ Krystalický hydroxyapatit vykazuje dobré osteokondukční vlastnosti.
- ❖ Hydroxyapatit se dá na jádro implantátu nanést různými způsoby – pulzní laserová depozice je jednou z metod.
- ❖ Pro zlepšení adheze hydroxyapatitu na jádro lze využít zirkonu, který je v tenké mezivrstvě. Vylepší tak relativně slabou mechanickou vazbu mezi hydroxyapatitem a vlastním substrátem.
- ❖ Biologická evaluace hraje klíčovou roli, chceme-li v budoucnu využít daný materiál pro klinické použití. Základní *in vitro* testy – test cytotoxicity, test adheze, proliferace buněk a produkce extracelulární matrix prokáží základní biologické vlastnosti nově vytvořeného typu implantátu, neboť zejména adheze buněk na povrch materiálu má významný vliv na biologickou integraci materiálu.
- ❖ Fibroblasty lze dobře využít k biologickým *in vitro* testům, neboť v mnoha již provedených studiích prokázali velmi podobné vlastnosti jako osteoblasty. Jsou to zároveň hlavní buňky volné pojivové tkáně a hrají důležitou roli v procesu hojení rány.

4. LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 Přímé zatížení

Zatížení implantátu lze rozdělit na přímé (imediátní), časné (early functional loading) a na tzv. odložené, tj. provedené ve druhé fázi. Chirurgická fáze zavedení implantátu nabízí dvě základní metody – metodu dvoufázovou (tzv. two-stage surgical protocol) a jednodobou implantaci (tzv. one-stage surgical procedure) [14, 15].

Klasický je tzv. two-stage protocol dle Bránemarka (publikovaný v roce 1977), jehož cílem je odložené zatížení. Během první chirurgické fáze se implantuje pouze endoseální část implantátu (tzv. fixtura). Druhá operace, která se provádí během vhojovacího období, které v maxile trvá asi 6 měsíců a v mandibule zhruba 3-4 měsíce, je nutná k zavedení vhojovacího válečku do vnitřního závitu fixtury, kolem kterého se za 2-3 týdny vytvoří slizniční manžeta. V další etapě se nahrazuje vhojovací váleček abutmentem (zubním pilířem). Následně se nasazuje suprastruktura a tím implantát může být zatížen [2, 16]. Mezi hlavní důvody této klasické metody patří zejména minimalizování rizika infekce, prevence fibrosního vhojení implantátu a snížení rizika neúspěchu časného zatížení [14]. Mnozí autoři uvádějí, že implantát by měl být zanořen pod měkkými tkáněmi a po zavedení by rána neměla být insultována po nejméně 3–6 měsíců. Doba klidu má napomáhat k nerušenému zhojení rány a zlepšit osteointegraci implantátu [17, 18, 19]. Možné mikropohyby implantátu (viz dále) způsobené funkčními silami mezi kostí a implantátem mohou při brzkém zatížení indukovat vznik fibrosní tkáně (fibrointegrace) místo žádoucí osteointegrace [17].

Při jednodobé implantaci (one-stage surgical procedure) se abutment k fixtuře připojí ihned po implantaci. Zatížení tak může být okamžité [2] nebo

časné. Podobné výsledky ošetření ve srovnání s klasickým protokolem publikoval Åstrand a Buser. Většina implantátů byla zavedena do bezzubých čelistí a zatížena rozsáhlým fixním můstkem. Ten byl během vhojovací iniciální fáze podložen měkkým podkládacím materiálem, čímž došlo ke kontrolovanému zatížení [14]. Jinou metodu kontrolovaného zatížení se 100% úspěchem publikovali Henry a Rosenberg v roce 1994. Zavedli 30 Brånemarkových implantátů pěti pacientům. Každý pacient obdržel 6 implantátů, z nichž 4 byly zatíženy imediálně a 2 byly ponechány v kosti s ohledem na možný neúspěch přímého zatížení. Ihned byla nasazena provizorní snímatelná náhrada, která byla i nad nezatíženými vnořenými implantáty, po 7 týdnech byla vyměněna za fixní můstek. Zpočátku měla konstrukce minimální rozsah, extenze proběhla až druhý rok [16].

O časné zatížení se jedná případě, kdy je implantát bez zatížení asi 10 dní po zavedení. V této době se očekává zhojení měkkých zubních tkání. Poté může být na 10 dní nasazena provizorní náhrada před odevzdáním náhrady definitivní. Doba bez zatížení (u této metody) tedy celkově nepřekročí časový horizont 20 dní [14]. Časné zatížení metodou one-stage s referenční skupinou (two-stage protocol) bylo předmětem studie Ericsson et al. [14]. Zavedeny byly opět Brånemarkovy fixtury do interforaminální oblasti. Tato klinická studie ukázala, že titanové fixtury mohou být časně zatíženy rozsáhlým fixním můstkem a že změna úrovně marginální kosti hodnocená radiograficky je u obou sledovaných skupin srovnatelná (v časovém úseku 0-18 měsíců u sledované skupiny 0,4 mm a u referenční 0,8 mm, dále pak v rozpětí 18-60 měsíců u sledované skupiny 0,2 mm a u referenční skupiny 0,0 mm). Může se tedy jednat o nový posun v ošetření bezzubé dolní čelisti.

Snaha o přímé zatížení přichází zejména s ohledem na nutnost zkrácení léčby, a tím i zjednodušení léčebného protokolu, snížení diskomfortu pacienta a v neposlední řadě i z důvodů estetických, časových a finančních [20, 21, 22]. První studie přímého zatížení Bránemarkových implantátů byla publikována Schnitmannem et al. v roce 1990. Zavedeno bylo 5 nebo 6 implantátů do přední části mandibuly každého pacienta a zároveň 2 fixtury distolinguálně od foramen mentale. Imediátně zatíženy byly uvedené 2 distolinguálně zavedené fixtury a 1 fixtura interforaminální. Ostatní fixtury byly užity jako kontrolní skupina, kde bylo umožněno klasické vhojovací období. Výsledky stejné studie z roku 1997 ukázaly ztrátu 4 z 28 imediátně zatížených fixtur u čtyř pacientů, zatímco v kontrolní skupině k žádné ztrátě nedošlo [16].

Za nejvíce kontroverzní u techniky přímého zatížení lze považovat pochybnost, zda při této metodě dochází k fibro - či osteointegraci. Mnoho studií dokazuje, že k fibrointegraci dochází, jiné studie zase naznačují opak. Fibrointegrací označujeme vytvoření vazivové mezivrstvy v mikroprostoru mezi implantátem a přilehlou kostí. Někdy je tato vrstva nazývána pseudo-periodonciem. Jedná se o selhání stabilní nitrokostní regenerace. Vazivová tkáň je obklopena nezralou pletivovou kostí – jizevnatou bariérou, která implantát obklopuje. Tento stav se nepovažuje za úspěšný výsledek implantace. Fibrointegrace je obzvláště typická pro biotolerantní materiály a jejich slitiny (Cr, Co, Mo, Ni) [2]. Brånemark (1983) uvádí, že fibrointegraci může způsobit trauma při chirurgickém zavádění implantátu nebo je-li implantát příliš brzy zatížen [19].

Podstatou osteointegrace je přímý kontakt povrchu implantátu s kostí bez jakékoliv mezivrstvy, dříve označováno Schroederem (1976) jako ankylotické ukotvení. Jedná se tedy o přímý adhesivní kontakt živé kosti s anorganickým

materiálem [2, 19]. Tento kontakt vzniká právě díky povrchu implantátu či jeho povrchové úpravě [23]. Úspěšně integrovaný implantát je ten, u něhož se vytvoří přímý nezprostředkovaný kontakt živé kosti s vrstvou kovu nebo jeho povrchovou úpravou, ať je z jakéhokoli materiálu. Mezi klasické faktory ovlivňující osteointegraci řadíme eliminace mikropohybů implantátu (viz dále) a právě dostatečné časové období, po které nebude implantát zatížen [19, 24, 25]. Histologické studie provedené na vypreparovaných implantátech, které byly přímo zatíženy, potvrdily vysoké procento kontaktu na rozhraní implantát-kost. Na tomto rozhraní nebyly přítomny žádné mezery či fibrosní tkáň. Studie prokázaly osteointegraci u přímo zatížených povlakovaných implantátů [26].

4.2 Reakce kostní tkáně na implantát

Proces vhojování implantátu v předem vypreparované kavitě je srovnatelný s hojením kostní rány, a sice dochází k fyziologické zánětlivé odpovědi organismu, která je modifikována přítomností implantátu. V prvních hodinách se povrch implantátu pokryje krevními elementy, zejména trombocyty a fibrinem. Vhojování začíná zánětlivou odpovědí organismu hned, jak je implantát zaveden. Velmi brzy se na povrchu implantátu vytváří afibrilární kalcifikovaná vrstvička srovnatelná s lamina limitans kosti (pozorováno jak in vitro, tak in vivo) a dochází k sorpci proteinů krevní tekutiny. Tato vrstvička je silná asi 0,5 μm a je bohatá na vápník, fosfor, osteopontin a sialoprotein. Právě tyto proteiny regulují adhezi buněk a vazbu minerálů. Již během prvního dne adherují na implantát díky afibrilární kalcifikované vrstvičce mezenchymální buňky, preosteoblasty a osteoblasty, aby produkovaly kolagenní fibrily osteoidní tkáně. Během několika dní od implantace již vláknitá a trámčitá kost s kostními trabekulami ohraničuje

široké prostírky kostní dřeně bohaté na cévy a mezenchymální buňky. Osteogeneze v bezprostřední blízkosti implantátu probíhá jednak směrem z kosti k implantátu, tzv. vzdálená osteogeneze, a jednak od povrchu implantátu směrem ke kosti, tzv. kontaktní osteogeneze. Trámčitá kost složená z kolagenních vláken různé velikosti a směru uspořádání obsahuje více glykosaminoglykanů s navázanou sulfátovou skupinou než kost lamelární. Finálně se pak přestaví na vyzrálou lamelární kost, která je charakteristická pro vlastní osteointegraci implantátu. Bylo prokázáno u různých typů implantátů, že po třech měsících od implantace se v okolí implantátu objeví kost složená, tj. složená jak z trámčité, tak lamelární kosti. Avšak již ve vzdálenosti 1 mm a více od povrchu implantátu se nachází zcela jiný charakter kosti, kde probíhá jak osteogeneze, tak resorpční pochody [23].

4.3 Faktory ovlivňující vhojení implantátu oseointegrací

Vhojování implantátu oseointegrací a její rozsah je proces, na který působí mnoho faktorů jak ze strany příjemce, tak ze strany vlastního materiálu. Mezi zásadní faktory vhojení implantátu oseointegrací patří [14, 18, 24, 26, 27] :

- Charakter pacienta – celkový zdravotní stav, anatomie čelistí, bruxismus
- Design implantátu – tvar, velikost a povrchová úprava
- Chirurgické zavedení implantátu – atraumatická technika, stabilita implantátu, mikropohyby
- Charakter kosti – kvalita a kvantita

- Protetické ošetření – dlahování (splinting - dočasné, trvalé, snímatelné, fixní).

Z uvedeného tedy vyplývá, že rozdílné druhy implantátů indikované v různých situacích a v rozdílných typech čelistí potřebují jinou dobu na řádné vhojení [14].

4.3.1 Charakter pacienta

Z celkového pohledu se jedná zejména o zdravotní stav pacienta a anatomii jeho čelistí. Kontraindikace v dentální implantologii bychom v podstatě mohli rozdělit na všeobecně medicínské, psychicky podmíněné, intraorální a na dočasné [2, 28].

Nejčastějším problémem je nedostatečný objem alveolární kosti (viz dále). Moderní chirurgické metody (řízená tkáňová regenerace, sinus lift, přenos kostního štěpu, atd.) však umožňují tyto překážky překonat. Alveolární kost musí být zhojená (např. po extrakci), parodontitis přeléčená bez aktivních parodontálních chobotů. Z parafunkcí je nebezpečný především bruxismus. Důkladná indikační rozvaha je nutná u pacientů ozářených v orofaciální oblasti. Zde hrozí nejen primární selhání, ale též radioosteomyelitis [2]. Za velmi rizikové se považuje iradiace v celkové dávce vyšší než 55Gy [29]. Kouření představuje kontroverzní otázku implantologie, nad 15 vykouřených cigaret denně bychom měli implantaci zvažovat [2].

Mezi dočasné překážky implantace se řadí akutní febrilní onemocnění, gravidita, některé užívané léky (imunosupresiva, kortikoidy) [2].

S psychicky podmíněnými kontraindikacemi se setkáváme u nespolupracujících pacientů, ať už z důvodu organické nemoci (maniodepresivní psychoza, těžká mentální retardace, drogová závislost) nebo u pacientů velmi časově zaneprázdněných, kdy bývá téměř nemožná dispenzární péče [2].

Mezi překážky všeobecně medicínské patří věk, nízká zručnost pacienta ve smyslu udržování dostatečné ústní hygieny a některá celková onemocnění. Věk je důležitým limitujícím faktorem ve smyslu minimální věkové hranice, která je dána ukončením růstu čelistí. U děvčat je to kolem 16. roku, u chlapců kolem 18. roku věku. Implantujeme-li dříve, fixtura může v čelisti putovat a postupem času se tak stát proteticky nevyužitelnou [2]. Ze studie Sennerby et Rasmusson (2001) vyplývá, že věk (není-li porušena minimální věková hranice), ani pohlaví nemají žádný vliv na úspěšnost implantace, je-li užito one- nebo two- stage techniky zavedení implantátu [29]. Mezi celková onemocnění bránící implantaci patří diabetes mellitus, hepatopatie, nefropatie, systémová kostní onemocnění (ostitis deformans, osteogenesis imperfecta). Dekompenzovaný diabetes mellitus je absolutní kontraindikací, kompenzovanému diabetikovi se s možným rizikem implantovat může. Diskutovanou problematikou je postmenopauzální osteoporosa projevující se na ortopantomogramu prořídlostí kostní strukturou. Je však nutno říci, že těžká osteoporosa málokdy postihuje bradovou krajinu dolní čelisti [2]. Sennerby et Rasmusson (2001) uvedli, že ošetření přímým zatížením implantátu u pacienta s osteoporosou lze považovat za potencionální riziko, neboť primární stabilita implantátu není jistá [29]. Nebyly provedeny žádné dlouhodobější studie přímého zatížení u pacientů s diagnostikovaným diabetem, hyperparathyroidismem, ani u pacientů zářených, či u kuřáků. Metabolické poruchy mineralizace čelistních kostí po implantaci při onemocnění trávicího

ústrojí hlavně z hlediska poruch střevní resorpce, endokrinní poruchy vyjádřené mimohraničními hodnotami alkalické fosfatázy v séru a hlavně zvýšená hladina kalcie, mohou být jedním z vodítek při pochybnostech o celkovém zdravotním stavu ve vztahu ke kvalitě čelistí před implantací [28]. U všech těchto rizikových skupin pacientů se stále preferuje klasický two-stage protocol s vhojovací fází implantátu [17].

4.3.2 Tvar, velikost a povrchová úprava implantátu

Povrchová charakteristika biomateriálu, která bude podobná povrchovým vlastnostem kosti (míněno zejména velikostí zrn v řádech nanometrů) nepochybně přispěje k novotvorbě kosti na rozhraní kosti a biomateriálu [27]. Zdrsnění povrchu implantátu právě některou z technik povlakování může urychlit osteogenezi právě díky ovlivnění metabolické aktivity osteoblastů a buněčné adheze [30].

S příchodem moderních materiálů, kde se velikost zrna pohybuje do 100 nm je nyní možné vytvořit takový materiál, který simuluje povrchové vlastnosti kosti [27].

Nejčastěji používanými implantáty z hlediska tvaru jsou implantáty titanové válcové. Převládá názor, že pro kvalitní osteointegraci je výhodnější hrubší povrch s nerovnostmi o rozměru 1,0 – 1,5 μm . Volí se mezi dvěma základními skupinami technologií, jak povrch implantátu upravit. Jednak je to tzv. subtraktivní metoda, kdy se z původně hladkého povrchu hmota ubírá (sem patří zejména pískování a leptání kyselinou) a dále tzv. aditivní metoda, kdy se naopak přidává další materiál (plasma sprejování, pulzní laserová depozice) [2]. Touto

metodou nazývanou povlakováním (coating) vzniknou povlakované implantáty (coated implants).

Povlakované implantáty vznikly ze snahy vyrábět implantáty z více biokompatibilních materiálů. Biologická odpověď na materiál, jak in vivo, tak in vitro testech, se liší dle materiálu a je ovlivněna povrchovými vlastnostmi materiálu [31]. Jako velmi výhodný materiál se dle mnoha studií jeví hydroxyapatit, který má i vlastnosti osteokondukční, tj. má schopnost vést osteogenezi určitým směrem. Vlastní mechanismus, kterým kalciumfosfátová keramika zlepšuje kvalitu vazby kosti, není zcela znám. Je však známo, že bioaktivita keramiky má vztah k míře rozpustnosti materiálu a že hraje roli v rámci brzké buněčné odpovědi. Odpověď buněk a tkání na rozhraní keramika-kost byly zkoumány jak na buněčných a tkáňových kulturách, tak in vivo [31].

Hydroxyapatitové povlaky, stejně tak jako povlaky kalciumfosfátové, byly velmi intenzivně zkoumány v 80. letech 20. století. Gottlander (1984) shrnul veškeré poznatky z in vitro a krátkých in vivo studií na zvířatech. Tyto studie prokázaly rychlejší odpověď okolní kosti a vznikla tak možnost pro budoucí klinické využití zejména v kosti o nižší kvalitě [32].

První klinické studie povlakovaných implantátů byly velmi povzbuzující, ukazovaly velké procentuální úspěchy i tam, kde nabídka kosti v místě implantace nebyla velká. Avšak po delší době od implantace se objevilo mechanické selhání na rozhraní HA-kovové jádro. Hydroxyapatitová vrstva se rozpouštěla, neboť použitý HA byl amorfní či velmi málo krystalický [6]. Tato tenká vrstva může být stabilizována depozicí tenké vrstvy vysoce denzního a krystalického HA [6].

Trisi et al. se domnívá, že pozorované vymizení HA může být následkem lokalizovaného procesu kostní remodelace. Během remodelace kosti lokálně

aktivované osteoklasty tvoří kavity od 50 do 70 μm na povrchu kosti, právě tam pak osteoblasty novotvoří kost. Množství ztráty HA povlaku pak může být úměrné množství remodelované kosti na rozhraní implantát-kost [30].

Mezi často zmiňované nevýhody tenkého povlaku HA na jádře implantátu patří tendence tohoto materiálu fragmentovat [7]. Uvolnění partikulí materiálu může způsobit nepříznivou reakci okolní tkáně, která může být podobná situaci jako kdyby fragmentoval polymetymetakrylát či polyetylen [7]. Mnoho typů studií prokázalo, že změna fyzikálních vlastností, či krystalické formy, jsou kritickou determinantou biologické odpovědi na HA či tricalciumphosfát [7].

Dle poznatků Trisi et al. [30], který provedl histologickou verifikaci přítomnosti HA na cylindrických implantátech povlečených HA po deseti letech zatížení, vyplývají velmi pozitivní výsledky. Histologické vyšetření potvrdilo přítomnost vrstvy lamelární kosti na rozhraní HA povlaku. Ztráta povlaku implantátu nedosáhla ani 25% celého povrchu implantátu. Potvrdil tak poznatky z předešlých studií [30]. Je velmi důležité, že tento rozsah ztráty povlaku nezabránil oseointegraci.

Pulzní laserová depozice byla poprvé představena v roce 1992 [33]. U PLD velmi rychle kondenzují páry hydroxyapatitu na kovové jádro jako tenká vrstva a mikročástice v ten samý čas [31]. Změna parametrů laserového paprsku má vliv na velikost a distribuce mikročástic. To umožňuje tvorbu keramických povlaků, které jsou nanášeny velmi těsně na povrch a mají předem definovanou krystalinitu, morfologii i skladbu. Povrchové vlastnosti bioaktivních materiálů jsou tedy dány způsobem vlastní přípravy povlaku [31]. PLD je schopná vytvářet povlaky, které jsou v podstatě velmi hustě zkomprimovanými mikročásticemi.

U techniky plasma sprejování závisí konečné vlastnosti povlaku na vlastnostech kalciumfosfátu jako vstupního prášku, kdy musí být předem nadefinována velikost částic a krystalinita [31].

Implantát se šroubovým závitem vykazuje větší mechanickou retenci, minimalizuje mikropohyby, zlepšuje iniciální stabilitu, zvětšuje povrch implantátu. Je proto všeobecně přijímáno používat tyto implantáty k přímému zatížení. Naproti tomu hladký povrch se jeví pro přímé zatížení jako kontraindikovaný kvůli nižší primární stabilitě a menší odolnosti ve vertikálním směru pohybu [17].

Délka implantátu ovlivňuje také výsledky úspěšného imediálního zatížení. Bylo publikováno (Misch 1999), že zkrácení cylindrického implantátu o 3 mm zmenšuje plochu o 20-30%. Většina studií se shoduje na tom, že teprve implantáty o délce 10 mm a více dosahují uspokojivých výsledků. Chiapasco et al. (1997) považují za vhodné rozměry implantátu delší než 14 mm včetně a v průměru 4 mm a více [17].

4.3.3 Chirurgické zavedení implantátu

V prvé řadě se jedná o šetrnou techniku zavedení ze strany operátora. Trauma způsobené implantací a přehřátí při preparaci může způsobit osteonekrosu a vést tak k fibrosní enkapsulaci implantátu. Bylo dokázáno, že teplota vyšší než 47°C po dobu 1 minuty způsobí v kosti tepelnou nekrosu [17]. Z vlastností ovlivňujících primární stabilitu implantátu se zdůrazňuje zejména jeho tvar a povrchová úprava [24, 29]. Některé povrchové úpravy (např. oxidování) snižují riziko ztráty stability [21].

Stabilita implantátu se jeví jako velmi důležitý faktor, který je rozhodující při vhojování [15, 17, 34]. Fibrointegrace je typická pro implantáty, které vykazují mikropohyb. Otázkou je, jaký mikropohyb je ještě tolerovatelný a jaký škodlivý pro stabilitu. Mikropohyb mezi 150-500 μm silně narušuje oseointegraci, pohyb o velikosti 50–150 μm se jeví jako kritický. Jako tolerovatelný se tedy hodnotí pohyb do 50 μm [24]. Stejně jako se v parodontologii hodnotí pohyb zubu klinickým vyšetřením, bylo by vhodné hodnotit také primární stabilitu implantátu nějakým neinvazivním testem. Jedním z takových testů je RFA (Resonance Frequency Analysis) založená na teorii, že vlastnosti implantátu na rozhraní s kostí můžeme hodnotit dle toho, jak vibruje, je-li zatížen [34]. RFA technika analyzuje rezonanční frekvenci malým snímačem přiloženým na implantát nebo abutment. Resonanční frekvence je úměrná stabilitě implantátu, čím vyšší hodnoty dosáhneme, tím je implantát stabilnější. Stabilitu tak můžeme měřit ihned po implantaci, ale i během vhojovacího období u klasického two – stage protocolu.

Primární stabilita implantátu je determinována kvalitou a kvantitou kosti, tvarem a délkou implantátu a technikou preparace [15, 35, 36]. Friberg (1999) se domnívá, že v kosti o nižší kvalitě, je třeba předvrtat menší otvor pro implantát, než je pro daný typ implantátu všeobecně doporučováno. Tento krok pomůže zlepšit primární stabilitu implantátu a tím i zlepšit dlouhodobé výsledky [32].

4.3.4 Kvalita a kvantita kosti

Hodnota, která udává kvalitu kosti, je její denzita. Tuto hodnotu přesně zjistíme pouze histomorfometricky. Operátor musí kvalitu kosti zhodnotit

subjektivně během preparace kostního lože. Většina povzbuzujících výsledků u dlouhodobých studií stability implantátů skrývá fakt, že tyto implantáty byly zavedeny právě do kosti výborné kvality [32]. Je totiž známo, že implantace do regionů s nižší kvalitou kosti nedává tak dobré výsledky. Právě tento fakt vedl ke změně povrchových úprav implantátů, které by vedly ke zlepšení osteointegrace v regionech s nižší kvalitou kosti [32].

Nejvíce používaná klasifikace kvality kosti pochází od Leckholma a Zarba (1985), v roce 1990 byla modifikována Mischem. Kvalita se zde hodnotí stupni D1 až D4. Kvalita kosti a tvar čelisti jsou dva nejvíce zmiňované momenty, dojde-li ke ztrátě implantátu [29].

D1 je kost tvořená téměř výhradně kompaktní, tato kvalita však přináší nejvyšší riziko primárního selhání (tepelné poškození, redukované krevní zásobení), ale vhodí-li se implantát, lze jej nejvíce zatížit suprakonstrukcí. Nacházíme ji nejčastěji v dolní frontální krajině při atrofovaném alveolu. Kvalitu D2 reprezentuje silná kompaktní s kvalitní spongiosou. Bývá to nejčastěji v celé dolní čelisti a frontální krajině čelisti horní. Tato kvalita se zdá být ideální pro implantaci. Densita D3, kam nejčastěji patří frontální a laterální část horní čelisti a laterální partie čelisti dolní, reprezentuje tenká kompaktní s kvalitní spongiosou. Zde se doporučuje postupné zatížení implantátu. Poslední jednotkou je kvalita D4 – tenká kompaktní s nekvalitní spongiosou, nejčastěji oblast tuber maxillae. Vhodnost implantace se zde jeví jako sporná [2]. Přímé zatížení je v této oblasti považováno za kontraindikované [29]. Glauser et al. (2001) provedl prospektivní studii přímého zatížení v horní i dolní čelisti v rozdílných typech kvality a kvantity kosti. Zkonstatoval, že přímé zatížení je reálnou možností ošetření v různých oblastech čelisti s výjimkou posteriorní části maxilly [15]. Další jeho

studie ukazuje, že stabilita v kvalitě kosti D3 může být ovlivněna tvarem implantátu a technikou preparace [35]. Randow et al. ve své prospektivní studii u 16 bezzubých dolních čelistí došel k závěru, že Brånemarkovy titanové fixtury implantované do interforaminální oblasti mohou být imediálně zatíženy fixním můstkem [14].

Kvantitu kosti lze rozdělit do pěti stupňů A až F dle Lekholma a Zalba (1985). Třída A je charakteristická zachovalým alveolárním hřebenem. Třída B tvoří alveol s mírnou resorbci, je-li alveol zcela zlikvidován, jedná se třídu C. U třídy D je přítomna počínající resorbce i bazální části alveolárního výběžku a třída E je již extrémní resorbce bazální části [2].

Z uvedeného rozdělení je zřejmé, že denzita kosti bude hrát důležitou roli v úspěšnosti přímého zatížení. Implantace v místě s vyšší denzitou má větší pravděpodobnost primární stability [17, 18]. Celá řada studií o imediálním zatížení implantátu byla limitována právě pouze na implantaci do interforaminální oblasti, tedy do oblasti, kde je kvalita kosti zpravidla nejvyšší [20].

Dle studií je rozhodující, do jak kvalitní kosti je implantováno. Mnoho studií se zabývá implantací do kosti s dobrou denzitou, proto nemůžeme některé výsledky považovat za relevantní. O' Sullivan (2000) zjistil podobnou průměrnou stabilitu implantátu v denzitě D2 a D3 bez ohledu na povrchovou úpravu. Došel také k závěru, že závity u šroubového implantátu mají větší důležitost než povrchová úprava v denzitě kosti D4 [17].

4.3.5 Protetické ošetření

Faktem je, že implantáty vystavené imediátnímu nebo časnému zatížení nejsou v té době ještě osteointegrované, ale jsou drženy v čelistech mechanicky. Avšak zdlahování cestou rigidní suprastruktury vede k řádné osteointegraci fixtury. To dokazují studie autorů Schnitmann et al., Bashi et Wolfinger [14]. Zdlahování minimalizuje mechanický stres vyvíjený na implantát a výrazně zvýší stabilitu protetické konstrukce [24]. Tarnow et al. ve výsledku shrnul, že imediátní zatížení vícečetných implantátů, které jsou rigidně zdlahovány, může být další alternativou ošetření bezzubé čelisti [23].

Dózování sil při funkčním zatížení je jeden ze základních kroků při přímém zatížení implantátu. Sagara et al. (1993) popsal větší úbytek kosti alveolárního výběžku u implantátů přímo zatížených než u klasického two-stage protokolu. Časné zatížení implantátu během vhojovací fáze může interferovat se schopností nahradit nekrotickou kost na rozhraní implantát/kost novotvořenou kostí. Vertikální síly působící během žvýkání jsou považovány za méně škodlivé vzhledem ke stabilitě implantátu než síly šikmé a horizontální, z čehož vyplývá, že u pacientů trpících bruxismem, kde dochází pravidelně k působení těchto rušivých sil, je přímé zatížení považováno za relativně kontraindikované. Při nejmenším je nutné pacienta informovat o možném neúspěchu. V dnešní době však stále neexistuje dostatek studií popisujících úspěch či neúspěch přímého zatížení u pacientů s parafunkcemi [17].

Autoři se shodují, že je-li nasazena provizorní protetická náhrada, neměla by být během vhojovací fáze odstraněna, aby nedošlo k nechtěnému pohybu implantátu [17]. Chow ve své studii zavedl a přímo zatížil 56 Bránemarkových fixtur u 14 pacientů. Nejprve byla nasazena provizorní protetická práce,

podložená desinfikovanou gumou k ochraně rány. Finální protetická práce byla odevzdána u všech pacientů do 8 týdnů po implantaci. Po 12 měsících nedošlo ke ztrátě žádného implantátu, průměrná ztráta kosti alveolárního hřebene byla 0,64 mm [22].

Zatížení, které není aplikováno v podélné ose zubu, je zodpovědné za častější selhání a možné komplikace při vhojování implantátu [37]. Diskutovanou otázkou je, zda se mohou použít volné nepodpořené členy u můstkové konstrukce (cantilever) [17].

Lze shrnout, že u přímého zatížení bychom se měli vyhnout pohybům způsobených náhradou. Pečlivá okluzální analýza a zhodnocení parafunkcí je nutné [17].

Autoři dávají následující podmínky pro úspěšné přímé zatížení implantátu [38]:

- Přímé zatížení můžeme použít u vybraných pacientů, kde můžeme zároveň dosáhnout oboustranné dlahování u min. pěti (dolní čelist) a osmi (horní čelist) implantátů optimálně rozmístěných v čelisti – u zcela bezzubého alveolárního výběžku.
- Délka přímo zatížených implantátů by měla být min. 8,5 mm.
- Pouze implantáty s dobrou primární stabilitou mohou být imediátně zatíženy.
- Pasivně upevněná šroubovaná provizorní náhrada s rigidní kovovou konstrukcí je pravděpodobně tou nejlepší variantou provizorního ošetření.

- Je nutné se zcela vyvarovat volným členům v provizorní protetické práci.
- Provizorní náhrada by neměla být odstraněna po celé vhojovací období (4 měsíce v dolní a 6 měsíců v horní čelisti).

Teoreticky optimalizací kterékoliv výše uvedené podmínky můžeme dospět k lepším klinickým výsledkům [32].

4.4 Indikace přímého zatížení

Technika přímého zatížení se dá teoreticky využít u všech typů indikací implantátu. Mezi hlavní indikace patří ztráta jednoho zubu, velká mezera, zkrácený zubní oblouk a zcela bezzubá čelist [2].

Ztráta jednotlivého zubu se může nahrazovat buď ve viditelné části chrupu, nebo v oblastech laterálních. Zejména v horním frontálním úseku dominují nároky estetické. Anatomické podmínky zde nejsou nejpříznivější, vestibulárně je alveolární výběžek často atrofovaný. Dlouhá osa korunky nebývá často shodná s osou fixtury a riziko selhání implantátu z přetížení je vyšší. Implantaci v místě horních molárů a druhých premolárů většinou brání recessus alveolaris sinus maxillaris. Je třeba využít augmentačních postupů. Tato indikační skupina je relativně nejméně spolehlivá a vždy existuje alternativa klasického protetického řešení [2].

U mezery po ztrátě dvou a více sousedících zubů (long span) můžeme využít můstek kotvený buď jen na samotných implantátech, nebo můstek, který je nesen zuby i implantáty (combination bridge). Zkrácený zubní oblouk patří

k nejčastěji řešeným úkolům implantologa, doplnění oblouku zbaví pacienta snímatelné protézou [2].

Bezzubá čelist skýtá implantologovi asi nejvíce prostoru k uplatnění. Protetické ošetření může být dvojitá - hybridní náhrada nebo fixní můstek [2].

Maló et al. (2000) prezentoval retrospektivní klinickou studii u 94 imediálně zatížených implantátů (Nobel Biocare). Implantáty byly lokalizovány v estetické oblasti obou čelistí v kvalitě kosti D2. Nasazeny byly jednotlivé korunky i krátké můstky. Ztráta kosti po 1 roce činila v průměru 0,9 mm [20].

Rocci et al. (2000) provedli studii imediálního zatížení ve všech oblastech maxilly včetně laterálních úseků v kvalitě kosti D3. Zavedeno bylo 97 Mk IV implantátů Brånemarkova systému u 46 pacientů (38 nekuřáků, 8 kouřilo více než 10 cigaret denně). Devět implantátů u 8 pacientů vykazovalo po 8 týdnech po zatížení pohyb; byla provedena reimplantace s klasickým two-stage protokolem. U pěti pacientů z osmi došlo ke ztrátě 1 zavedeného implantátu. U vícečetných zavedených implantátů dva pacienti ztratili 1 implantát, jeden pacient všechny (v tomto případě 2). Tento pacient měl špatnou kvalitu i kvantitu kosti. Úspěšnost u částečných náhrad byla 94,2% a u rekonstrukce 1 zubu 81,4%. Průměrná ztráta alveolární kosti činila 0,9 mm. Výsledky tedy ukazují, že přímé zatížení je i v této indikaci možností ošetření [20].

Velká studie Brånemark et al. (1999) byla provedena se systémem Brånemark Novum u 50 bezzubých pacientů (průměrný věk 64 let), zavedeno bylo 150 fixtur nejčastěji do kvality kosti D2 a kvantity skupiny B. U 47 z 50 pacientů se implantáty integrovaly úspěšně a můstek byl stabilní. Resorbce alveolární kosti byla po 1 roce 0,9 mm, po 2 letech 1,0 mm [16]. Technika

Brånemark Novum má však svá určitá omezení. Anatomie kosti musí korespondovat s prefabrikovanými komponentami, možnost vytvořit individuálně tvarovanou nosnou konstrukci a pak finální můstek je omezená, v některých případech je nutné extenzivní rozšíření marginální části dolní čelisti [39]. Podobnou studii s touto technikou provedl Hatano a stejně jako Brånemark et al. zkonstatoval, že k selhání implantátu dochází během několika prvních měsíců. Toto období lze tedy považovat za nejvíce kritické vzhledem ke ztrátě implantátu [39].

4.5 Kontraindikace přímého zatížení

Nejdříve musíme vzít v úvahu kontraindikace, která brání implantaci obecně (viz výše), zde nepřichází přímé zatížení v úvahu.

U přímého zatížení bychom dále měli zvažovat, jaký druh implantátu užitíme a do jak kvalitní kosti budeme implantovat. Jak již bylo zmíněno výše, hladký povrch implantátu se kvůli možným mikropohybům jeví jako kontraindikovaný [17]. Implantace v posteriorní části maxilly je diskutabilní otázkou u implantace klasickým Brånemarkovým způsobem, přímé zatížení zde je odmítáno všeobecně [15].

4.6 Pulzní laserová depozice

Pulzní laserová depozice (PLD) používá laser pro ablaci materiálu z terče, přičemž páry materiálu kondenzují na podložce a vzniká tenká vrstva, která je téměř shodná s materiálem terče. Dříve se pro depozici využívaly kontinuální i impulsní lasery, dnes se setkáváme především s impulsními lasery, u nichž je

možné dosáhnout většího gradientu teploty v materiálu terče, a tím zlepšit stechiometrický přenos materiálu. Metodou pulzní laserové depozice je možné nanášet řadu různých materiálů, např. vysoce kvalitní tenké vrstvy kovů, polovodičů a izolantů pro ochrany pokrytí, vrstvy pro optické aplikace, dielektrické, feroelektrické, nelineárně optické, piezoelektrické, supravodivé, magnetické, magnetooptické, fotovoltaické a polovodičové komponenty, složité multivrstvy, vrstvy s nerovnovážnými fázemi, stejně tak i tenké vrstvy organických materiálů.

Vlastnosti deponovaných vrstev jsou ovlivněny následujícími depozičními parametry – vlnová délka, délka pulsu a frekvence pulsů laseru, dále hustota výkonu a velikost stopy laserového svazku, materiálové vlastnosti terče, prostředí v depoziční komoře, vzdálenost substrátu od terče, parametry substrátu a depoziční rychlost. Jednotlivé parametry ovlivňují různé vlastnosti a naopak jednotlivé vlastnosti jsou ovlivňovány různými parametry, proto je třeba najít optimální nastavení parametrů v závislosti na požadovaných vlastnostech.

Hlavní výhodou pulzní laserové depozice je jednoduchost a vysoká univerzálnost metody. Libovolný materiál lze stechiometricky přenést z terče na podložku, rychlost depozice je vysoká. Metoda umožňuje epitaxní růst vrstvy, do vrstvy je možné přenést i stopové prvky či dopanty. Depoziční proces je velmi čistý.

Na druhé straně se mezi nevýhody PLD řadí tvorba kapiček na povrchu vrstvy a nemožnost homogenního pokrytí velkých ploch. Problémy této metody jsou neustále zkoumány, a proto je již dnes možné například zlepšit povrchovou strukturu vrstvy optimalizací depozičních parametrů.

4.7 Adheze buněk

Adheze buněk k substrátu je prvním krokem v procesu interakce mezi buňkou a povrchem a ovlivňuje buněčnou a tkáňovou odpověď.

V případě dentálních implantátů interakce mezi formujícími se osteoblasty a substrátem ovlivní rozhraní kost/implantát a tím ve výsledku determinuje dlouhodobou stabilitu implantátu. In vitro studie prokazují, že osteomorfogeneze je úzce spjata s chováním buněk (adheze, proliferace) a že depozice kosti přímo na implantátu se děje pouze na povrchu, který není cytotoxický [11].

Adheze buněk k biomateriálu je dynamický proces, který se dá studovat různými metodami. Po odvolnění buněk z materiálu se dají buňky počítat v Bürkerově komůrce, či pomocí spektrofotometru nebo scintilátoru. Dalším způsobem je scanovací mikroskop [40].

Fenomén adheze buněk, zejména adheze k danému substrátu, byl a je předmětem zájmu buněčných biologů po mnoho let. Regulace buněčné adheze je základním faktorem v mnoha procesech jako např. v embryonálním vývoji, imunitní odpovědi, ale i při obnově a hojení tkání a ran [13]. Mechanismus vývoje daných buněk závisí nejen na chemickém složení média, ve kterém buňky kultivujeme, ale také na všech rozhraních, která jsou v bezprostředním okolí buňky. Jestliže buňka proliferuje na jednom povrchu, nemusí tomu tak být u povrchu odlišného. Jestliže pak buňka není schopná proliferace a nemůže se pohybovat, nebude potom i v některých případech se schopná dělit [41].

V somatických buňkách, stejně tak i v buněčných kulturách, zamezí dané buňce v pohybu kontakt s buňkou jinou – tzv. fenomén kontaktní inhibice. Mechanismus kontaktu buňky s jinými, stejně tak jako adheze na nějaký povrch je však děj velmi komplexní.

Jestliže vložíme cizí materiál do těla, reagují buňky tkání zcela odlišně než na materiál, který je tělu vlastní. Je to dáno tím, že jeho chemické i fyzikální vlastnosti jsou zcela odlišné od buněk tkání [41]. Jak již bylo zmíněno výše, procesy po zavedení implantátu do těla jsou podobné hojení rány. V podmínkách in vivo jsou prvními buňkami, které doputují k místu implantace, osteoblasty a mezenchymální buňky, které mají schopnost se nediferencovat v buňky produkující kostní tkáň [42]. Mezenchymální buňky a fibroblasty mají mnoho společných znaků, přestože nerepresentují stejný buněčný typ. Přesto fibroblastoidní buňky se zdají být prvními buňkami, které dorazí k implantátu a jsou schopny produkovat extracelulární matrix.

4.8 Extracelulární matrix

Extracelulární matrix se skládá z makromolekul, které jsou vylučovány buňkami do jejich nejbližšího okolí. Tyto makromolekuly pak tvoří spojovací oblast mezi buňkami. Tato hmota je tvořena zejména z kolagenu, proteoglykanů a množství glykoproteinových molekul jako jsou fibronectin a laminin. Tyto objemné glykoproteiny jsou zodpovědné za formování matrix a vlastních buněk do uspořádaných struktur.

Extracelulární matrix je důležitá při tvorbě tkání, kdy adheze musí být velmi silná, dále hraje významnou roli při migraci buněk, často též slouží i jako podklad, ke kterému mohou buňky dobře adherovat, dále napomáhá směru pohybu buněk atd. [43]. Extracelulární matrix má mnoho funkcí, a to jednak při tvorbě tkání, kdy slouží jako podklad, ke kterému mohou buňky adherovat; zároveň hraje významnou roli při migraci buněk, kde může určovat směr pohybu [43].

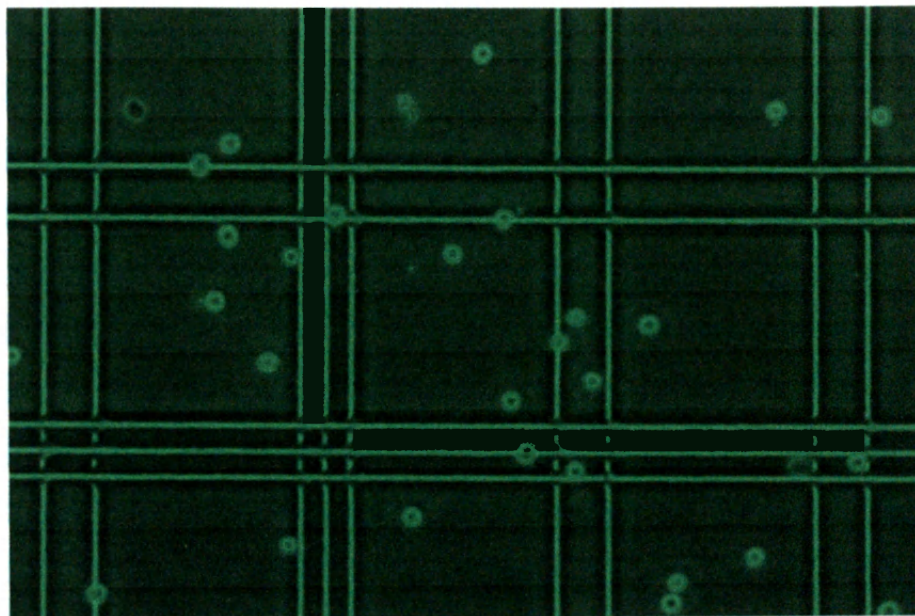
Fibronectin je multifunkční proteinová struktura, která se nachází v různých částech organismu. Jedná se velký (460 kDa) glykoproteinový dimer syntetizovaný různými buňkami, který je schopný se vázat díky své Arg-Gly-Asp sekvenci k dalším strukturám [27]. K jedné z jeho funkcí patří to, že slouží jako základní adhezivní molekula, pojí buňky k sobě navzájem a i k podkladu. Má několik odlišných vazebných míst a právě jejich interakce s odpovídajícími molekulami vyústí ve vlastní připojení se buňky k extracelulární matrix [43].

5. MATERIÁL A METODY

5.1 Test cytotoxicity

Test cytotoxicity se využívá při posuzování biokompatibility materiálu. Rozlišujeme dva testy cytotoxicity, test přímý a nepřímý. V přímém testu jsou buňky kultivovány v přítomnosti zkoumaného materiálu. U nepřímého testu se materiál vylouhuje do kultivačního média a dané buňky se kultivují ve vzniklém fluátu. V našem hodnocení jsme použili přímý test cytotoxicity.

Základní metodou sledování proliferační aktivity dané buněčné populace je stanovení počtu buněk. Počítání buněk se provádí např. v Bürkerově komůrce. Jedná se o mřížku ve skle, tvořenou vrypy s přesně definovaným objemem. Buněčná suspenze se nanese mezi mřížku a krycí sklo a buňky v jednotlivých polích se počítají pod optickým mikroskopem (Obr. 1).



Obr. 1 Bürkerova komůrka se suspenzí 3T3 myších fibroblastů, sledováno v inverzním světelném mikroskopu Olympus (Olympus, Japonsko), zvětšeno 100krát.

Zkoumaným vzorkem byl titanový terčík o průměru 10 mm a celkové tloušťce 2 mm Ti6Al4V slitiny povlečený laserově nanesenou tenkou vrstvou

krystalického hydroxyapatitu o tloušťce 6-12 μm s mezivrstvou ZrO_2 o tloušťce 100 nm (Obr. 2).



Obr. 2 Testovaný vzorek konstruktů pro implantát – titanová slitina laserově povlečená hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu.

Vzorky vznikly metodou pulsní laserové depozice. Zirkonové vrstvy jsme připravili excimerovým KrF laserem (LUMONICS PM 842, Kanada) generujícím na vlnové délce 248 nm, při opakovací frekvenci 10 Hz a výstupní energii 450 mJ. Depozice zirkonu probíhaly při teplotě 20 °C. Před depozicí byly vzorky očištěny v acetonu, toluenu a etylalkoholu. Tloušťka této vrstvy činila 100 nm (4000 laserových pulsů).

V dalším kroku jsme deponovali HA vrstvy na titanovou slitinu pokrytou vrstvou oxidu zirkoničitého. HA vrstvy jsme vytvořili ArF laserem při teplotě 600 °C. Před vlastní depozicí jsme vyčerpali z komory vzduch a vytvořili jsme tak podtlak v hodnotách 10^{-3} Pa a následně jsme promísili atmosféru z vodních par a argonu, která dosahovala tlaku 50 Pa. Soubor vzorků jsme deponovali při frekvenci 50 Hz, výstupní energii 300 a 330 mJ a hustotě energie 6 Jcm^{-2} .

Pozitivní kontrolou byly terčíky z keramiky Nori Take. Negativní kontrolu tvořily vzorky cytotoxické červené pryže (Vegum, Gumárne Dolné Vestenice),

která se používá v laboratoři, a terčíky z pryskyřice Superpont C+B, vyrobené s přebytkem monomeru v poměru 3 g prášku a 5 ml tekutiny proti obvyklému stavu 1:1.

Ve všech případech jsme provedli kultivaci stejného počtu buněk bez přítomnosti jakéhokoliv materiálu, a k tomuto počtu byly pak vztaženy počty buněk kultivovaných v přítomnosti terčků. Použili jsme dva typy buněk: myší liniové fibroblasty (3T3) a lidské fibroblasty (LF) získané ze zbytkové kůže lidských dárců.

Do 6-jamkových kultivačních desek s průměrem jamky 3,5 cm (NUNC, Roskilde, Dánsko) jsme nasadili 25 000 buněk resuspendovaných ve 3 ml média do každé jamky.

Bylo použito kultivační médium vhodné pro pěstování fibroblastů H-MEMd (minimal essential medium) (Výrobna médií ÚMG AVČR, Praha, ČR) s přidavkem antibiotik – gentamycinu ve výsledné koncentraci v médiu 10 µg/ml a penicilinu ve výsledné koncentraci 200 U/ml, dále glutaminu (Sevapharma Praha) v koncentraci 0,3 mg/ml a 10% bovinního séra (ZVOS Hustopeče, ČR).

Buňky jsme kultivovali v inkubátoru při 37°C za tenze CO₂ 3,3% a 100% vlhkosti. Po 24 hodinové kultivaci jsme vložili do příslušných jamek vysterylizované terčíky z povlakovaného titanu, keramiky (Nori Take), polymethylmetakrylátu a červené pryže. Třetí a čtvrtý den jsme přidávali vždy 1,5 ml čistého média. Staré médium jsme neodstraňovali. Pátý den byl pokus ukončen. Buňky byly ode dna uvolněny směsí 0,25% roztoku trypsinu (SIGMA, USA) a 0,02% roztoku EDTA (Výrobna médií ÚMG AVČR, Praha, ČR) v poměru 1:1 a nesuspendovány ve 3 ml média. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce (Obr. 1).

5.2 Barvení buněk

Růst buněk, jejich hustotu i morfologii jsme v průběhu kultivací kontrolovali mikroskopicky, prohlížením v inverzním mikroskopu (Olympus, Japonsko). Pro lepší vyhodnocení jsme některé buněčné porosty po ukončení kultivace a fixaci metanolem obarvili činidly May Grünwald a Giemsa Romanowski.

5.3 Test adheze

Adheze buněk k cizímu povrchu má zásadní vliv na buněčnou integraci implantátu. Po sterilizaci terčků byly vzorky umístěny do jamek 24-jamkové kultivační desky NUNC s průměrem jedné jamky 16 mm. Ke každému terčku bylo nasazeno 100 000 lidských fibroblastů (osmá pasáž) získaných z lidské dermis. Tyto buňky byly resuspendovány v 1 ml kultivačního média H-MEMd.

Buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin v inkubátoru při 37°C, 3,3% tenzi CO₂ a 100% vlhkosti. Po 24 hodinách byl terč přenesen do nové jamky a buňky byly odvolněny z jeho povrchu směsí 0,25% trypsinu (SIGMA, Praha, ČR) a 0,02% EDTA v poměru 1:1. Zvlášť byly odvolněny zbytkové buňky na dně kultivační jamky. Trypsinizace proběhla v inkubátoru při 37°C po dobu 10 minut. Buňky byly počítány v optickém mikroskopu v Bürkerově komůrce – obr. 1, zvlášť počet buněk adherovaných na samotný povrch terčku a dále okolí terčku v jamce. Jako kontroly byly zvoleny jamky bez nasazených terčků s identickým počtem buněk na jednu jamku.

5.4 Test proliferace

Terčíky byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím testu. V laminárním boxu byly sterilně přeneseny povlakované titanové terčíky do jamek 24-jamkové kultivační desky a k nim nasazeny taktéž lidské fibroblasty (osmá pasáž), ale v počtu 20 000 buněk v 1 ml suspenze kultivačního média. Jako kontroly byly zvoleny opět jamky bez terčků se stejným počtem buněk v suspenzi.

Kultivace buněk proběhla po dobu 96 hodin v inkubátoru při 37°C , tenzi CO₂ 3,3% a 100% vlhkosti, kdy bylo po 48 a 72 hodinách vyměněno zmetabolizované H-MEMd kultivační médium za čerstvé. Čtvrtý den byl ukončen test proliferace stejným způsobem jako předešlý test adheze. Počty buněk proliferujících na terčku, v okolí terčku v jamce a v kontrolních jamkách byly spočítány v Bürkerově komůrce v optickém mikroskopu.

Po 72 hodinách kultivace byly vybrány 2 vzorky k později prováděnému imunohistochemickému vyšetření. Tyto terčíky byly třikrát opláchnuty PBS, usušeny v laminárním boxu a zmrazeny na -24°C.

5.5 Průkaz exprese fibronektinu

U vzorků kolonizovaných fibroblasty byla po 72 hodinách studována exprese fibronektinu pomocí monoklonální protilátky (Sigma-Aldrich, Praha) ředěné podle pokynů dodavatele. Jako protilátka druhého kroku byly použity prasečí proti myší imunoglobuliny značené FITC (SwAM-FITC, AlSeVa, Praha). Kontrola specifity reakce byla provedena pomocí typově shodné protilátky proti cytokeratinům, které se normálně ve fibroblastech nevyskytují. Vzorky byly

montovány do media Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), které zabraňuje vysvícení signálu při ozáření UV světlem. K detekci imunohistochemické reakce byl použit fluorescenční mikroskop Optiphot-2 (Nikon, Praha, ČR) vybavený CCD kamerou (Cohu) a analyzátozem obrazu LUCIA (Laboratory Imaging, Praha, ČR).

5.6 Test proliferace, MTT

Buněčnou proliferaci na povrchu vzorků jsme stanovovali počítáním buněk a pomocí MTT testu, jehož hodnota je úměrná nejen počtu buněk, ale i jejich metabolické aktivitě. V tomto případě jsme použili buněčnou linii lidských embryonálních plicních fibroblastů (LEP₁₉) (Sevapharma, Česká republika).

MTT test patří mezi nejběžnější fotometrické metody sledování proliferace. Metoda se zakládá na přeměně žlutě zbarveného MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) mitochondriálními enzymy živých buněk na intenzivně modrofialovou sraženinu (tetrazoliová sůl). Čím větší je počet živých buněk, tím větší množství modrofialového produktu vzniká. Závislost je v určitém rozmezí zcela lineární.

Testovali jsme tři typy vzorků (terče o průměru cca 10 mm a výšce 2 mm): titanovou slitinu Ti6Al4V, titanovou slitinu povlečenou zirkonem a titanovou slitinu povlečenou hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu. Sterilní vzorky jsme umístili do 24-jamkové desky. Do každé jamky jsme nasadili fibroblasty o hustotě 22 000 buněk/cm², a to v celkovém objemu 1 ml kultivačního média (EPL - Sevapharma, Česká republika). Každý vzorek měl svoji kontrolu – tkáňově upravený polystyren bez přítomnosti jakéhokoliv vzorku. Kultivace probíhala po 120 hod při teplotě 37°C, 5% CO₂ a 100% vlhkosti. Po 48 hod bylo médium

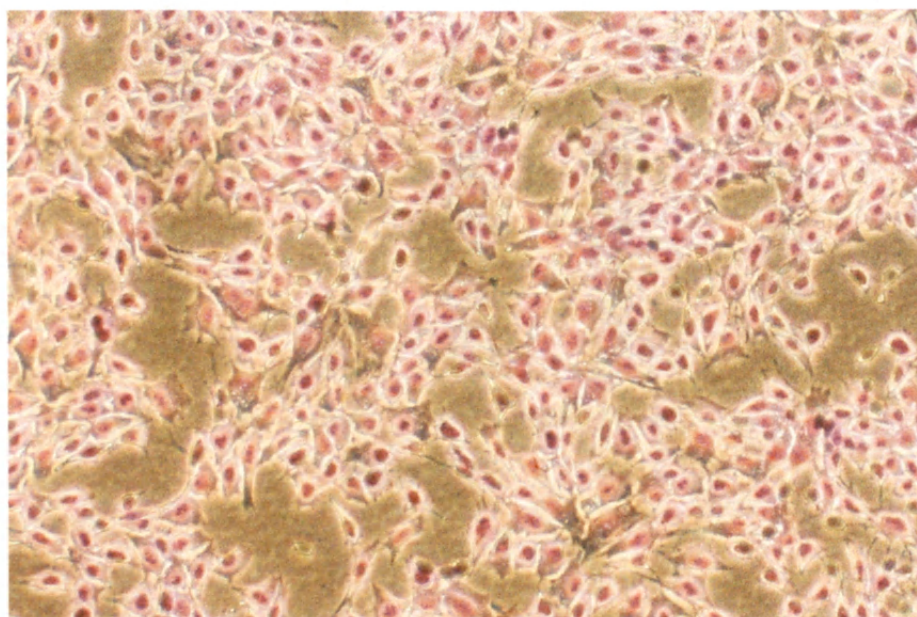
vyměněno. Pátý den jsme buňky z povrchu vzorků sklídili pomocí 0,15% trypsinu. Fibroblasty jsme počítali v Bürkerově komůrce pomocí optického mikroskopu (Nikon, Japonsko). Metabolickou aktivitu jsme prokázali pomocí MTT testu. Odstranili jsme kultivační médium a do každé jamky jsme přidali 1 ml 2 mM roztoku MTT (SIGMA, Praha, Česká republika) v bezsérovém médiu H-MEM. Buňky jsme takto kultivovali 2 hodiny při 37°C a 5% CO₂. Poté jsme vzorky přenesli do nových jamek a vytvořený modrý precipitát jsme rozpustili v 1,2 ml isopropylalkoholu. V kontrolních jamkách jsme odstranili roztok MTT a přidali stejný objem isopropylalkoholu. Pomocí přístroje EL 800 Universal Microplate Reader (Bio-tek instruments, INC Highland Park, USA) při vlnové délce 570 nm jsme proměřili absorbanci vytvořeného modrého roztoku.

Všechny výsledky jsme statisticky zpracovali pomocí Studentova t-testu v hladině pravděpodobnosti 0,05.

6. V Ý S L E D K Y

6.1 Test cytotoxicity

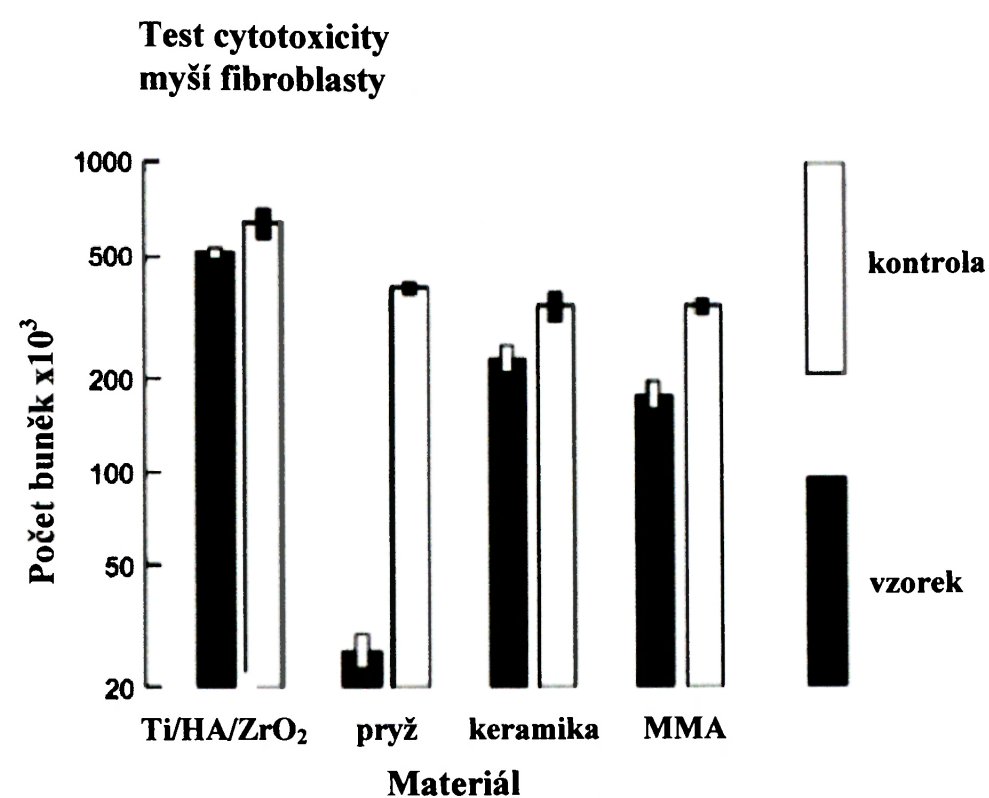
Cílem přímého testu cytotoxicity bylo zjistit, zda model implantátu z titanové slitiny povlečený hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu není cytotoxický. K tomuto účelu bylo použito myších a lidských fibroblastů, neboť ze studií je patrné, že osteoblastům podobné buňky a další buňky, které potřebují pevný podklad pro svůj růst, jako např. fibroblasty, vykazují podobné chování [29]. Počítání buněk proběhlo pod optickým mikroskopem v Bürkerově komůrce (Obr. 1). Nezměněná morfologie lidských fibroblastů po obarvení činidly May Grünwald a Giemsa Romanowski je patrná z obrázku 3.



Obr. 3 Morfologie buněk. Lidské fibroblasty (barveno May Grünwald a Giemsa Romanowski) v bezprostředním okolí modelu implantátu z titanové slitiny s laserově deponovaným hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu (zvětšeno 100krát).

Nejlépeších výsledků dosahuje kultivace buněk, ať myších nebo lidských, v přítomnosti terčků z titanu modifikovaných hydroxyapatitem a mezivrstvou zirkonu. Dle předpokladů je dalším potenciálně inertním materiálem i keramika.

Červená pryž je cytotoxická a z kultivace pryskyřičných terčů s nadbytkem monomeru můžeme potvrdit obecně známou skutečnost, že monomer působí cytotoxicky a snižuje počet kultivovaných buněk (Obr. 4, 5). Tabulky 1, 2 a 3 ukazují výsledky po statistickém zpracování. Symbol * značí statisticky významnou závislost.



Obr. 4 Test cytotoxicity – myší fibroblasty. Byl srovnáván počet myších fibroblastů s (černé sloupce) a bez (bílé sloupce) přítomnosti daných vzorků. MMA – zkratka pro methylmetakrylát.

Logaritmická transformace $y = \log_{10}(x + 10^3)$ pro statistické zpracování hodnot. Studentův t-test v hladině pravděpodobnosti 0,05 byl využit ke zhodnocení statistické významnosti jednotlivých materiálů.

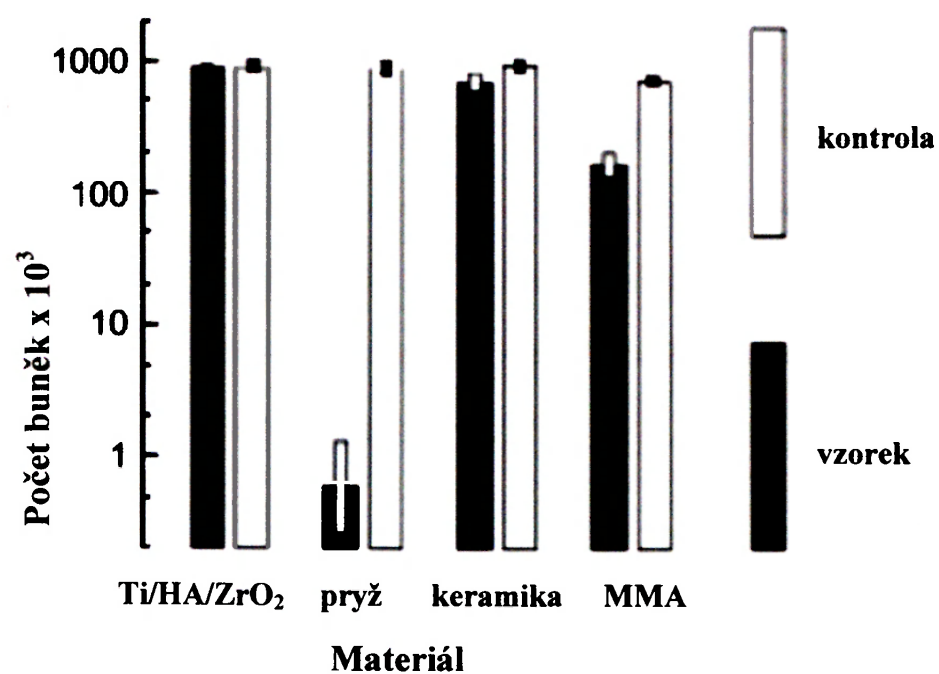
	Ti/HA/ZrO ₂	pryž	keramika	MMA
Ti/HA/ZrO ₂	Ti/HA/ZrO ₂	*	*	*
pryž	*	pryž		*
keramika	*		keramika	
MMA	*	*		MMA

Tab. 1 Test cytotoxicity – myší fibroblasty, vzájemné porovnání jednotlivých typů vzorků vůči sobě. * značí rozdíly statisticky významné. Prázdná pole – nebyla zjištěna statisticky významná závislost.

	Ti/HA/ZrO ₂	pryž	keramika	MMA
Ti/HA/ZrO ₂	Ti/HA/ZrO ₂		*	*
pryž		pryž		
keramika	*		keramika	
MMA	*			MMA

Tab. 2 Test cytotoxicity – myší fibroblasty, porovnání jednotlivých typů vzorků vůči kontrole. * značí rozdíly statisticky významné. Prázdná pole – nebyla zjištěna statisticky významná závislost.

**Test cytotoxicity
lidské fibroblasty**

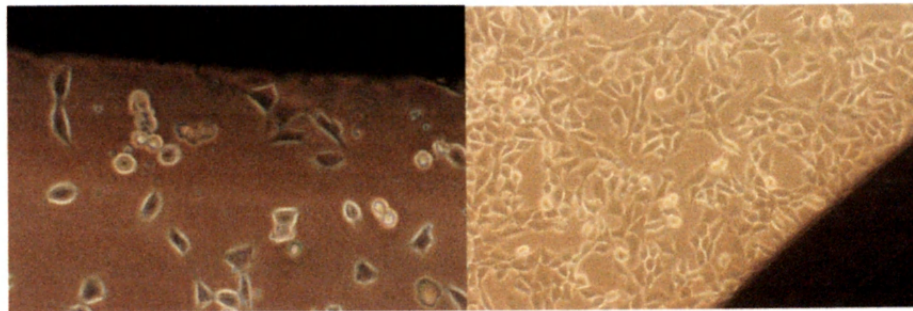


Obr. 5 Test cytotoxicity – lidské fibroblasty. Byl srovnáván počet myších fibroblastů s (černé sloupce) a bez (bílé sloupce) přítomnosti daných vzorků. MMA – zkratka pro methylmetakrylát.

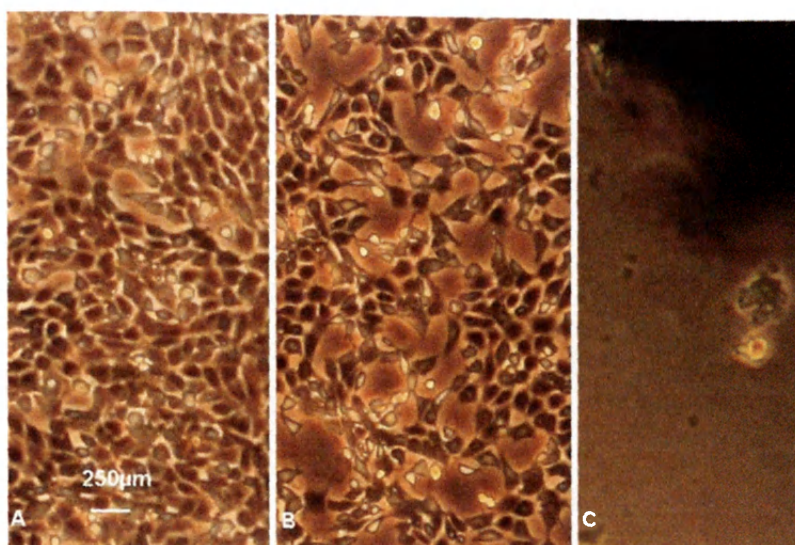
	Ti/HA/ZrO ₂	pryž	keramika	MMA
Ti/HA/ZrO ₂	Ti/HA/ZrO ₂	*		*
pryž	*	pryž	*	*
keramika		*	keramika	*
MMA	*	*	*	MMA

Tab. 3 Test cytotoxicity – lidské fibroblasty, vzájemné porovnání jednotlivých typů vzorků vůči sobě. * značí rozdíly statisticky významné. Prázdná pole – nebyla zjištěna statisticky významná závislost.

Vycházeli jsme ze situace, kdy buňky byly po 24 hodinové kultivaci již adherované a poté k nim byly přidány terčíky. Po vložení terčíků z povlakovaného titanu (Obr. 6, 7a) a keramiky (Obr. 7b) nedošlo ke změně morfologie kultivovaných buněk, a to ani v bezprostředním okolí vzorků. Fibroblasty i nadále proliferovaly a vytvořily subkonfluentní až konfluentní porost – později sledováno pomocí imunohistochemického barvení. Zcela změněnou morfologii myších fibroblastů jsme pozorovali u vzorků z červené pryže, kdy se adherované buňky v důsledku přítomnosti cytotoxického materiálu nejen nedělily, ale apopticky hynuly a odlučovaly se do média (Obr. 6, 7c).

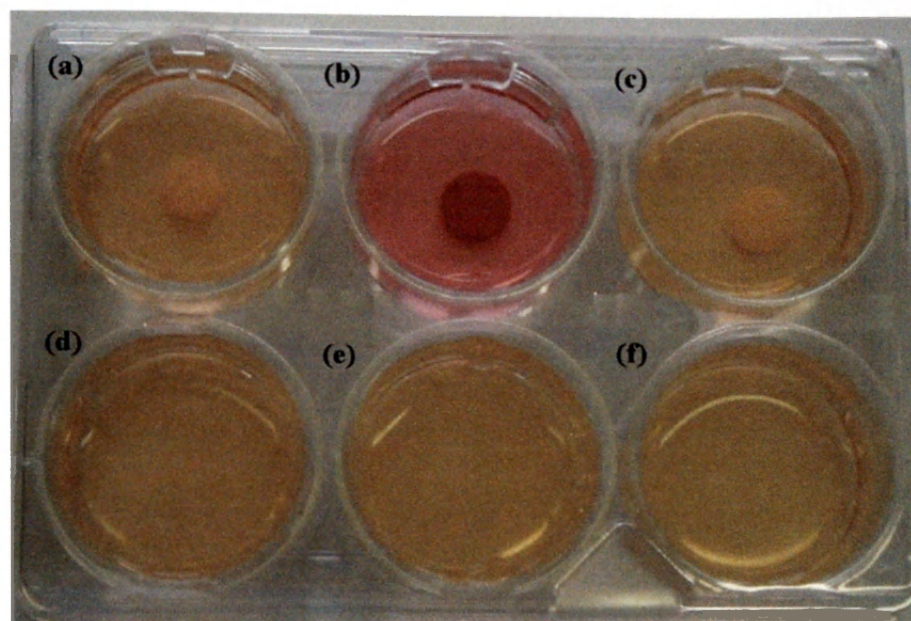


Obr. 6 Vlevo - Myší fibroblasty u kraje vzorku z červené pryže (zvětšeno 40krát). Změněná morfologie adherovaných myších fibroblastů; buňky jsou daleko méně rozprostřené. Vidíme zakulacené odloučené buňky volně plavající v médiu. Vpravo – nezměněná morfologie fibroblastů v bezprostředním okolí Ti/HA/ZrO₂ vzorku (zvětšeno 20krát). Kultivováno po dobu 72 hodin.



Obr. 7 Morfologie buněk. Lidské fibroblasty v bezprostředním okolí titanového terčíku povlečeného hydroxyapatitem (a) a terčíku z keramiky (b) nevykazují žádné změny morfologie. U vzorku pryže (c) mají buňky v okolí nejen změněnou morfologii, ale umírají a odlučují se ode dna kultivační jamky (zvětšeno 100krát).

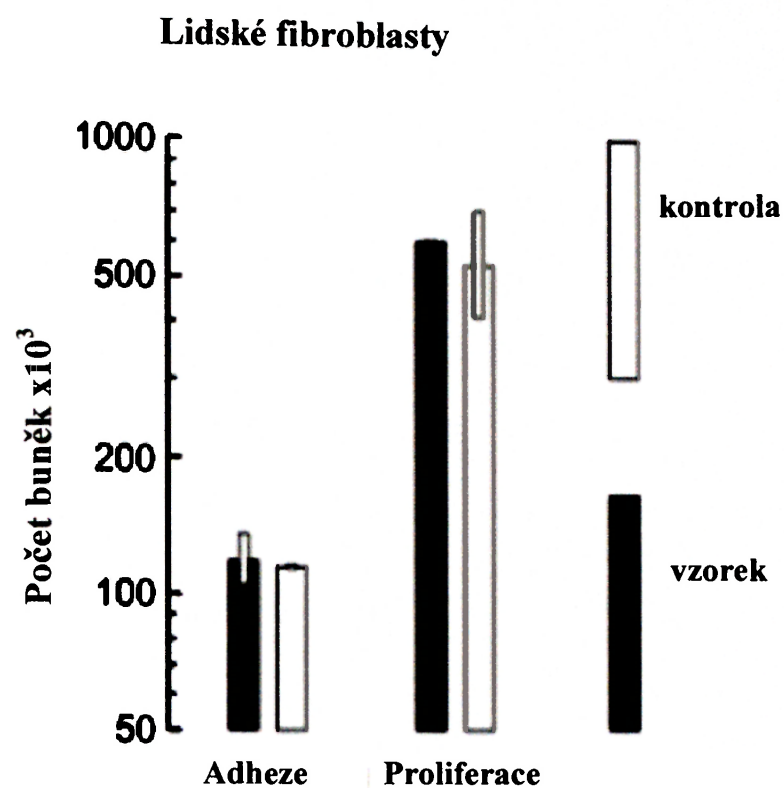
Růst buněk v přítomnosti jednotlivých terčků bylo možno kontrolovat i makroskopicky změnou barvy kultivačního média. Velký počet buněk s velkou metabolickou aktivitou znamená větší produkci oxidu uhličitého, což s sebou přináší pokles pH média. Tam, kde byl velký počet buněk se původně jasně červené médium (indikátor metylenová červeň; přechod červená – žlutá) změnilo na barvu oranžovou až žlutou. V jamkách, kde jsme kultivovali terčíky z červené pryže a kde bylo velmi málo buněk, médium zůstalo načervenalé (Obr. 8).



Obr. 8 Barevná změna média z červené na žlutou při změně pH (indikátor metylenová červeně) metabolizujících buněk u vzorků keramiky (a), červené pryže (b), methylmetakrylátu (c) a v kontrolních jamkách (d, e, f).

5.2 Test adheze a proliferace

Jak test adheze, tak test proliferace fibroblastů patří mezi testy charakterizující kvalitu povrchu. U testu adheze jsme použili koncentraci buněk 50 000 buněk/cm², u testu proliferace pak koncentraci 10 000 buněk/cm². Počet buněk sklizených z povrchu terčů byl srovnán z počtem buněk vyrostlých na tkáňově upraveném polystyrenu vztažených na jednotku plochy. Výsledky jsme statisticky zpracovali pomocí Studentova t-testu na hladině pravděpodobnosti 0,05 (Obr. 9).

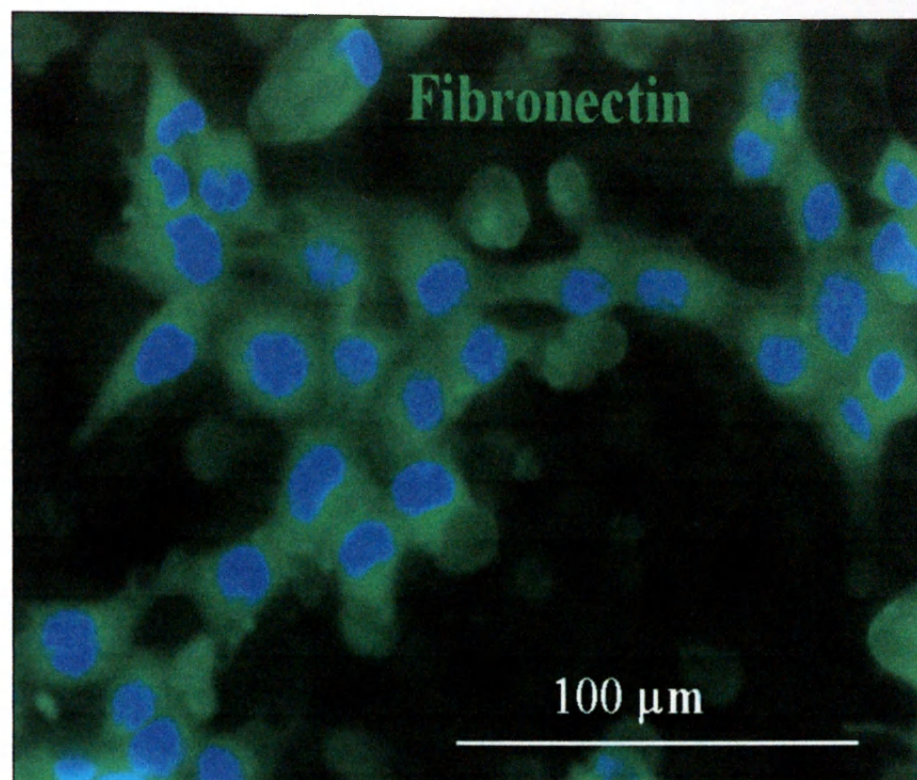


Obr. 9 Adheze a proliferace lidských fibroblastů na povrchu modifikovaného titanu (černé sloupce) ve srovnání s tkáňově upraveným polystyrenem (bílé sloupce).

5.3 Průkaz exprese fibronektinu

Jelikož jsou dané terčíky nepropustné pro světlo, nemůže růst buněk na povrchu terčů pozorovat při kultivaci pod optickým mikroskopem. Použití imunohistochemických metod nám dovolí vizualizovat růst buněk na povrchu zkoumaných vzorků.

Fibroblasty kultivované po dobu 72 hodin byly rovnoměrně po podkladu rozprostřeny a tvořily subkonfluentní porost. Buňky exprimovaly fibronektin do cytoplazmy. Extracelulární produkce nebyla po této době kultivace pozorována, jak je zřejmé z obrázku 10.

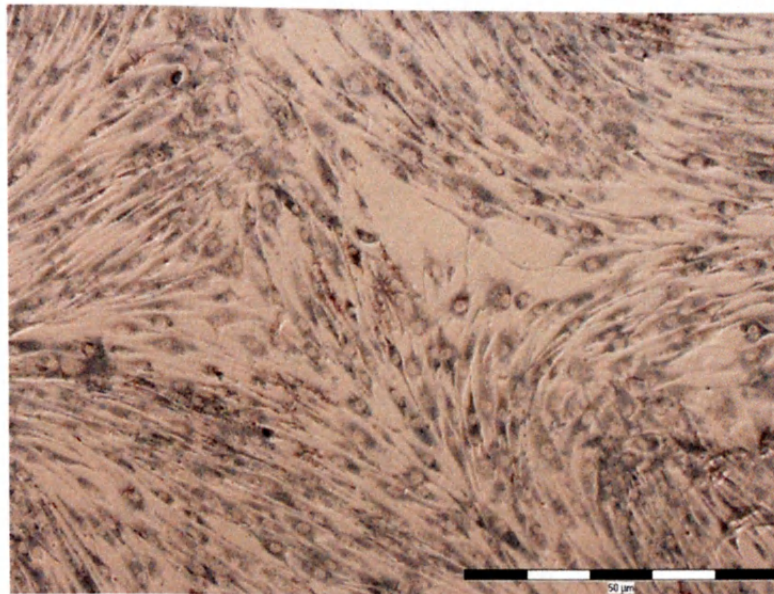


Obr. 10 Přítomnost fibronektinu (zelený signál) v cytoplazmě lidských fibroblastů na povrchu titanové slitiny se sendvičově naneseným hydroxyapatitem a zirkonem. Modře jsou znázorněna jádra fibroblastů po barvení DAPI.

5.4 Proliferace LEP₁₉, MTT

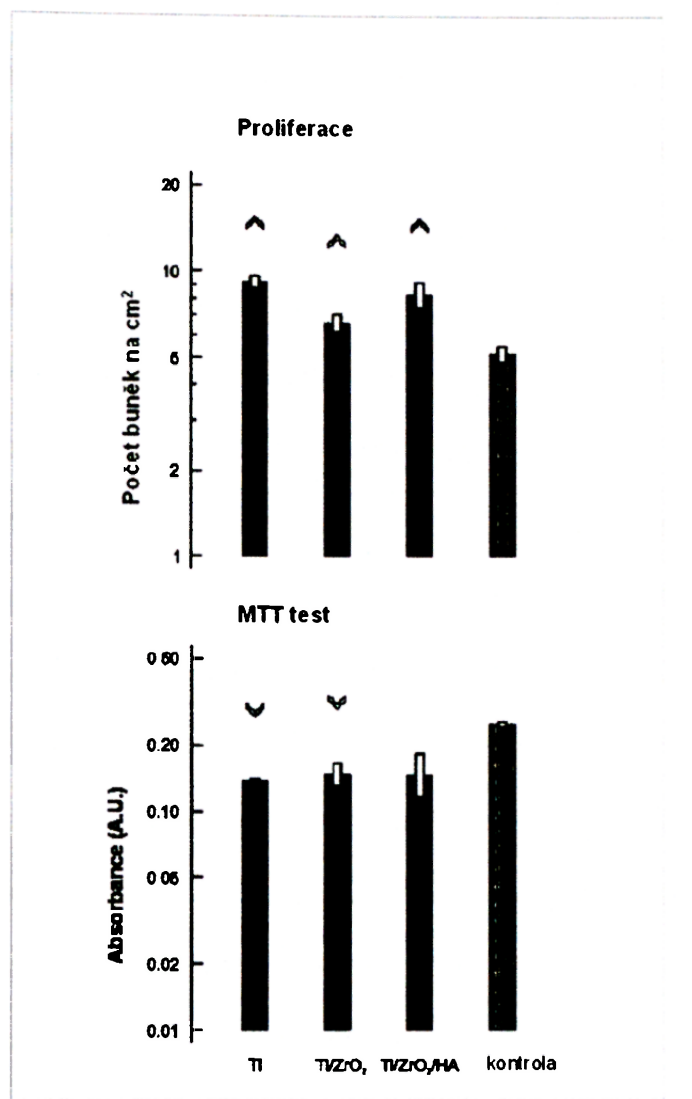
V této druhé sérii pokusů, kde byly požitý tři typy vzorků: titanová slitina Ti6Al4V, titanová slitina povlečená zirkonem a titanová slitina povlečená hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu jsme ke kultivaci použili lidské embryonální plicní fibroblasty.

Námi použité fibroblasty byly schopné růst v přítomnosti testovaných vzorků. Morfologie i proliferační schopnost byla srovnatelná s kontrolním povrchem tkáňově upraveného polystyrenu (Obr. 11). Žádný z testovaných materiálů nebyl cytotoxický a umožňoval růst buněk. Buňky adherovaly k povrchu vzorků a byly schopné na površích proliferovaly .



Obr. 11 Porost buněk LEP₁₉ v blízkém okolí terče se sendvičovým uspořádáním vrstev zvýrazněný při MTT testu. V průběhu MTT testu se vytváří v cytoplasmě buněk modrá sraženina formazan.

Počet buněk vyrostlých na povrchu zkoumaných vzorků byl statisticky vyšší než na kontrolním povrchu (Obr. 12). Na druhé straně jsme zjistili vyšší metabolickou aktivitu buněk na tkáňově upraveném polystyrenu, který je brán jako optimální materiál pro kultivaci buněk (Obr. 12). Největší metabolické aktivity rámci třech typů testovaných vzorků jsme však dosáhli u vzorků povlečených HA s mezivrstvou zirkonu, ačkoli absolutní počet buněk byl nižší.



Obr. 12 Proliferace buněk na povrchu terče – počet buněk a MTT po statistickém zpracování pomocí Studentova t-testu na hladině pravděpodobnosti 0,05. Znaménko ^ značí, že daný počet buněk je statisticky vyšší než kontrola, naopak v značí, že v těchto případech je MTT statisticky nižší než kontrola (tkáňově upravený polystyren).

7. DISKUZE

O čem se někdy velmi málo hovoří je skutečnost, že fyzikální vlastnosti daného povrchu jsou mnohdy více důležité než samotné chemické složení materiálu, a to hlavně z hlediska přilnavosti buněk [13, 40]. Design implantátu s povrchem podobným fyziologickému složení kosti nepochybně napomáhá novotvorbě kosti na rozhraní tkáně a vlastního biomateriálu [27].

Aby mohl implantát dobře splnit svoji funkci, musí být organismem dokonale akceptován [44]. Tato vlastnost může být právě zlepšena povlakem, který bude v kontaktu s vlastní tkání [44]. Je několik důvodů, proč je k povlakování používán právě hydroxyapatit. Krystaly hydroxyapatitu jsou velmi křehké a proto tedy nelze tuto sloučeninu využít k výrobě samotného implantátu. Významnou vlastností je však biokompatibilita, neboť hydroxyapatit je integrální součástí kostní tkáně. Kalciumfosfátové povlaky zvyšují sorpci proteinů na povrch a umožňují tak aktivaci krevních destiček a vazbu fibrinu, což urychluje hojení [23]. Z již publikovaných studií vyplynulo, že hydroxyapatitový povlak na kovovém implantátu urychlí rehabilitaci pacienta možností včasného odevzdání finální protetické práce [30, 45], neboť takový implantát se rychleji oseointegruje, usnadňuje adhezi kostní hmoty a tím umožňuje přímý kontakt s kostí ve srovnání s nepovlakovanými implantáty [46].

K povlakování implantátů je možno využívat i jiných chemických látek jako např. beta-tricalciumfosfát, či keramiku upravenou Al_2O_3 či ZrO_2 . Mnoho předchozích studií prokázalo, že implantáty povlečené HA vykazují unikátní vlastnosti co se týká biokompatibility a že mohou sloužit jako tzv. osteokondukční materiál [7]. Cheung et al. dokonce referoval, že krystaly HA působí jako mitogen přidají-li se ke psím synoviálním buňkám v monokultuře. Výrazně se v tomto

případě zvýšil počet buněk, DNA syntéza a produkce proteinů [47]. Porézní struktura HA dovolí vrůst kosti přímo do implantátu, což zlepšuje mechanickou stabilitu a zároveň biologickou odpověď [48]. Dynamické rozhraní kosti a HA je jeden z nejdůležitějších momentů vazby keramického materiálu k živé tkáni v procesu osteointegrace implantátu. Přítomnost Ca a P iontů se prokázala být jako esenciální pro apozici kosti v těsné blízkosti implantátu [27]. A to nejen samotná přítomnost těchto iontů, ale i jejich vzájemný poměr, kde se za ideální považuje poměr Ca/P 1,66 [6]. Konečné vlastnosti keramického povlaku jsou do velké míry též ovlivněny metodou depozice vrstvy [27].

Zirkonová keramika má lepší mechanické vlastnosti než jiné typy keramiky pro lékařské účely. Mechanické vlastnosti jsou závislé na vstupních surovinách a na postupu výroby komponent. *In vitro* biologické testy ukázaly, že zirkonový prášek nebo keramika nejsou cytotoxické. Rovněž nebyly pozorovány žádné místní či systémové nežádoucí reakce mající vztah k tomuto materiálu [40].

Velmi kontroverzní otázkou je dlouhodobá stabilita a prognóza HA-povlakovaných implantátů. HA povlakované implantáty byly vyvinuty k urychlení osteointegrace titanového implantátu a současně tak i překonat chabé mechanické vlastnosti HA [49]. Vezmeme-li v potaz skupinu tzv. kalciumfosfátové keramiky, kam zahrnujeme HA, tricalciumfosfát a sklokeramiku, můžeme tvrdit, že novotvorba kosti je úměrná rozpustnosti keramiky. Dokonce strukturální charakteristika apatitu na tomto rozhraní se velmi podobá krystalům nalezených v kosti [50]. Dle Trisi et al. se domnívají, že vymizení HA povlaku na některých místech povrchu implantátu po 10 letech zatížení může být pouze následek místního procesu remodelace kosti. Tento jev je vysvětlován tak, že během remodelace lokálně aktivované osteoklasty tvoří

v kosti jamky hluboké 50-70 μm , kde pak mohou osteoblasty produkovat novou kostní matrix. Když se právě toto stane na povrchu povlakovaného implantátu, mohou být pak nějaké části povrchu resorbovány a nahrazeny kostí. Množství vymizelého HA tak přímo koreluje s objemem novotvořené kosti [30]. Kalciumfosfátová keramika se řadí do skupiny bioaktivních keramik, což jsou materiály, které jsou schopné vázat okolní kostní tkáň a urychlit novotvorbu kosti.

Ve studii Klein et al. relativně méně stabilní HA povlaky vykazovaly menší přímou vazbu kosti v kontaktu s implantáty ve srovnání se stabilními HA povlaky – naneseny plasma naprašováním [51]. Byla také provedena osmiletá klinická studie, kdy HA-povlakované implantáty vykazovaly zprvu vyšší přežití, ale toto přežití výrazně pokleslo po 4 letech. Implantáty však byly povlečené opět metodou plasma naprašování [46]. Většina implantátů selhala kvůli zánětu. Ve studii Trisi et al. po 10 letech funkčním zatížení byly povlakované implantáty klinicky zdravé a oseointegrované a cca 80% povlaku bylo zachováno [30].

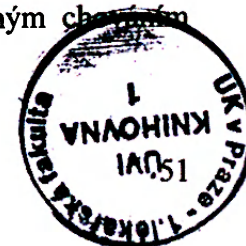
Povrchy s vysokou krystalinitou se považují za mnohem více odolné vzhledem k možné rozpustnosti než amorfní struktura HA [52], ale naproti tomu bylo prokázáno, že povrchy s vysokou krystalinitou mohou inhibovat růst buněk [53]. Zde zároveň tkví i hlavní rozdíl mezi technikou plasma naprašování a technikou pulzní laserové depozice. Zatímco u plasma naprašování solubilita kalciumfosfátu závisí na vlastnostech původního prášku (tzn. velikost částic a krystalinita), metoda pulzní laserové depozice v závislosti na podmínkách dokáže vytvořit tenký povrch o různých vlastnostech [31]. Dle jiného autora se HA rozpouští, je-li amorfní či velmi málo krystalický. Naopak vysoce denzní a krystalický HA umožní přímou vazbu ke kostní matrix [6].

Největší rozdíl mezi implantáty povlečenými HA a implantáty čistě titanovými je v tvorbě nekalcifikované amorfni vrstvičky s několika kolagenními vlákny mezi kostí a titanem, zatímco na HA umožní přímé spojení ke kosti. Udávaná tloušťka mezivrstvičky u různých autorů kolísá, u většiny se pohybuje v hodnotách nižších než 0,5 μm [49].

Fibroblasty jakožto osteoblastům podobné buňky jsem použili z toho důvodu, že vykazují obdobné chování jako osteoblasty [54], jak bylo prokázáno v mnoha studiích. Kvalitativní i kvantitativní studie buněčné morfologie prokázaly, že osteoblasty a fibroblasty se chovají na různých površích obdobně [13].

Testování biokompatibility určitého materiálu může proběhnout jen na základě toho, že bude zjištěno, že daný materiál není cytotoxický. In vitro testování je metodou první volby při testování cytotoxicity materiálu [44]. Kvantitativní hodnocení počtu buněk v jednotlivých jamkách nám dovolilo zjistit míru cytotoxicity daných materiálů. V naší studii jsme prokázali, že terčíky z titanové slitiny Ti6Al4V povlakované krystalickým hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu nejsou cytotoxické. Velmi podobných výsledků jako námi testovaný materiál dosahují i terčíky z inertní keramiky (Noritake) běžně používané v zubním lékařství (Obr. 4, 5). Červená pryž je absolutně cytotoxická (Obr. 4, 5) a uvolňující se monomer u terčků z metylmetakrylátu snižuje proliferaci buněk a působí na fibroblasty také cytotoxicky.

V námi provedeném přímém testu cytotoxicity jsme také pozorovali rozdíly v počtu buněk mezi vzorky pěstovanými s myšimi a s lidskými fibroblasty (Obr. 4, 5). Tento jev může být dán jednak odlišnou reakcí stejných buněk různých živočišných druhů na kultivační prostředí, ale i rozdílným chováním



liniových buněk a buněk získaných přímo z tkáně. Jisté rozdíly ve výsledcích mohou být také způsobeny chybou při ředění suspenze malého počtu buněk do relativně velkého objemu kultivačního média.

Fenomén adheze buněk k substrátu je předmětem zájmu buněčných biologů po mnoho let. Schopnost buněk žít a růst v přítomnosti nějakého materiálu je důležitým měřítkem funkční schopnosti buněk. Adheze je nutnou podmínkou k biologické integraci materiálu [40]. Mezi důležité varující znaky možné cytotoxicity materiálu patří snížená schopnost adheze, změněná morfologie buněk [44]. Vývoj každé jednotlivé buňky nezávisí pouze na médiu, ve kterém buňky rostou, ale také na fyzikálních reakcích, které probíhají na materiálovém rozhraní, které daná buňka potká [41]. Buňky, které dobře adherují k jednomu povrchu, nemusí adherovat k povrchu jinému [55]. Busher et al. prokázali, že adheze a proliferace lidských fibroblastů závisí na chemickém složení a povrchových vlastnostech podkladu [40].

Tvar buněk je všeobecně velmi důležitý, neboť nám umožňuje soudit i na stádium diferenciaci buněk [56]. Lidské i myší fibroblasty v blízkosti námi testovaného materiálu nevykazovaly změněnou morfologii.

Vzhledem k dokonalé nepropustnosti terčů pro světlo lze zhodnotit morfologii buněk pouze v okolí terče (Obr. 7a, b). Zde přítomné buňky nebyly ve srovnání s buňkami pěstovanými v kontrolních jamkách morfologicky změněné. Díky provedeným testům (počítání buněk, MTT test) bylo dokázáno, že adheze a proliferace buněk na povrchu zkoumaných terčů byla srovnatelná s adhezí a proliferací na tkáňovém polystyrenu. Díky imunofluorescenčnímu barvení byly buňky na povrchu terče vizualizovány a prokázala se jejich schopnost produkovat fibronectin (Obr. 10). Lze tedy konstatovat, že fibroblasty jsou schopné adherovat

k povrchu studovaných vzorků, proliferovat a vytvářet molekuly extracelulární matrix.

Počet fibroblastů vyrostlých na povrchu zkoumaných vzorků byl statisticky vyšší než na kontrolním povrchu – tkáňově upravený polystyren (Obr. 12). Na druhé straně jsme zjistili vyšší metabolickou aktivitu právě na tkáňově upraveném polystyrenu, který je brán jako optimální materiál pro kultivaci buněk (Obr. 12). Největší metabolické aktivity ze sledovaných vzorků jsme však dosáhli u terčů povlečených HA s mezivrstvou zirkonu, ačkoli absolutní počet buněk byl nižší. Vyšší metabolická aktivita buněk na sendvičově uspořádaném vzorku by mohla předpokládat i větší tvorbu extracelulární matrix. Spojení dvou metodik, tj. počítání buněk a MTT testu, který zároveň odráží metabolickou aktivitu buněk, nám poskytlo daleko komplexnější informace o stavu buněk na povrchu jednotlivých materiálů.

Pomocí testů *in vitro* se prokázalo, že sledovaný model titanového implantátu povlečený laserově deponovanou vrstvou krystalického hydroxyapatitu s mezivrstvou zirkonu se zdá být perspektivním materiálem vhodným k dalším podrobnějším testům a do budoucna možná k vlastní implantaci.

8. Z Á V Ě R

Cílem mé práce bylo zhodnotit nový typ implantátu zhotovený z titanové slitiny Ti6Al4V povlečené hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu z hlediska jeho biologických vlastností. Jako srovnávací materiál byl použit čistý titan, titan povlečený vrstvou zirkonu a kultivační standard - tkáňově upravený polystyren.

Daný materiál nejeví známky cytotoxicity; u buněk kultivovaných v jeho přítomnosti (dospělé i embryonální fibroblasty) nedochází ke změně morfologie či ke snížení jejich proliferační aktivity. Zároveň jsou tyto buňky schopny kolonizovat jeho povrch, proliferovat až do dosažení konfluentního porostu a vytvářet extracelulární matrix. Dosažené výsledky potvrzují vhodnost sendvičového materiálu pro použití v zubní implantologii.

Z literárních údajů je známo, že speciálně upravený povrch zlepšuje a hlavně zrychlí oseointegraci implantátu a urychlí tak rehabilitaci pacienta. Proto by bylo žádoucí pokračovat v testování tohoto materiálu *in vitro* ve 3D experimentech a nakonec i v *in vivo* testech.

9. SUMMARY

Biological properties of hydroxyapatite coated titanium alloy in relation to direct implant loading

Coating dental implants with hydroxyapatite may give certain advantages such as active encouragement to new bone growth, a lower rejection rate and an improved long-term prosthesis fixation. The biological properties of dental implants coated by the sandwich technique with a thin layer of hydroxyapatite and an interlayer of zirconia were evaluated. The implant samples were covered by pulsed laser deposition. The aim of this study is to evaluate the cytotoxicity and the surface characteristics of the titanium targets modified with zirconia and hydroxyapatite. We used a direct test of cytotoxicity, tests of fibroblasts adhesion and proliferation using counting of harvested cells and providing a MTT assay. No changes in the morphology or the proliferation rate of the cells used were found in the presence of the modified titanium targets. The results show adhesion and cell proliferation, which in turn implies that the studied material is not cytotoxic and is suitable for cell colonization. Titanium modified with zirconia and crystalline hydroxyapatite can improve the biological properties and so can be beneficially employed in oral bone surgery.

Key words: implant, oseointegration, direct loading, cytotoxicity, fibronectin

Klíčová slova: implantát, oseointegrace, přímé zatížení, cytotoxicita, fibronektin

10. L I T E R A T U R A

1. Vaněk J., Prachár P., Bartáková S., Březina V. Růst buněk stabilizované linie HeLa ve výluhu chromkobaltové slitiny povrchově upravené nitridem titanu a nitridem zirkonia. *Prakt. zub. Lék.*, 2005, 53, 1, s. 12-14
2. Šimůnek, Antonín a kol. *Dentální implantologie*. 1. vydání. NUCLEUS HK. 2001. 192 s. ISBN 80-86225-15-1
3. Nelea V., Mihailescu I.N., Jelínek M., *Pulsed Laser Deposition of Thin Films – chapter 18 – Biomaterials: New Issues and Breakthroughs for Biomedical Applications*, John Wiley and Sons, Inc., 2007, v tisku
4. Schnettler R., Alt V., Dingeldein E., Pfefferle H.J., Kilian O., Meyer C., Weiss C., Wenish S. Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, 2003, 24, s. 4603-4608
5. Vaněk J., Prachár P., Bartáková S., Březina V., Freyburg L. Biologické testy chromkobaltové slitiny povrchově upravené nitridem titanu a nitridem zirkonia. *Čes. Stomat.* 2005, 105, 6, s. 149-153
6. Blind O., Klein L.H., Dailez B., Jordan L. Characterization of hydroxyapatite films obtained by pulsed/laser deposition on Ti and Ti-6Al-4V substrates, *Dental Materials*, 2005, 21, 11, s. 1017-1024
7. Harada Y., Wang J.T., Doppalapudi V.A., Willis A.A., Jasty M., Harris W.H., Nagase M., Goldring S.R. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1996, 31, s. 19-26
8. Ducheyne P., Qui Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999. vol. 20. s. 2287-2303

9. Cleries L., Fernandes-Pradas J.M., Morenza J.L. Bone growth on and resorption of calcium phosphate coatings obtained by pulsed laser deposition. *J Biomed Mater Res*, 2000, 49, s. 43-52
10. Lo W.J., Grant D.M., Ball D.M., Welsh B.S., Howdle S.M., Antonov E.N. et al. Physical, chemical, and biological characterization of pulsed laser deposited and plasma sputtered hydroxyapatite films on titanium alloy. *J Biomed Mater Res*, 2000, 50, 4, s. 536-45
11. Davies J.E. In vitro modeling of the bone/implant interface. *The Anatomical Record*, 1996, 245, s. 426-445
12. Oh S., Tobin E., Yang Y., Carnes D.L.Jr., Ong J.L. In vivo evaluation of hydroxyapatite coating of different crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005. vol.20.no. 5. s. 726-31
13. Baxter L.C., Frauchiger V., Textor M., Gwyn I., Richards R.G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *European Cells and Materials*, 2002, 4, s. 1-17
14. Ericsson I., Randaw K., Nilner K. Early Functional Loading of Brånemark Dental Implants- 5 years Clinical Follow Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2000. 2. s. 70-77
15. Glauser R., Rée A., Lundgren A.K., Gottlow J., Haemmerle C., Schaerer P. Immediate Occlusal Loading of Brånemark Implants Applied in Various Jawbone Regions: A Prospective, 1-Year Clinical Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2001. 4. s. 204-213
16. Brånemark P.I., Engstrand P., Ohnrell L.O., Groendal K., Nilsson P., Hagberg K., Darle C., Lekholm U. Brånemark Novum: A New Treatment Concept for Rehabilitation of the Edentulous Mandible. Preliminary Results from a Prospective Clinical Follow-up Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 1999. 1. s. 2-16
17. Gapski R., Wang H.L., Mascarenhas P., Lang N. Critical review of immediate loading. *Clin. Oral Impl. Res.* 14. 2003. s. 515- 527

18. Szmukler-Moncler S., Piatelli A., Favero G.A., Dubrille J.H. Consideration preliminary to the application of early and immediate loading protocols in dental implantology. *Clin Oral Impl Res* 2000. 11. s. 12-25
19. Brånemark, P.I. Osseointegration and its experimental background, *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1983. 3. s. 399-410
20. Rocci A., Martignoni M., Gottlow J., Rangert B. Immediate Function of single and Partial reconstructions in The Maxilla Using Mk IV Fixtures. A retrospective analysis. *Applied Osseointegration Research*. 2001. vol 2. no. 1. s. 22-29
21. Laser R., Portmann M., Ruhstaller P., Lundgren A.K., Haemmerle H.F., Gottlow J. Stability Measurements of Immediately Loaded Machined and Oxidized Implants in the Posterior Maxilla .A comparative clinical study using resonance frequency analysis. *Applied Osseointegration Research*. 2001. vol 2. no. 1.s. 27-29
22. Chow J., Hui E., Li D., Liu J. Immediate Loading of Brånemark System Fixtures in the Mandibule with a Fixed Provisional Prosthesis. *Applied Osseointegration Research*. 2001. 1. s. 30-35
23. Franchi M., Fini M., Giavaresi G., Ottani V. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*, 2005, 36, s. 630-644
24. Szmukler-Moncler S., Salama H., Reingerwartz Y., Dubrille J.H. Timing of Loading and effect of Micromotion on Bone–Dental Implant Interface: Review of experimental Literature. *Inc. J Biomed Mater Res Appl Biomat*. 1998. 43. s.192-203
25. Ericsson I., Nilson H., Nilsen K. Immediate Functional Loading of Brånemark Single Tooth Implants. A 5-year clinical follow-up study. *Applied Osseointegration Research*. 2001. 1. s. 12-16
26. Romanos G., Toh C.G., Siar C.H., Swaminathan D., Ong A.H., Donath K., Yaacob H., Nentwig G.H. Peri-Implant Bone Reaction to Inmediately Loaded Implants. An Experimental Study in Monkeys. *J Periodontol*. 2001. vol.72. no.4. s. 506-511

27. Lacefield, W.R. Current Status of Ceramic Coatings for Dental Implants. *Implant Dentistry*. 1998. vol.7.n.4.s. 315-322
28. Vaněk J., Prachár P., Bartáková S., Fassmann A., Freyburg L. Kvalita oseointegrace zavedených enoseálních dentálních titanových implantátů a celkový zdravotní stav. *Čes. Stomat.* 2002, 102, 2, s. 48-52
29. Lekholm U. Patient Selection for Brånemark Novum Treatment. *Applied Osseointegration Research*, 2001. vol. 2. no. 1. s. 36-39
Associates Inc. 2004, s. 168, ISBN 0-87893-258-5
30. Trisi P., Keith D.J., Rocco S. Human Histologie and Histomorphometric Analyses of Hydroxyapatite-Coated Implants After 10 Years of Function: A Case Report, *The International Journal of Oral and Maxillifacial Implants*, 2005, vol. 20, no. 1, s. 124-130
31. M.D., Downes S., Scotchford C.A., Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Popov V.K., Lo W.J., Grant D.M., Howdle S.M. Osteoblast growth on titanium foils coated with hydroxyapatite by pulsed laser ablation, *Biomaterials*, 2002, 22, s. 337-347
32. Albrektsson T., Johansson C. Experimental and clinical studies of different ways to improve the outcome of implants placed in bone of deficient quantity and quality. *Journal de parodontologie and d'implantologie orale*, 2003, 19, 3, s. 271-288
33. Katto M., Nakamura M., Tanaka T., Matsutani T., Kuwata M., Nakayama T. Hydroxyapatite coating using novel pulsed laser ablation methods, *Surface and Coating Technology*, 2003, 169-170, s. 712-715
34. Brunski J., Nanci A., Helms J. Implant Stability and the Bone Implant Interface. An Editorial for *Applied Osseointegration Research*. 2001. vol. 2. no1. s. 3-5
35. Glauber R., Portmann M., Ruhstaller P., Gottlow J., Schaerer P. Initial Implant Stability Using Different Implant Designs and Surgical Techniques. A comparative clinical study using insertion torque and resonance frequency analysis. *Applied Osseointegration Research*. 2001. vol 2. no. 1. s. 6-11

36. Rompen E., DaSilva D., Hockers T., Lundgren A.K., Gottlow J., Glauser R., Sennerby L. Influence of Implant Design on Primary Fit and Stability. A RFA and histological comparison of Mk III and Mk IV Brånemark implants in the dog mandible. *Applied Osseointegration Research*. 2001. vol. 2. no. 1.s. 9-11
37. Eckert S.E., Wollan P.C. Restrospective review of 1170 endosseous implants placed in partially edentulous jaws. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1998. 4. s. 415-423
38. Lekholm U. Immediate/early loading of oral implants in compromised patients. *Periodontology*. 2000. vol. 33. s.194-203
39. Hatano H. The Maxis New. A novel one-day technique for fixed individualised implant-supported prosthesis in the edentulous mandible using Brånemark System implants. An Editorial for *Applied Osseointegration Research*. 2001. vol. 2. no. 1. s. 40-43
40. Dubious J.C., Souchier C., Couble M.L., Exbrayat P., Lissac M. An image analysis method for the study of cell adhesion to biomaterials, *Biomaterials*, 1999, 20, s. 1841-1849
41. Piconi, C., Maccauro, G. Review, Zirconia as a ceramic biomaterial, *Biomaterials* 20, 1999, s. 1-25
42. Häkkinen L. Fibroblast-bioactive glass interaction. Vol. 1, s. 135
43. Scott F. Gilbert. *Developmental biology*, seventh edition. Sinauer
44. Lavos-Valereto I.C., Wolyneec S., Deboni M.C.Z., König B.Jr. In Vitro and In Vivo Biocompatibility Testing of Ti-6Al-7Nb Alloy with and without Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coating. *J Biomed Mater Res*, 2001, 58, s. 727-733
45. Šimůnek, A., Vokurková, J., Kopecká, D., Celko M., Nouajjed R., Krulichova I., Skrabkova Z. Evaluation of stability of titanium and hydroxyapatite-coated osseointegrated dental implants: a pilot study. *Clin. Oral Implants Res.*, 2002, roč. 13, č.1, s.75-79

46. Baltag I., Watanabe K., Kusakari H., Taguchi N., Miyakawa O., Kobayoshi M., Ito N. Long-Term Changes of Hydroxyapatite-Coated Dental Implants, *J Biomed Mater Res*, 2000, 53, s. 76-85
47. Cheung H.S., Story M.T., McCarty D.J. Mitogenic effects of hydroxyapatite and calcium pyrophosphate dihydrate crystals on cultured mammalian cells. *Arthritis Rheum*, 1984, 27, s.668-674
48. Revell P.A., Hing K.A., Tanner K.E., Best S.M., Bonfield W. Osseointegration of porous hydroxyapatite In: Schnetler R., Markgraf E. *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1997, s.28-30
49. Ogiso M. Bone Formation on HA Implants: A Commentary. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 1998, 8, 3-4, s. 193-200
50. Hyakna K., Yamamuro T., Oka M., Hyakuna K., Yamamuro T., Kotoura Y., Oka M., Nakanuta T., Kitsugi T., Kokubo T., Kushitani M. Surface reactions of calcium phosphate ceramics to various solutions. *J. Biomed. Mater.* 1990, 24, s.471-488.
51. Klein C.P., Wolke J.G., De Blicke – Hogervorst J.M., De Groot K. Calcium phosphate plasma sprayed coatings and their stability: An in vitro Study. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1994, 28, s.909-917
52. Tranquilli P.L., Merolli A., Pulmacci D., Gabbi C., Cacchioli A., Conozzi. Evaluation of different preparations of plasma sprayed HA coating on titanium alloys and duplex stainless steel in the rabbit. *J Mater Sci*, 1994, s.345-9
53. Frayssinet P., Tourenne F., Bouquet N., Conte P., Delga C., Bonel G. Comparative biological properties of HA plasma-sprayed coatings with different crystallinities. *J Mater Sci*, 1994, 5, s.11-7
54. Lumbikanonda K., Sammons R. Bone Cell Attachment to Dental Implants of Different Surface Characteristics, *Oral Maxillofac Implants*, 2001, 16, s. 627-636
55. Ireland G.W., Doping-Hepenstal P., Jordan J., O'Neil C. Effect of patterned surfaces of adhesive islands on the shape, cytoskeleton,

adhesion and behaviour of Swiss mouse 3T3 fibroblasts. *J.Cell Sci*, 1987,
8, s.19-33

56. Ben-Ze'ev A. Animal cell shape changes and gene expression.
BioEssays. 1991, 13, s.207-12

11. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORKY, VĚDECKÁ OCENĚNÍ

Výše uvedené výsledky byly shrnuty do těchto prací:

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T., Mroz W.: Biological properties of titanium implants covered with hydroxyapatite and zirconia layer by pulsed laser: In vitro study. *Journal of applied physics*, 2006, 99, 1, **IF - 1.642**

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T.: KrF laser coated titanium implants do not decrease cell proliferation *Lasers in medical science*, 2005, vol. 20, p. 34, abstraktová kniha (20th Int. Congress Laser Medicine, abstrakt book, 10.-12.11.2005, Florencie.), **IF: 1,90**

Teuberová Z., Seydlová M., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T.: Metabolic activity of LEP in the presence of KrF laser coated titanium implants, *Lasers in medical science*, 2005, vol. 20, p. 37, abstraktová kniha (20th Int. Congress Laser Medicine, abstrakt book, 10.-12.11.2005, Florencie), **IF: 1,90**

Jelínek M., Dostálová T., Teuberová Z., Seydlová M., Mašínová P., Kocourek T., Mroz W., Prokopiuk A., Smetana K.Jr.: Study of laser created ZrO₂ and hydroxyapatite/ ZrO₂ films for implantology. *Biomol Eng.*, 2006, Jun 6, s. 1-4, **IF: 1,62**

Teuberová Z., Seydlová M., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K. Jr., Jelínek M., Mašínová P., Kocourek T., Kolarová K., Wilson J.: Biological and physical properties of pulsed laser deposited zirconia/hydroxyapatite on titanium – in vitro study, *Laser physics*, akceptováno, bude v tisku 2007, **IF: 0,684**

Seydlová M., Havlová Z., Dostálová Z., Šimůnek P.: Přímé zatížení implantátu (souborný referát). *Prakt. Zub. Lék* 2004 .vol. 52, no. 2, p. 54-63.

Seydlová M., Havlová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M.: Titanový terčik modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem- hodnocení povrchu in vitro. *Prakt. Zub. Lék* 2004, vol. 52, no. 6, p. 159-164.

Teuberová Z., Seydlová M., Dostálová T., Jelínek M., Dvořánková B.: Titanový terčik modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem nevykazuje známky cytotoxicity. *Prakt. Zub. Lék* 2005, vol. 53, no. 1, p. 7-11.

Havlová Z., Seydlová M., La Serra P., Dostálová Z., Jelínek M. Povlakování implantátů hydroxyapatite modifikovaným zirkonem. Čes Stomat. 2004, vol. 104, no. 4, p. 149 – 159

Seydlova M., Dostalova T., Dvorankova B., Smetana K. Mice and human fibroblasts colonize the surface of titanium samples. Abstract book, 28th Annual Conference of the European Prosthodontic Association, Izmir, Turkey, 16. - 18. 9. 2004: 132.

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T., Mroz W.: Biological and mechanical properties of titanium implant covered with hydroxyapatite and zirconia layer by pulsed laser. Protetyka stomatologiczna, Wroclaw, 2005, vol. 50, No. 5, Supl. LV, p.89.

Seydlova M., Dostalova T., Dvorankova B., Smetana K. Mice and human fibroblasts colonize the surface of titanium samples. Abstract book, 28th Annual Conference of the European Prosthodontic Association, Izmir, Turkey, 16. - 18. 9. 2004: 132.

Seydlová M., Havlová Z., Dostálová Z., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M.: Biologické vlastnosti titanové slitiny - přímý test cytotoxicity. Pražské dentální dni. 13.-16.10. 2004, 30.

Seydlova M., Teuberova Z., Dostalova T., Dvorankova B., Smetana K., Jelínek M.: Titanový terčik modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem – hodnocení povrchu in vitro 5. studentská vědecká conference 1. LF UK Praha 24.5.2004, abstraktová kniha 39.

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T., Mroz W.: Biological and mechanical properties of titanium implant covered with hydroxyapatite and zirconia layer by pulsed laser. 29th Annual Conference of the European Prosthodontic Association Poznaň, 1.-3. 9. 2005

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T.: KrF laser coated titanium implants do not decrease cell proliferation – Laser Florence 2005 – 20th int. Congress laser medicine - abstrakt book 10-12.11.2005, Florencie.

Teuberova Z., Seydlova M., Dostalova T., Dvorankova B. Jelínek M. Titanový terčik modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem nevykazuje známky

cytotoxicity. 5. studentská vědecká konference 1. LF UK Praha 24.5.2004, abstraktová kniha 37.

Teuberova Z., Dostalova T., Jelínek M., Dvorankova B. Titanium samples modified with hydroxyapatite and zirconia are not toxic. Abstract book, 28th Annual Conference of the European Prosthodontic Association, Izmir, Turkey, 16. - 18. 9. 2004: 133.

Teuberová Z., Seydlová M., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T.: Metabolic activity of LEP in the presence of KrF laser coated titanium implants Laser Florence 2005 – 20th int. Congress laser medicine - abstrakt book 10.-12.11.2005, Florencie.

Quintessence poster prize za rok 2005 za poster na 29th Annual Conference of the European Prosthodontic Association Poznaň, 1. - 3.9. 2005: Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořánková B., Smetana K., Jelínek M., Kocourek T., Mroz W.: Biological and mechanical properties of titanium implant covered with hydroxyapatite and zirconia layer by pulsed laser

Cena Josefa Hlávky za rok 2006 – Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových

Biological properties of titanium implants covered with hydroxyapatite and zirconia layers by pulsed laser: *In vitro* study

Michaela Seydlova,^{a)} Zuzana Teuberova, and Tatjana Dostalova
1st Faculty of Medicine, Department of Prosthodontics, Charles University, 120 00 Prague 2, Czech Republic

Barbora Dvorankova and Karel Smetana, Jr.
1st Faculty of Medicine, Institute of Anatomy, Charles University, 120 00 Prague 2, Czech Republic

Miroslav Jelinek and Tomas Kocourek
Institute of Physics, ASCR, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic

Waldemar Mroz
Institute of Optoelectronics, MUT, Kaliskiego 2, 01-489 Warsaw, Poland

(Received 2 March 2005; accepted 18 November 2005; published online 12 January 2006)

The biological and physical properties of dental implants coated by the sandwich technique with a thin layer of hydroxyapatite and an interlayer of zirconia were evaluated. The implant samples were covered by pulsed laser deposition. The aim of our study is to evaluate the cytotoxicity and the surface characteristics of the titanium targets modified with zirconia and hydroxyapatite. The titanium substrates were analyzed physically by x-ray diffraction and scanning electron microscopy. We used a direct test of cytotoxicity to compare the prepared samples with other reference materials. No changes in the morphology or the proliferation rate of the cells used were found in the presence of the modified titanium targets. The adhesion, proliferation, and fibronectin expressions of human fibroblasts were also evaluated on the surface of the modified titanium targets. The results show that the modified titanium samples are at least as attractive as the tissue grade polystyrene in promoting fibroblasts' adhesion and proliferation. The results show adhesion and cell proliferation, which in turn implies that the studied material is not cytotoxic and is suitable for cell colonization. Titanium modified with zirconia and hydroxyapatite can be beneficially employed in oral bone surgery. © 2006 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.2158140]

I. INTRODUCTION

A successful implantation is the result of a suitable combination of various parameters related to the implant such as the properties of the material that it is made of as well as its shape and size. The combination of these factors can influence the healing of the implant into the bone.¹⁻³ The nonload healing period is the generally accepted condition for osseointegration. Previously it was suggested that specific biological responses of early loaded implants (fibrous repair or osseointegration) were directly related to a specific combination of the bone-implant interface, implant design, and type of the prosthetic reconstruction.³

There are many reasons to modify the surface of the dental implant, such as to achieve enlargement of its surface, quicker osseointegration, better retention as well as protection of the metal nucleus against corrosion, and in turn permanent isolation. Implants can be modified chemically by etching⁴ or mechanically by cutting,⁵ however, the most advanced view is to modify the surface of the implant by a thin layer of biocompatible material. A necessary demand on the implant and its loading is its perfect and quick osseointegration. That is why materials that could facilitate a direct

structural and functional junction between the bone structure and the implant are being developed.⁵ The biocompatibility and bioactivity are the main requirements for a coating material.

Several methods have been employed for the fabrication of a coating on implants such as plasma spraying, vacuum-deposition techniques including ion-beam sputtering and pulsed layer deposition (PLD), sol-gel and dip coating methods, hot isostatic pressing, and electrolytic processes such as electrophoresis and electrolytic codeposition.⁶

At present, the preferred method of coating implants is a thin crystalline layer of hydroxyapatite (HA), chemically defined as $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, which is an inorganic compound of bone in the range from 60% to 67%.⁷ Hydroxyapatite crystallized with hexagonal phase and its unit cell contains six $(\text{PO}_4)^{3-}$ tetrahedral groups.⁸ Plasma spraying enables the fabrication of a relatively thick coating (50–200 μm) with an amorphous structure quite widely spread.⁹ The disadvantage of plasma spraying is its negative effect on the HA crystallinity and thus on the healing process of the implant. The optimal composition of HA is high film stoichiometry, porosity crystallinity, efficient attachment to the substrate, and low level of decomposition.⁸ Since its introduction in 1992 PLD has been routinely used as a fabrication technique due to its capability to provide high-quality HA coatings.¹⁰

^{a)}FAX: +420 2 24916573; electronic mail: michaela.seydlova@seznam.cz

We assume that the material under study is not cytotoxic and does not change the behavior and morphological structure of cells in surrounding tissue. This was tested by culturing fibroblast cells with the treated samples.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Sample preparation

The substrate made of titanium alloy (Ti_6Al_4V) with a diameter of 10 mm and thickness of 2 mm was used as a substrate for the deposition. These substrates were successfully coated by ZrO_2 interlayers with a thickness ranging from 50 to 100 nm and 6- to 12- μ m-thick HA coatings using PLD.

B. Pulsed laser deposition

PLD of HA layers is usually performed with KrF or ArF excimer lasers. PLD is a vacuum-deposition technique capable of producing such coatings with a thickness of the order of a few micrometers and good bonding to either smooth or rough titanium surfaces. However, to attain high-crystallinity heat treatment in a controlled atmosphere is usually required.

The quality of the coatings obtained by PLD is directly dependent on the deposition conditions such as laser power density, target substrate distance, environment in the interaction chamber, film growth rate, film thickness, substrate material, the deposition regime, etc.¹¹ It is possible to vary, via the deposition conditions, the Ca/P ratio or calcium phosphate phases. This may be significant for implantation applications. The degree of bioresorbability of calcium phosphate ceramics reportedly depends on the Ca/P ratio. Higher Ca/P ratio leads to lower rates of bioresorbability.¹¹

The depositions of HA and ZrO_2 films were carried out in two different deposition setups where KrF and ArF excimer lasers were used. First ZrO_2 films were produced by a KrF excimer laser (LUMONICS PM842) emitting at 248 nm with a repetition rate of 10 KHz and an output energy of 450 mJ.

The substrate was fixed at a distance of 4 cm from the ZrO_2 target. The trace of the laser beam on the target was 7.6 mm². The energy density of the laser beam on the target was 4 J cm⁻². During the deposition, the oxygen pressure of 6×10^{-3} Pa was kept and the substrate temperature of 20 °C was maintained. ZrO_2 films with a thickness of 50–100 nm were grown. An HA film was fabricated on the titanium substrates coated with the ZrO_2 layers. The ArF excimer laser emitting at 193 nm with a repetition rate of 50 Hz and an output energy of 330 mJ was used for the deposition. The trace of the laser beam was 5.3 mm². The deposition was proceeded in H₂O atmosphere at the pressure of 50 Pa. The target was fixed at distance of 3 cm from the HA substrate and heated up to 600 °C. The growth rate of the HA films was ~0.03 nm/pulse.

C. Physical tests

1. Analysis of the sample surface

The film morphology was observed using a scanning electron microscope (SEM) (JEOL JXA 733, Japan) using a 15 kV electron beam and $\times 400$ magnification. On completion of all the biological tests the surface of the coated titanium target was reassessed with the scanning electron microscope [JSM 5500 LV (Joel, Japan)].

2. X-ray-diffraction and wavelength dispersive x-ray (WDX) analyses

The films were structurally characterized by x-ray diffraction (XRD). A parallel beam optic geometry with a Huber two circle diffractometer, powered by a rotating anode generator x-ray source (300 mA and 55 kV), RIGAKU Rotaflex RU 300 was used. Film thickness was measured with Alpha Step 500. The ratio of calcium to phosphorus (Ca/P) in the film was studied by an electron microscope using WDX.

D. Biological tests

1. Test of cytotoxicity

The coated samples were compared with positive and negative controls in a direct test of cytotoxicity. The positive reference was a ceramics target—Noritake (Noritake, Arlington Heights, USA); the two negative controls a target of artificial red rubber (Vegum, Gumarne Dolne Vestenice, Slovakia) and a target of dental resin Superpont C+B (Dental a.s. Prague, Czech Republic) made with an excess of monomer: 5 ml of monomer and 3 g of polymer. The usual ratio for the preparation of Superpont C+B is 1:1.

Two types of cell were used for the biological testing: 3T3 murine line fibroblasts and human dermal fibroblasts. The cells were seeded into six-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark) at 2500 cells/cm² and 3 ml of H-MEMd medium (ÚMG ČSAV, Prague, Czech Republic) was added into each well. The H-MEMd medium with 0.3 mg/ml of glutamine (Sevafarma, Prague, Czech Republic) and 10% bovine serum (ZVOS, Hustopeče, Czech Republic) was supplied with antibiotics—gentamycin [(10 μ g/ml) and penicillin (200 U/ml)].

The cells were cultured in the incubator at 37 °C, 3.3% CO₂, and 100% humidity. After 24 h the titanium targets, with HA and zirconia coatings, and the control reference targets of ceramic, rubber, and dental resins were inserted into the wells. An equal number of wells without targets but seeded with cells and supplied with nutrient was cultured as additional controls. On the third and fourth day of cultivation, 1.5 ml of medium was added to each dish. The morphology of adherent cells was monitored using phase contrast microscope (Olympus, Prague, Czech Republic). The cells were cultured for 5 days in the incubator. The samples were removed and the cells were harvested using a mixture composed of equal amounts of 0.25% trypsin and 0.02% EDTA (SIGMA, Prague, Czech Republic). The same procedure was used to remove the cells in the reference control

six-well plates. To ensure a perfect release of the cells from the six-well plates they were placed in an incubator at 37 °C for 10 min.

The fibroblasts from the control wells and from wells containing samples were counted in a Bürker chamber in using an optical microscope (Olympus, Prague, Czech Republic). The results were evaluated using a Student's *t*-test for statistical significance.

2. Test of adhesion

After sterilization, the studied samples were placed into 24-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark) with a dish diameter of 16 mm. Each 24-well plate was seeded with 100 000 (eighth subculture) human dermal fibroblast cells suspended in 1 ml of culture medium. An equal number of well plates not containing a sample were seeded with cells and medium and paired with a well plate containing a sample as a control.

The cells were cultured in the incubator for 24 h under the condition described above. The samples were then transferred into new wells and rinsed with phosphate buffer saline (PBS). The cells were harvested from the target's surface by a mixture of 0.25% trypsin and 0.02% EDTA (SIGMA, Prague, Czech Republic) in the mixing ratio of 1:1. The cells from the bottom of the control wells were subjected to the same procedure for their detachment. For a perfect release of the cells, the 24-well plates were put into the incubator for 10 min at 37 °C. The fibroblasts were counted in the Bürker chamber using the optical microscope. The cells obtained from the target and from the corresponding control well were counted separately.

3. Test of proliferation

The samples were prepared in the same way as for cell adhesion: 20 000 human fibroblast cells were added to 1 ml of culture medium in 24-well plates. Each sample had a control well plate paired with it.

Cultivation proceeded for 96 h at 37 °C, 3.3% CO₂, and 100% humidity. At 48 h and at 72 h, the H-MEMd medium was completely changed. Two samples were dried and deep frozen for storage and later immunohistochemical study. After 96 h the remaining cells were evaluated in the same way as in the test of attachment described above.

4. Fibronectin expression

The fibronectin was detected by a monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) diluted as recommended by the supplier. FITC-labeled porcine antmouse serum (SwAM-FITC, AISEVa, Prague, Czech Republic) was used as the second step antibody. The control of the specificity of the reaction was proved by the presence of isotype antibody against cytokeratins normally not occurring in fibroblast. This type of control is essential to exclude the non-specific binding of the first step antibody via Fc receptors. The samples were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The fluorescence microscope Optiphot-2 (Nikon, Prague, Czech Republic) equipped with a charge-coupled device (CDD) camera (Cohu) and computer-

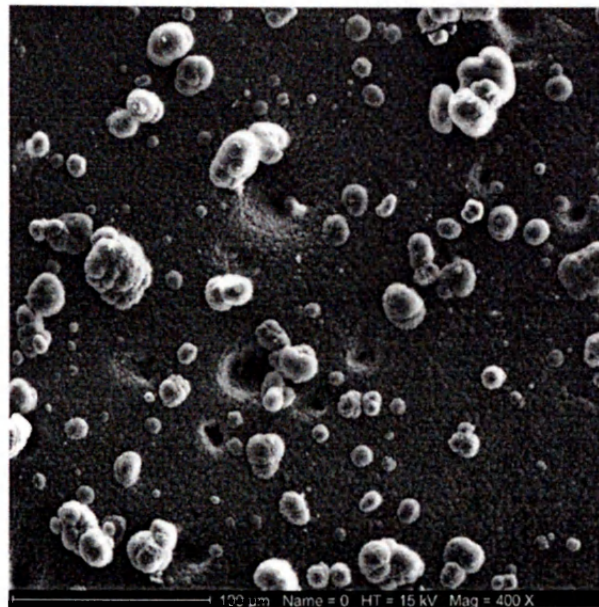


FIG. 1. Film morphology of ZrO₂ sample (SEM) (magnification of ×400). The structure of a created film is similar to the original hydroxyapatite.

assisted image analyzer LUCIA (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic) were used for detection of the signal and data storage.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Physical analysis

The SEM analysis showed that the HA film surface was covered with droplets with diameters ranging from 5 to 20 µm (see Fig. 1).

The deposited HA layer was smooth (Fig. 2). The XRD analyses confirmed amorphous layers of ZrO₂ and the polycrystalline structure of the HA films (Fig. 3). The Ca/P ratio of natural HA is 1.67. The Ca/P ratio in one of the samples was measured both in one of the droplets and in the flatter surface and was found to be in the range of 2.2–2.4.

There are several reasons to use HA as a coating material. The HA crystals are very fragile so HA cannot be used as a raw material for a self-contained implant.⁴ One of its important qualities is its biocompatibility because HA is an integral part of bone tissue. The HA coating on the metal nucleus is known to facilitate the healing processes and to allow the patient to use the prosthetic rehabilitation earlier.^{7,12} The presence of Ca and P ions was verified as essential for bone apposition in immediate surroundings of the implant.⁶ Hydroxyapatite and tricalcium phosphate are usually considered as bone bioactive ceramics, because they generally bond to the surrounding osseous tissue and enhance bone tissue formation.¹³

One of the much debated topics is resorption of the HA layer. The resorption of the HA layer may cause a new interface to develop with the implant isolated and separated from the surrounding bone tissue. The highly crystalline surfaces produced by PLD are not so easily resorbable. Some studies

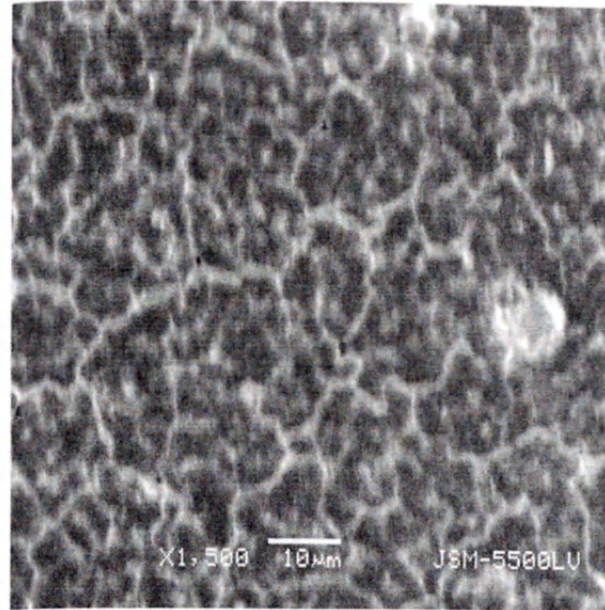


FIG. 2. SEM of the hydroxyapatite surface created by pulsed laser deposition on the interlayer of zirconia on the titanium target confirmed crystalline structure (magnification of $\times 1500$). The image shows that the HA coating is smooth and covered with droplets of diameters between 5 and 20 μm . The surface of the HA upper layer is homogeneous.

show that HA crystals stimulate bone apposition.¹⁴ The investigation of a mixture of HA and zirconia in one film made by plasma spraying shows positive results.¹⁵

The problem in focus is to improve the technique for thin layer coating with HA.^{8,16} There is detectable evidence of a positive relation of the laser ablation technique to the thin layer of HA and zirconia. One of the most serious disadvantages of plasma spraying is their more or less amorphous structure.⁶ Hydroxyapatite is a porous material improving the osseointegration⁸ but reducing the quality of the coating and its attachment to the metal core of the implant. At present, most of the commercially produced implants are made by plasma spraying which produces a fast coverage,

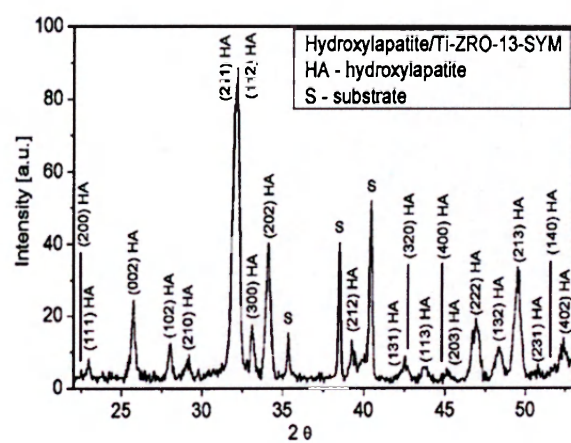


FIG. 3. XRD spectrum of HA layers (ZrO_2 , 13 sample). It describes several planes of crystal lattice. Calibrating was compared with standards. The analyses of the target surface by the above-mentioned technique verified that HA on the surface is crystalline.

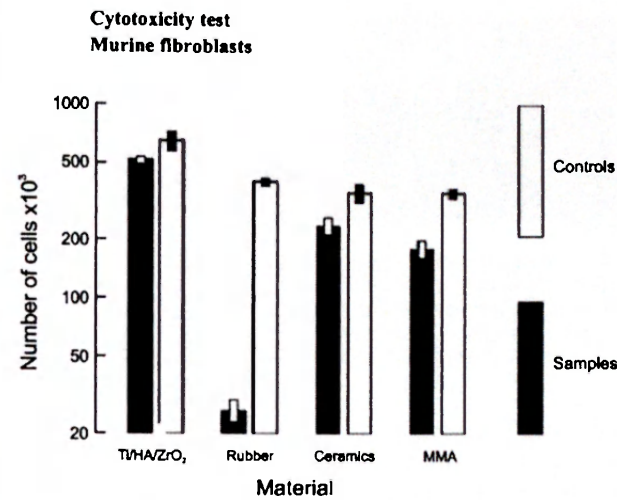


FIG. 4. Cytotoxicity test—murine fibroblasts. The growth of the murine fibroblasts with (black columns) and without (white columns) tested materials was compared. Statistical significant differences between evaluated samples and their controls are marked with asterisk. The best results were obtained for the modified titanium samples with zirconia and hydroxyapatite (Ti/HA/ ZrO_2); MMA is the abbreviation for the methylmetacrylate sample.

high film thickness (100–300 μm), high film porosity, and high substrate attachment. The coating created by plasma spraying is very granular but with low intergrain attachment. The high film porosity improves the osseointegration but reduces the intergrain and metal-ceramic attachments. The pulsed laser deposition has certain advantages. It creates a crystalline layer with strong intergrain attachment. Hydroxyapatite bonds well to the metal surface and the coating is evenly spread. However, the deposition of larger grains has not been achieved. Nevertheless, it is necessary to develop a high porosity coating for attachment to the bone.⁸

B. Cytotoxicity of the studied material

We have confirmed that the studied material with the crystalline HA coating and the interlayer from zirconia is not cytotoxic. The number of cells that were growing in the presence of the tested material was compared with the number of cells in the control wells without the materials. For both types of tested cells the best results were obtained with titanium samples coated with HA and zirconia (Figs. 4 and 5). As calcium hydroxyapatite is the most stable calcium phosphate in contact with the body, laser deposition research is directed towards the creation of crystalline HA.¹¹ Zirconia ceramic has a better mechanical quality than other types of ceramics used for medical needs. The mechanical characteristics depend on raw materials and on the procedures used in component processing. Biological tests made *in vitro* show that zirconia powder or ceramics are not cytotoxic. None of the cytotoxic or general reactions were observed in relation to this material,¹⁷ which support our outcomes.

Fibroblasts are known to quickly adhere to the bottom of the culture well, so after 24 h of cultivation the targets could be added to the cells. When the coated titanium and ceramic targets were inserted, the morphology of the cells did not change [Figs. 6(a) and 6(b)] in their surroundings. Fibro-

Cytotoxicity test Human fibroblasts

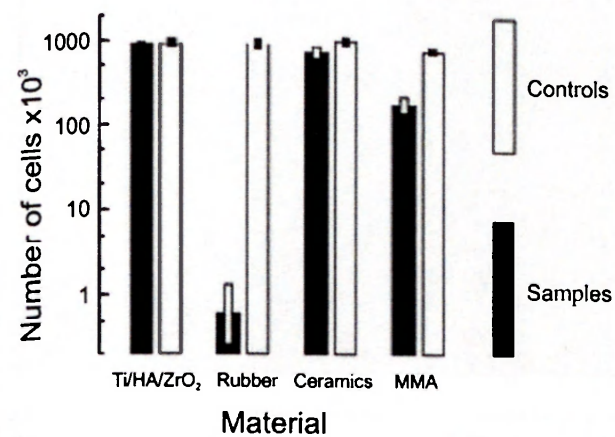


FIG. 5. Cytotoxicity test—human fibroblasts. The growth of the human fibroblasts with (black columns) and without (white columns) tested materials was compared. Statistical significant differences between evaluated samples and their controls are marked with asterisk. The best results were obtained from modified titanium samples with zirconia and hydroxyapatite (Ti/HA/ZrO₂) and were comparable with ceramic samples. MMA is the abbreviation for the methylmetacrylate sample.

blasts rapidly proliferated, resulting in subconfluent or almost confluent growth. In the surroundings of the rubber samples not only did the cells fail to divide but also changed their morphology and died and became detached from the bottom [Fig. 6(c)]. Red rubber is absolutely cytotoxic and the monomer released from the dental resin stunts the growth of the cells.

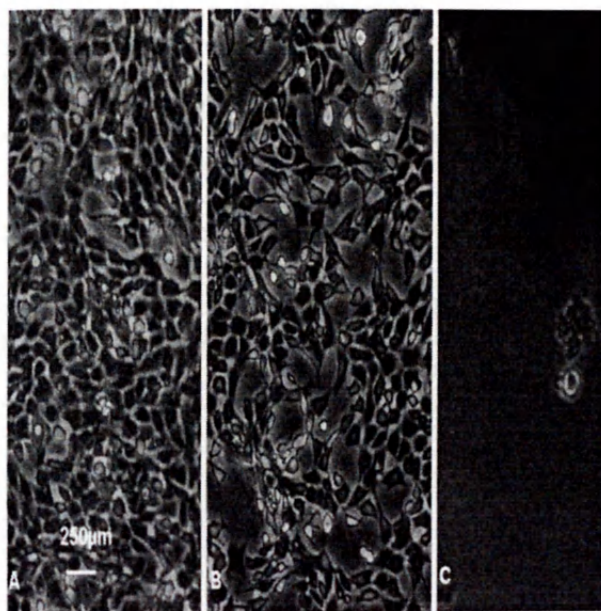


FIG. 6. The human fibroblasts in the surroundings of the titanium sample (a) coated by zirconia and hydroxyapatite grew confluent without any change of morphology as well as fibroblasts in the surroundings of ceramic target (b). Inactive human fibroblasts in the well with the red rubber sample (c), not only the cells fail divide, but also they changed their morphology and died, detaching from the bottom.

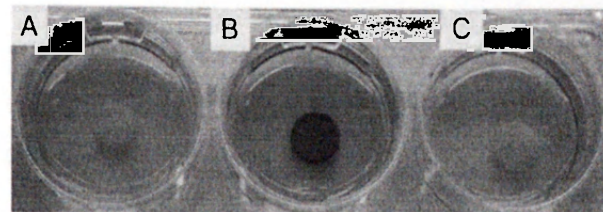


FIG. 7. (Color online) The color change of pH indicator (phenol red) by the metabolization of the fibroblasts in the wells with the samples of ceramics, resin, and red rubber and controls. Severe reduced metabolic activity in the dish with the red rubber sample. The color of medium changed from red to yellow [(a) ceramics, (b) red rubber, and (c) methylmetacrylate sample].

The increased metabolic activity of cellular proliferation reduced the pH of the medium and changed the indicator (phenol red) from red to yellow. The differences in color of the culture medium in the dishes with the ceramics, resin, and red rubber samples are shown in Fig. 7. A severely reduced metabolic activity in the dish with the red rubber sample is obvious (Fig. 7).

Statistical significant differences occur in both murine and human fibroblasts in the samples from methylmetacrylate (MMA) and red rubber when compared with the controls. The results obtained from the ceramic samples show no toxic effects on the human fibroblasts which correspond well with the use of ceramics in human medicine (Fig. 5). In contrast to human fibroblasts the proliferation activity of the murine fibroblasts decreases in the presence of ceramic targets (Fig. 5). Student's *t*-test at probability level of 0.05 was used to evaluate the differences of the component materials. In the case of murine fibroblasts statistically significant differences were found among all tested materials. On the other hand, using human fibroblasts no statistically significant differences appeared between titanium and ceramic targets. These outcomes show that any tested materials need to undergo an assessment with cells of the species the material is intended to be used in. The reaction of the cells to external material is species specific. Therefore the surface quality tests were provided only with the human fibroblasts.

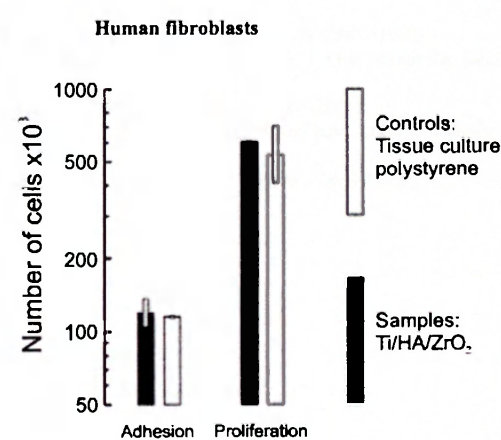


FIG. 8. Adhesion and proliferation of human fibroblasts on the surface of modified titanium target (black columns). The results are compare well with the growth of cells on tissue grade polystyrene (white columns). Ti/HA/ZrO₂ marks titanium modified with zirconia and hydroxyapatite

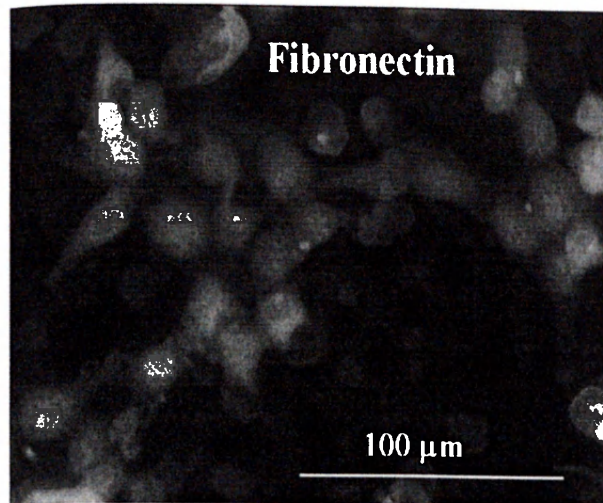


FIG. 9. (Color online) We confirmed the presence of fibronectin (marked in green color) in the human fibroblasts on the titanium target modified by zirconia and hydroxyapatite after 48 h cultivation (fluorescence microscope). In the photo the blue color marks the DAPI staining of the fibroblast nuclei.

C. Surface quality tests: Test of adhesion and proliferation

To test the characteristics of the titanium target's surface for cells we inoculated 50 000 human fibroblasts/cm² for adhesion and 10 000 human fibroblasts/cm² for proliferation. The quantity of cells harvested from the titanium target was compared with the quantity obtained from the same area of tissue grade polystyrene. Student's *t*-test was used at a probability level of 0.05. The test results show (Fig. 8) that the titanium target modified with HA and zirconia is at least as effective as the tissue grade polystyrene for adhesion and proliferation of the fibroblasts. This fact promises a possible way toward other research in dental implantology because perfect adhesion and proliferation of the cells are necessary for successful implantation. Our findings are in agreement with data published by Dion and Li, who used SEM to study the attachment and spreading of the murine fibroblasts.¹⁷

D. Fibronectin expression

The targets were impermeable to light so the growth and morphology of the cells could not be monitored with an optical microscope while being cultured. Using immunohistochemical staining enabled us to visualize the cells' growth on the surface of the targets.

Fibroblasts cultured for 72 h were spread well and created subconfluent growth. They expressed fibronectin in cytoplasm, which was stained a green color (Fig. 9). At that time no extracellular deposition of fibronectin was observed.

IV. CONCLUSION

Our main finding is that the surface quality test has proven that the samples of an implant with HA and the interlayer of zirconia produced by the pulsed laser deposition are readily colonized by murine and human fibroblasts. No cytotoxic effects have been found during our direct test of cytotoxicity.

The samples with various modifications could be used for other researches as well as open the possibility of its implantation into the bone. The pulsed laser deposition seems to be a promising method of coating the thin layers of zirconia and HA.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank V. Studnicka and K. Jurek for XRD, SEM, and WDX measurements, Dr. L. Mrklas for statistic evaluation, and M. Capová, E. Vancova, and P. Masinova for technical assistance. This research has been supported by the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic No. 8512-3.

- ¹J. Ericsson, K. Randow, and K. Nilner, *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2**, 70 (2000).
- ²S. Szmukler-Moncler, A. Piatelli, G. A. Favero, and J. H. Dubrille, *Clin. Oral Implants Res.* **11**, 12 (2000).
- ³S. Szmukler-Moncler, H. Salama, Y. Reingerwitz, and J. H. Dubrille, *J. Biomed. Mater. Res.* **43**, 192 (1998).
- ⁴L. Jonášová and J. Strnad, *Chem. Listy* **94**, 775 (2000).
- ⁵D. Kopecká and A. Šimůnek, *Cesk Stomatol.* **1**, 29 (2000).
- ⁶W. R. Lacey, *Implant Dent.* **7**, 315 (1998).
- ⁷J. L. Ong and D. C. N. Chan, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **28**, 667 (1999).
- ⁸L. Torrisi, S. Trusso, G. Di Marco, and P. Parisi, *Phys. Medica* **10**, 227 (2001).
- ⁹L. Himmlová, T. Dostálová, M. Jelínek, and C. Grimas, *Cesk Stomatol.* **6**, 224 (1999).
- ¹⁰M. Katto, M. Nakamura, T. Tanaka, and T. Nakayama, *Appl. Surf. Sci.* **197**, 768 (2002).
- ¹¹M. Jelínek *et al.*, *Thin Solid Films* **257**, 125 (1995).
- ¹²A. Šimůnek, J. Vokurková, and D. Kopecká, *Clin. Oral Implants Res.* **13**, 75 (2002).
- ¹³P. Ducheyne and Q. Qiu, *Biomaterials* **20**, 2287 (1999).
- ¹⁴N. Lumbikanonda and R. Sammons, *Int. J. Oral Maxillofac Implants* **16**, 627 (2001).
- ¹⁵Chou and E. Chany, *Scr. Mater.* **45**, 487 (2001).
- ¹⁶L. Himmlová, T. Dostálová, and M. Jelínek, *Lékař a technika* **6**, 126 (1999).
- ¹⁷C. Piconi and G. Maccauro, *Biomaterials* **20**, 1 (1999).

Biological and Physical Properties of Pulsed-Laser-Deposited Zirconia/Hydroxyapatite on Titanium: in Vitro Study

Z. Teuberova^a, M. Seydlova^a, T. Dostalova^a, B. Dvorankova^b, K. Jr. Smetana^b, M. Jelinek^c,
P. Masinova^c, T. Kocourek^c, K. Kolarova^d, and J. Wilson^e

^a Department of Prosthodontics, 1st Faculty of Medicine, Charles University,
Katerinska 32, 121 08, Prague, Czech Republic

^b Institute of Anatomy, 1st Faculty of Medicine, Charles University,
U Nemocnice 3, 121 08, Prague, Czech Republic

^c Institute of Physics ASCR, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic

^d Institute of Chemical Technology, Technicka 5, 166 28, Prague, Czech Republic

^e Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University,
Trojanova 13, 120 00, Prague, Czech Republic

e-mail: zuzana.teuberova@seznam.cz

Received July 24, 2006

Abstract—Coating dental implants with hydroxyapatite (HA) may give certain advantages such as active encouragement of new bone growth, a lower rejection rate, and an improved long-term prosthesis fixation. This study examined the mechanical and biological properties of titanium alloy implant cores with an interlayer of zirconia and a coating of HA created using pulsed layer deposition (PLD). The thickness of the zirconia layer was 50–100 nm, and that of the HA layer was ~600 nm. The crystallinity, morphology, wettability, and Ca/P ratio of the HA layer were investigated by electron microscopy, X-ray diffraction, goniometric measurement of contact angle, and wavelength dispersive X-ray analysis. The physical tests indicated adequate mechanical properties and a satisfactory adhesion to a titanium core modified with zirconia and HA. Cell proliferation and metabolic activity of human embryonal lung fibroblasts were determined using counting of harvested cells and providing an MTT assay. It was demonstrated that none of the samples were cytotoxic and their surfaces promoted cell colonization. PLD was found to be a promising method of applying coatings to a metal core for dental implants, and the in vitro biological tests suggest that the crystalline HA coating can improve the biological properties of titanium covered with zirconia.

PACS numbers:

DOI: 10.1134/S1054660X0701@@@

INTRODUCTION

A promising method to produce implants with suitable mechanical, physical, and biological properties is to cover metal or metal-alloy substrates with a thin film of biocompatible material [1]. The preferred coating for a substrate is hydroxyapatite (HA), $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ as one of the best known bioceramics [1]. Although HA has good biocompatibility, its mechanical strength is inferior to that of metal [2]. The brittle nature of HA requires it to be coated onto more resistant substrates such as titanium or titanium alloy $[\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}]$ [3]. Modifying the surface of a dental implant gives many advantages: improved osseointegration, enlargement of its surface area, better retention, and the permanent isolation of the metal core, protecting it from corrosion. Implants can be modified chemically by etching [4] or mechanically by cutting [5]; however, the most advanced way is to modify the surface of the implant with a thin layer of biocompatible material. Obtaining the required film thickness depends on the chosen deposition method, because there are some limitations with regard to the layer thickness and deposition time [1].

Depositing a thin film of a ceramic material onto metal is done routinely in the electronics industry [6]. There are several methods of coating implants: plasma spraying, magnetron sputtering, pulsed laser deposition (PLD), etc. The advantage of PLD is that it gives a finer control over layer thickness, crystallinity, and composition. The research into PLD is directed toward the creation of crystalline apatite films at a low substrate temperature [3]. This usually requires heat treatment in a controlled atmosphere to attain a high crystallinity [6]. The vacuum deposition technique creates high-quality coatings with effective bonding to either smooth or rough titanium surfaces [7]. The bonding at the HA/titanium interface can be improved by an intermediate layer such as zirconia (ZrO_2) between the HA coating and the titanium substrate [8, 9].

The aim of the study was to demonstrate the mechanical and biological qualities of PLD-created HA/zirconia coatings for use in implantology. We compared three types of samples: titanium alloy, titanium alloy coated with zirconia, and titanium alloy with an interlayer of zirconia and a coating of HA. All the lay-

Deposition conditions

Sample	Target	Substrate	Pressure, Pa	Temperature, °C	Number of pulses	Laser energy, mJ	Energy density, J cm ⁻²	Target-Substrate Distance, cm
ZRO—15, 16, 17	ZrO ₂	Ti	7 × 10 ⁻³	~20	10000	450	4	4
ZRO—18	ZrO ₂	Ti	4 × 10 ⁻³	~20	15000	450	4	4
ZRO—19	ZrO ₂	Ti	9 × 10 ⁻³	400	20000	450	4	4
ZRO—20	ZrO ₂	Ti	2 × 10 ⁻²	700	20000	450	4	4
ZHA—1, 2, 3, 4	ZrO ₂	Ti	3 × 10 ⁻³	~20	15000	300	4	4
ZHA—1, 2, 3, 4	HA	ZrO ₂ /Ti	40	600	20000	300	3	3

ers were created by PLD. We characterized the surfaces of different substrates for their biological qualities. We tested colonization, subsequent proliferation, and metabolic activity of human embryonal lung fibroblasts on the substrates. We had previously confirmed that these samples are not cytotoxic [10].

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

Zirconia oxide films were created using KrF excimer laser (LUMONICS PM 842) of a wavelength of 248 nm, a frequency of 10 Hz, and output energy of 450 mJ. Disks made of titanium alloy [Ti₆Al₄V] of diameter 10 mm or 12 mm were used as substrates. Laser energy density on the target was 4 J cm⁻². Layers were fabricated at three different substrate temperatures (*T_s*) of 20°C, 400°C, and 700°C (table). The zirconia films acting as buffer layers between the HA coating and the titanium alloy were only deposited at room temperature (20°C) (table). HA thin films were created on ZrO₂/Ti₆Al₄V substrates using a KrF excimer laser (LUMONICS PM 842) of wavelength 248 nm, repetition rate 10 Hz, and output energy 300 mJ. The deposition took place in an H₂O and Ar (ratio 22:18) atmosphere at a pressure of 40 Pa (table). Laser energy density on the target was 3 J cm⁻².

Physical Properties

Film thickness was measured by a mechanical profilometer Alpha Step 500 Surface Profilometer (TECNOR Instruments). Film morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JXA 733) using a 15-kV electron beam. The crystalline structure of the deposited films was characterized by X-ray diffraction (XRD). Parallel beam optics geometry with a Huber two-circle diffractometer powered by a rotating anode generator X-ray source (300 mA, 55 kV, CuK alpha radiation) was used. The Ca/P ratio of HA films was analyzed by wavelength dispersive X-ray analysis (WDX) by JEOL JXA 733.

Goniometric Measurement

Contact angle characterizes the surface wettability is one of the criteria for the protein sorption which promotes cell colonization and adhesion. The contact angle was measured using a surface energy evaluation system device (Masaryk University, Brno, Czech Republic) to an accuracy of ±5 degrees. Distilled water at room temperature was used as a test liquid. Drop volume was 10 µl (dosed by an automatic pipette, BRAND, Germany). Titanium samples were cleaned using acetone and ethanol prior to measurement. All samples were left in an H-MEM medium for two hours after measurement. After this procedure, they were washed with distilled water and measured again.

Biological Evaluation

A cell line of human embryonal lung fibroblasts was used for the biological testing (LEP₁₉) (Sevapharma, Czech Republic). Cell proliferation on the surface of the samples was evaluated by cell counting and by a MTT assay. The sterile samples were placed into 24-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark). Fibroblasts at a density of 22000 cells/cm² were seeded into each well in 1 ml of culture medium (EPL—Sevapharma, Prague, Czech Republic). Each sample had its own control—tissue-culture-grade polystyrene without any sample present. Cultivation proceeded for 120 hours at 37°C, 5% CO₂, and 100% humidity. After 48 hours, the medium was changed. On the fifth day, the cells were harvested from the sample's surface by 0.15% trypsin (SIGMA, Prague, Czech Republic). The fibroblasts were counted in the Burker chamber in the optical microscope (Nikon, Japan). The metabolic activity of the cells growing in the cultures was shown by MTT assay [11]. The culture medium was removed, and to each well we added 1 ml of 2 mM solution of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide – SIGMA, Prague, Czech Republic) in serum-free H-MEM medium. The cells were cultured for two hours at 37°C and 5% CO₂. The samples were transferred to new wells and the blue precipitate on their surface was diluted with 1.2 ml of isopropylalcohol. In the wells used as controls, the

solution of MTT was removed and the same volume of isopropylalcohol was added. The absorbance of the formed blue solution was measured using an EL 800 Universal Microplate Reader (Bio-tek Instruments, Highland Park, United States) at 570 nm. The results were statistically evaluated using Student's t-test at a probability level of 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

In the PLD method, the temperature of the substrate is an important factor [2]. It has been well documented that plasma-sprayed coatings suffer from low adhesion between coating and substrate, as well as low cohesion within the coatings [2]. On the other hand, vacuum deposition techniques produce high-quality coatings with good bonding to either smooth or rough titanium surfaces but usually require a heat treatment in a controlled atmosphere to attain high crystallinity [6]. XRD analysis shows that the crystalline HA is present in the samples created at a temperature of 600°C (Fig. 1).

The film thickness of the zirconia layers used for studying its physical properties ranged from 200 nm to 400 nm. Buffer layers of zirconia ranged from 50 nm to 100 nm. The thickness of the HA layers was approximately 600 nm.

Scanning electron microscopy (SEM) was used to study film morphology. A smooth surface covered with small droplets was observed for both HA and zirconia layers. The diameters of the droplets were similar for both HA and zirconia films (Fig. 2) and ranged in size from 1 μm to 5 μm . The density of the droplets was lower on the zirconia films.

Single zirconia films were tested for adhesion. Scratch and indentation tests were made. The critical normal force, which is the force when the coating is scratched down to the substrate, was measured. Adhesion tests showed that the critical normal forces were 3.0 N for the sample ZRO-18 and 7.2 N for the sample ZRO-20 (see table). A maximum normal force of 9.5 N was measured for the sample ZRO-19 deposited at 400°C. Indentation tests were made at 1470 N using a Rockwell cone indenter. No cracks in the zirconia layer were observed for the films created at 20°C. The films deposited at 700°C exhibited radial cracks, and those created at 400°C showed concentric circles around the indentation.

There are several reasons for coating implants with HA. From a mechanical point of view, HA is very brittle, like most ceramics, and cannot be used as an implant in a load-bearing application. There is no doubt that zirconia ceramics have mechanical properties superior to other biomaterials such as $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$, CoCr alloy, or alumina [12]. The use of HA-coated implants has been reported to stimulate bone healing, resulting in an improvement in the rate and strength of initial implant integration [5]. Hence, the dense HA layer on the top of a titanium substrate is mainly for biointegra-

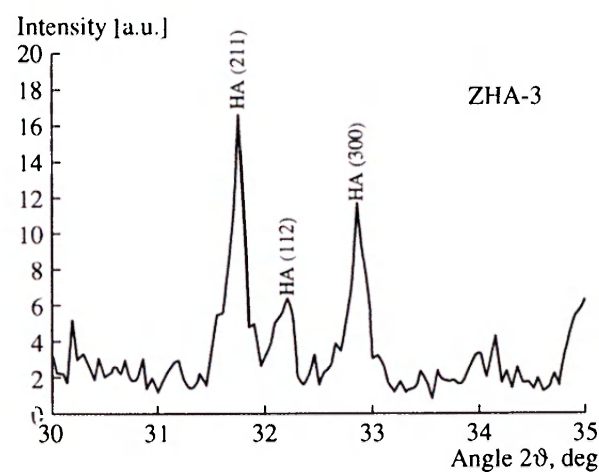


Fig. 1. XRD analysis show crystalline structure of HA layer of the sample ZHA-3.

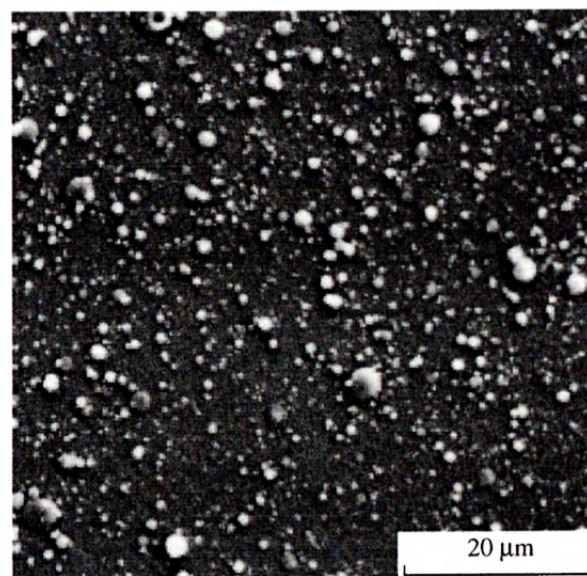


Fig. 2. Film morphology of the sample ZHA-2 (magn. $\times 2000$). The diameters of the droplets were similar for both HA and zirconia films and ranged in size from 1 μm to 5 μm .

tion to bone tissue and enhanced implant stability. Thus, it is believed that the use of HA coatings on metallic implants can speed the rehabilitation of patients by decreasing the time from implant insertion to final reconstruction [13].

The crystalline structure of the deposited films was studied by X-ray diffraction. Parallel beam optics geometry with a Huber two circle diffractometer powered by a rotating anode generator X-ray source (300 mA, 55 kV, CuK alpha radiation) was used. The

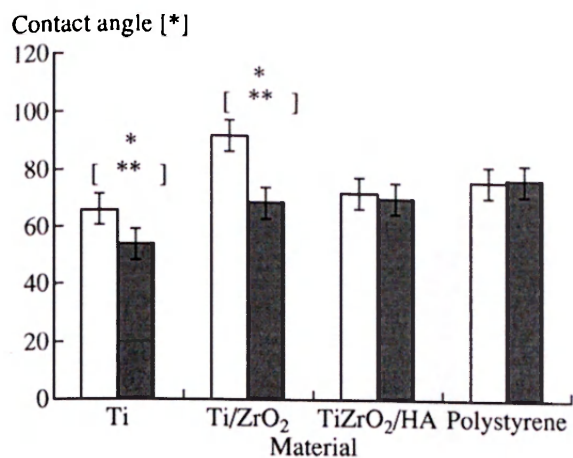


Fig. 3. Contact angle measurement, Ti—titanium alloy, Ti/ZrO₂—titanium alloy with zirconia layer, Ti/ZrO₂/HA—titanium alloy with the interlayer of zirconia and hydroxyapatite coating. White columns indicate clean samples, black ones after two hours in medium containing serum proteins (*—significantly higher comparing clean samples and samples after two hours in serum containing medium, **—significantly higher than control polystyrene). Columns without any symbol above were neither significantly higher nor lower.

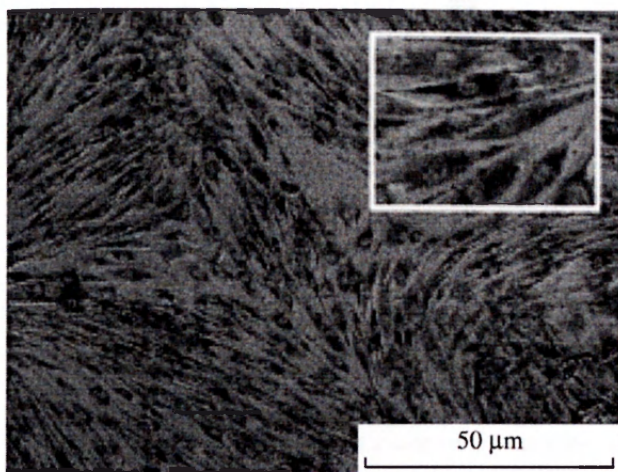


Fig. 4. Example of formazane crystal formation in fibroblasts cultured on polystyrene before the dilution and measurements in course of MTT test. Bar equates 250 μm.

crystalline structure of the HA films was confirmed (Fig. 2). XRD showed no crystallinity on the zirconia films for temperatures from 20 to 700°C.

HA dissolves in body fluid when its crystallinity is low. This means that amorphous HA has poor biocompatibility [14]. The influence of the ratio between crystalline and amorphous HA phases in the layer on the biological properties of the coating and on the coating

properties to be used in various implants has been frequently discussed [1]. The amorphous to crystalline HA conversion is dependent on both temperature and water vapor pressure [3].

The Ca/P ratio was measured by wavelength dispersive X-ray (WDX). The average Ca/P ratio of deposited HA films was 1.68. This is close to the value found in natural HA, which is 1.67. The optimal Ca/P ratio of HA films could be obtained at a substrate temperature of 575°C by depositing the film in a gas environment containing water vapor. Increasing the degree of crystallinity is important to improve stability and cell activity [3]. Experimental evidence shows that, during sintering of HA/zirconia composites, the diffusion of calcium oxide in zirconia takes place [12]. Diffusion of calcium ions from the HA topcoat to the zirconia bond coat occurred during the deposition of the plasma-sprayed HA coating on the zirconia surface. The diffusion should enhance the bonding at the HA/ZrO₂ interface [8]. It has been shown that crystal defects such as impurities, vacancies, or dislocations have an effect on diffusion phenomena, thereby influencing the dissolution rate. It has been suggested that a decrease in solubility occurs with increasing crystal growth [13].

The contact angle values for the samples are shown in Fig. 3. The results were statistically evaluated using Student's t-test at a probability level of 0.05. The contact angles of titanium/ZrO₂/HA and titanium alloy samples are in the optimal range for protein sorption [15]. The titanium/ZrO₂/HA and titanium/ZrO₂ samples showed higher values for the contact angle than the uncoated titanium alloy samples. All the measured contact angles decreased after the samples had been immersed in the H-MEM media containing serum proteins. No decrease was measured for the control of tissue-grade polystyrene. This decrease in the contact angle is an indication that protein sorption is taking place on the surface of the samples. Both polystyrene with a surface optimized for cell adhesion and proliferation and the tested titanium/ZrO₂/HA exhibited favorable growth of cells (including their metabolic activity). Both of these samples showed no and very low decreases of contact angles after the preincubation with media containing serum proteins. This observation can indicate similarities of both surfaces from the standpoint of surface properties.

The cells were able to grow in the presence of the tested targets (direct test of cytotoxicity). The morphology and proliferation rate of the cells were comparable with the control polystyrene (Fig. 4). None of the tested materials were found to be cytotoxic and they all allowed the growth of cells. The cells adhered to the samples' surfaces, proliferated, and formed uniform growth. The number of the cells growing on spot samples taken from the materials under test was statistically higher than on spot samples taken from tissue grade polystyrene (Fig. 5A). On the other hand, the metabolic activity of cells was highest on tissue-grade polystyrene

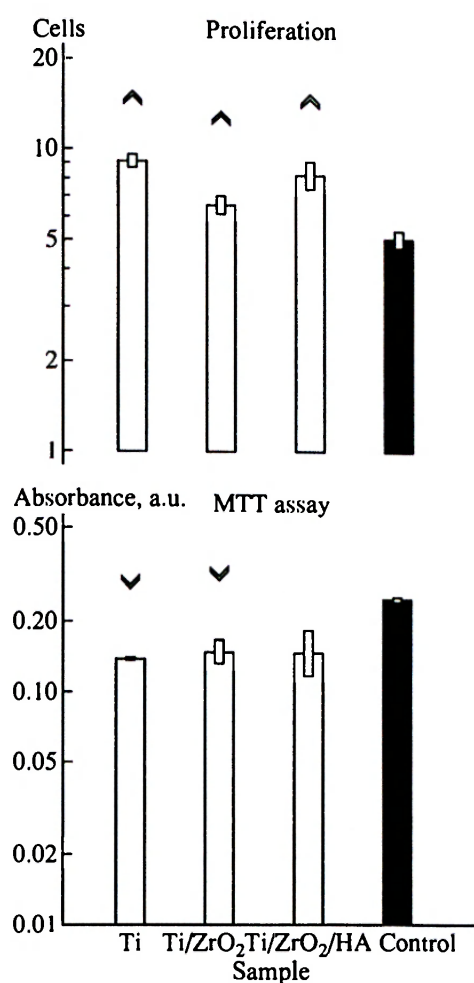


Fig. 5. A—Proliferation test by counting after statistical evaluation, y axis shows cell count per square cm. Image ^ means that these results are significantly higher than control samples. B—MTT assay after statistical evaluation, y axis shows light absorbance in arbitrary units. Image v means that the first two samples are significantly lower than control samples; columns without any symbol above were neither significantly higher nor lower. Ti—titanium alloy, Ti/ZrO₂—titanium alloy with zirconia layer, Ti/ZrO₂/HA—titanium alloy with the interlayer of zirconia and hydroxyapatite coating.

control, which is an optimal material for cell cultures (Fig. 5B). However, the highest metabolic activity of cells on samples was reached on the Ti alloy–ZrO₂–HA sandwich, even though the absolute number of cells was less (Fig. 5).

CONCLUSIONS

We found that a titanium alloy substrate with an interlayer of zirconia and a top coating of HA promotes the growth of fibroblast cells and is a suitable material for further development of dental implants. This material was found to be non-cytotoxic and supported the oxidative metabolism of studied cells. The HA coating with a buffer layer of zirconia has adequate physical and biological properties. The sandwich material could be used in further studies in order to prove that HA coating on a metal nucleus covered with a zirconia bond coat promotes the healing process and opens the possibility for the earlier rehabilitation of the patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank V. Studnicka for XRD, K. Jurek for SEM and WDX, J. Kadlec for adhesion measurement, and L. Mrklas for statistical evaluation.

This research has been supported by the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, no. 8512–3.

REFERENCES

1. T. Dostalova, M. Jelinek, L. Himmlova, et al., *Cell. Mater.* **6**, 117 (1996).
2. T. Nakayama, M. Kuwaa, and T. Matsutani, *Chin. J. Lasers B* **10**, 1 (2001).
3. O. Blind, L. H. Klein, B. Dailez, and L. Jordan, *Dent. Mater.*, **1** (2005).
4. L. Jonasova and J. Strnad, *Chem. Listy* **9**, 775 (2000).
5. D. Kopecka and A. Simunek, *Ceska Stomatolog.* **1**, 29 (2000).
6. W. R. Lacefield, *Implant Dent.* **7**, 315 (1998).
7. F. J. Garcia-Sanz, M. B. Mayor, J. L. Arias, et al., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **8**, 861 (1997).
8. B. Y. Chou and E. Chang, *Scr. Mater.* **45**, 487 (2001).
9. B. Y. Chou and E. Chang, *Surf. Coat. Technol.* **153**, 84 (2002).
10. M. Seydlova, Z. Teuberova, T. Dostalova, et al., *J. Appl. Phys.* **99**, 014905 (2006).
11. C. J. Kirkpatrick and A. Dekker, *Biomaterials—Tissue Interfaces* (Elsevier, Amsterdam, 1992).
12. C. Piconi and G. Maccauro, *Biomaterials* **20**, 1 (1999).
13. J. L. Ong and D. C. N. Chan, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **28**, 667 (1999).
14. T. Nakayama, T. Tanaka, Y. Tsumoto, et al., *Appl. Phys. A* **79**, 833 (2004).
15. M. Sato, E. B. Slamovich, and T. J. Webster, *Biomaterials* **26**, 1349 (2005).

SPELL: OK



Study of laser created ZrO₂ and hydroxyapatite/ZrO₂ films for implantology

M. Jelínek^{a,b,*}, T. Dostálová^c, Z. Teuberová^c, M. Seydlová^c, P. Mašínová^a,
T. Kocourek^a, W. Mróz^d, A. Prokopiuk^d, K. Smetana^e

^a Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic

^b Institute of Biomedical Research of Czech Technical University, Nám. Sítná 3105, 27201 Kladno, Czech Republic

^c Department of Stomatology, 1st Medical Faculty, Charles University, Kateřinská 32, Prague 2, Czech Republic

^d Institute of Optoelectronics, MIT, 2 Kaliski Str., 01-489 Warsaw 49, Poland

^e Institute of Anatomy, 1st Medical Faculty, Charles University, U. nemocnice 3, 128 00 Prague 2, Czech Republic

Abstract

Thin films of ZrO₂ and hydroxyapatite/ZrO₂ were created by excimer laser ablation on Ti6Al4V substrates. ZrO₂ layers were fabricated in vacuum by KrF laser at various substrate temperatures and hydroxyapatite (HA) layers were fabricated in water vapor ambient by ArF laser and in water vapor/argon ambient by KrF excimer laser. Film properties were evaluated by XRD, SEM and WDX methods. The test of mechanical adhesion was proceeded on ZrO₂ films. XRD analysis proved the presence of amorphous or crystalline HA in the deposited films. SEM method demonstrated smooth surface covered by droplets for both HA and ZrO₂ films. Ca/P ratio of the HA films is higher than that of the natural HA and is within the range of 2.8–3.0. The HA/ZrO₂ and ZrO₂ samples were tested in vitro for cytotoxicity. The best results were received by the HA/ZrO₂ samples in the test of cytotoxicity. Fibroblasts cultivating with HA/ZrO₂ samples exhibited subconfluent and confluent growth and showed fibronectin homogenously.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

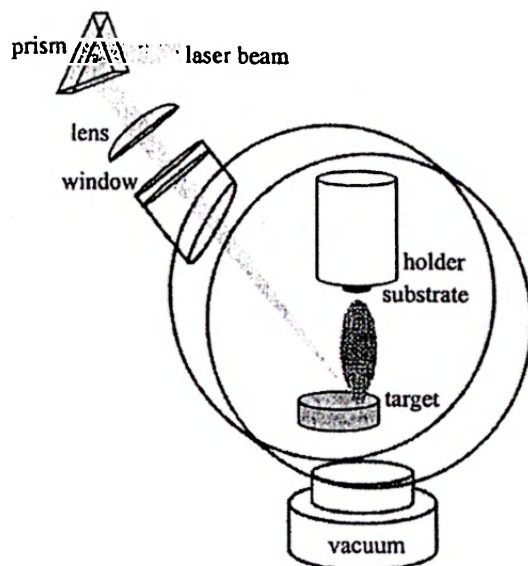
Keywords: Hydroxyapatite; Pulsed laser deposition; X-ray diffraction analysis

1. Introduction

Hydroxyapatite [HA; Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] ceramics have been recognized as substitute materials for teeth in dentistry for long time. The method of pulsed laser deposition (PLD) was successfully used to create HA coatings and these were studied in vitro and in vivo (Jelínek et al., 1995, 1996; Dostálová et al., 2001). HA-coated implants have shown good fixation to the host bones and increased bone ingrowth into the implants. However, there are still many concerns about the application of HA coatings due to their poor mechanical stability. Some previous studies have shown that mechanical properties of HA coatings can be improved by adding ZrO₂. One of the approaches is to create HA/ZrO₂ composite coatings. HA coating reinforced by zirconia shows better dissolution behavior while tested in vitro than HA coating (Chang et al.,

1997). Alternatively, HA/ZrO₂ coatings are fabricated with the ZrO₂ layer as a bond coat (Chou and Chang, 1999, 2002). Zirconia (ZrO₂) is used to strengthen the brittle materials due to its good mechanical properties, especially strength, toughness and high Young's modulus. Zirconia at various forms has been studied of biocompatibility by many authors. Several reports evaluating zirconia in vitro were published (Piconi and Maccauro, 1999). Calcium partially stabilized zirconia (CaYPSZ) was studied by SEM in presence of 3T3 fibroblasts (Tateishi et al., 1994). Adhesion and spreading of cells was observed and a cell monolayer was created. By test of cell viability and MTT assay, biocompatibility of zirconia and yttrium partially stabilized zirconia (YPSZ) was examined (Davidson et al., 1992; Li et al., 1993). In both cases no cytotoxic effect was analyzed. No toxic effects on cell cultures of 3T3 fibroblasts were also shown while testing YPSZ in the indirect contact, cell viability and MTT assay (Dion et al., 1994). While cultivating YPSZ with human oral fibroblasts, ion release was observed and toxicity was related to the release (Bukat et al., 1990). In vivo, different zirconia materials in many various physical forms such as pellets, bars or cylinders

* Corresponding author. Tel.: +420 2 6605 2733; fax: +420 2 8689 0527.
E-mail address: jelinek@fzu.cz (M. Jelínek).

Fig. 1. Experimental set-up of ZrO₂ film deposition.

were implanted in bone or soft tissues (Piconi and Maccauro, 1999). In general, no adverse responses were analyzed. In the early postoperative phase, connective tissue between bone and ceramic was usually observed.

This contribution is oriented to study thin ZrO₂ and HA layers created by PLD. Results of physical, mechanical and biomedical in vitro tests in connection with deposition conditions are presented.

2. Experimental details

For layer deposition ArF and KrF excimer lasers were used. Zirconia oxide films were fabricated by KrF laser deposition (LUMONICS PM 842, repetition rate of 10 Hz, output energy of 450 mJ). Target was fixed in the distance of 4 cm from the substrate (Fig. 1). Laser energy density on the target was 4 J cm⁻². Layers were fabricated onto titanium alloy Ti6Al4V substrates (diameter of 10 or 12 mm and thickness of 2 mm) at three substrate temperatures: 20, 400 and 700 °C. Before the deposition the substrates were cleaned in acetone, toluene and in ethylalcohol. The ZrO₂ films, which were supposed to be buffer layers for

HA/ZrO₂ coatings, were fabricated only at room temperature. Thickness of buffer layers was 100 nm (4000 laser pulses).

Two sets of HA layers were fabricated on ZrO₂/Ti6Al4V substrates – one set of layers was created by ArF (193 nm output wavelength) and the second by KrF (248 nm) laser deposition. The first set was created at repetition rate of 50 Hz, output energy of 330 mJ and energy density of 6 J cm⁻² – see set-up in Fig. 2. The deposition was proceeded in the H₂O atmosphere at the pressure of 50 Pa. The target was fixed in the distance of 3 cm from the HA substrate and heated up to 600 °C (Fig. 2). The second set of HA layers was fabricated by KrF deposition again on ZrO₂/Ti6Al4V substrates at 600 °C of substrate temperature. Energy density was 3 J cm⁻², target-substrate distance of 6 cm, and argon + water pressure of 40 Pa (Ar/water = 0.8).

Film thickness was measured by mechanical profilometer Alpha Step 500. Crystalline structure of the deposited HA/ZrO₂ films was characterized by X-ray diffraction analysis (XRD). Parallel beam optics geometry with a Huber two circle diffractometer, powered by a rotating anode generator X-ray source (300 mA, 55 kV, Cu K α radiation) was used. Film morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JXA 733) using 15 kV electron beam and 400 \times magnification. The Ca/P ratio was studied using an electron microprobe and wavelength dispersive X-ray analysis (WDX). Single ZrO₂ films were tested of adhesion by scratch and indentation tests. In the scratch test the load was increasing from 0 to 50 N. The indentation test was carried out by a Rockwell cone indenter at load of 1470 N.

3. Results and discussion

3.1. Physical and mechanical analysis

All ZrO₂ layers fabricated at three various substrate temperatures were amorphous. Film surface was smooth covered with small droplets (see Fig. 3). Adhesion, exhibited as critical normal force, was in the range 3.0–9.5 N. Maximum force was for samples deposited at 400 °C. Example of abrasion trace is in Fig. 4. No cracks in ZrO₂ layers were observed for films created at 20 °C. The film deposited at 700 °C exhibited radial cracks and the indentation in films created at 400 °C formed concentric circles around the puncture (Fig. 5).

The HA layers created by ArF excimer laser were crystalline (see Fig. 6), and layers created by KrF laser were amorphous and only partly crystalline. The reason can be not only in laser deposition wavelength, but also in energy density and ambient atmosphere. Example of HA film morphology is in Fig. 7. The Ca/P ratio of the films was \sim 3.0. Content of calcium in droplets was lower (Ca/P: \sim 2.8).

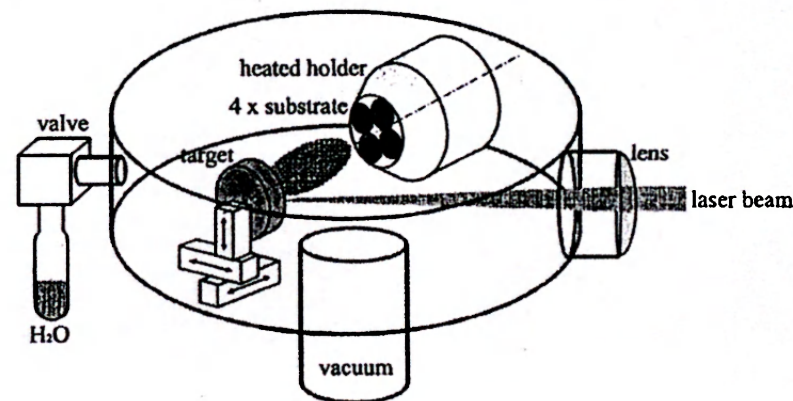


Fig. 2. Experimental set-up of HA film deposition.

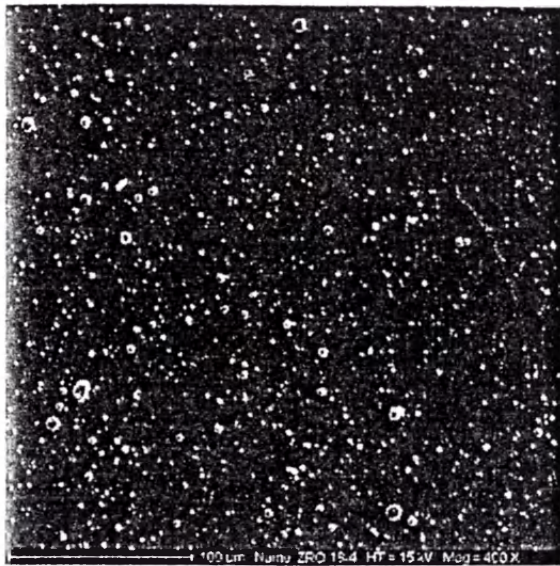


Fig. 3. Film morphology by SEM of ZrO_2 coating (magnification 400 \times)—sample ZRO-18 (ZRO-18 deposited by KrF laser at the repetition rate of 10 Hz, the output energy of 450 mJ, the energy density of 4 J cm⁻² and the substrate temperature of 20 °C).

3.2. Biological tests of HA/ZrO₂ coatings

Direct test of cytotoxicity was used to evaluate the biocompatibility of HA/ZrO₂ samples. Mice line and human fibroblasts were cultivated in the presence of different materials including the studied samples. The Noritake ceramics was used as a positive control and two materials as a negative control—a sample of red artificial rubber and a sample of dental resin Superpont C + B. The best results were reached for the HA/ZrO₂ samples. (Table 1) No morphology changes were observed during cultivation. The cytotoxicity of the HA/ZrO₂ samples was not proved.

In the test of attachment, amounts of attached fibroblasts onto the surface of the sample and onto the bottom of the dish

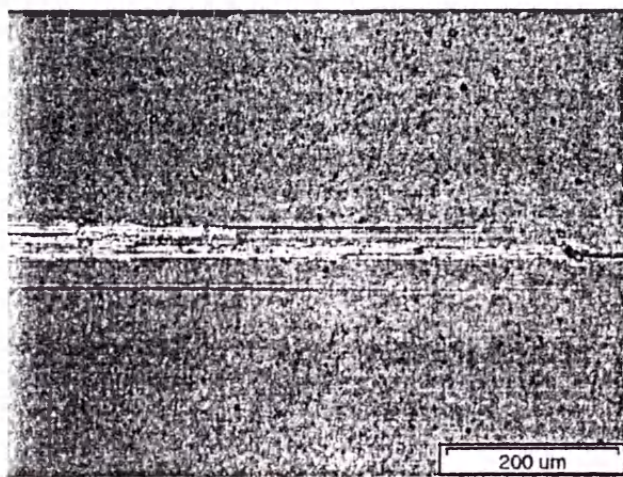


Fig. 4. Scratch test of ZrO_2 coating—sample ZRO-19 (ZRO 19 deposited by KrF laser at the repetition rate of 10 Hz, the output energy of 450 mJ, the energy density of 4 J cm⁻² and the substrate temperature of 400 °C).

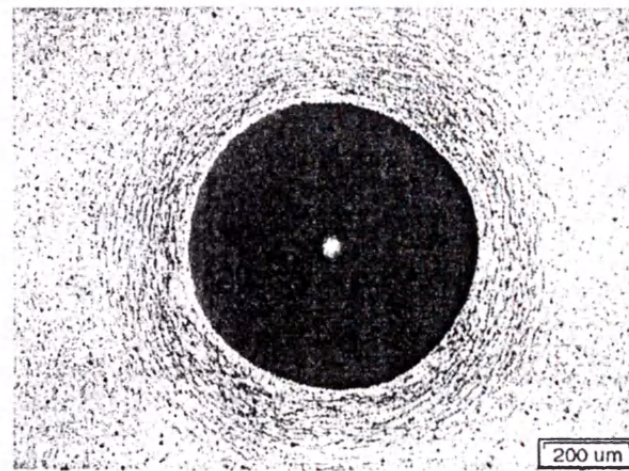


Fig. 5. Indentation test of ZrO_2 coating—sample ZRO-19.

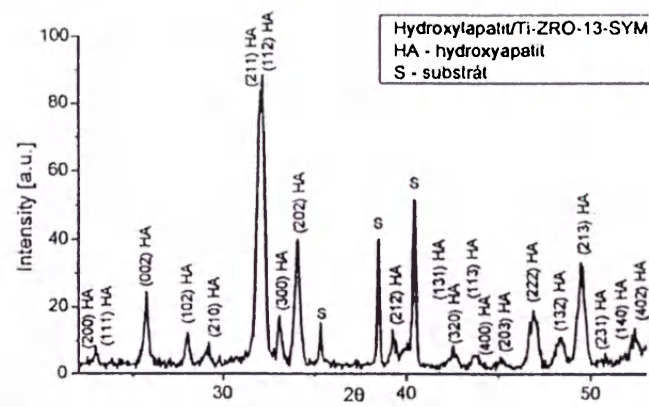


Fig. 6. XRD spectrum of HA/ZrO₂ coating—sample ZRO-13 (ZRO-13 deposited by ArF laser at the repetition rate of 50 Hz, the output energy of 330 mJ and the energy density of 6 J cm⁻²).

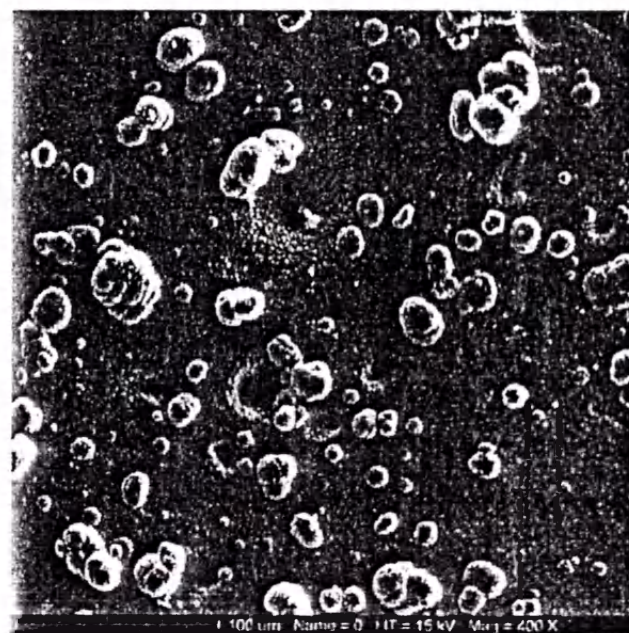


Fig. 7. Film morphology of HA/ZrO₂ coating by SEM (magnification 400 \times)—sample ZRO-13.

Table 1

Test of cytotoxicity of HA/ZrO₂ coatings (samples 1–3 deposited by ArF laser at repetition rate of 50 Hz, output energy of 330 mJ and energy density of 6 J cm⁻²)

Material	Proportional number of cells (%)							
	Mice fibroblasts				Human fibroblasts			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Average value	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Average value
HA/ZrO ₂	81	71	81	78	98	89	95	94
Red rubber	9	9	6	8	0	0	0	0
Ceramics	50	82	63	65	58	74	89	74
Resin	47	28	54	43	30	25	21	25

Table 2

Tests of attachment and spreading of HA/ZrO₂ coatings (sample deposited by ArF laser at repetition rate of 50 Hz, output energy of 330 mJ and energy density of 6 J cm⁻²)

Test	Count of cells (1000×)		
	Sample surface	Sample surroundings	Control cultivation
Attachment	58.5	51.5	130.0
Spreading	333.0	378.0	713.0

were numbered in the Burkert counting cella in an optical microscope. Human fibroblasts were plated at a density of 1×10^5 cells per ml into the plates containing the HA/ZrO₂ samples. The cells were cultivated in an incubator at the temperature of 37 °C, at 3.3% pressure of CO₂ and at 100% humidity in H-MEMd medium. Dishes without samples were used as control. After 24 h of cultivation, there were 53% of cells attached onto the surface of the sample and 47% of cells attached onto the bottom of the dish. Total amount of the attached cells fits well with that of control cultivation (Table 2).

In the test of spreading, the human fibroblasts were cultivated for 96 h. The fibroblasts were plated at the density of 20,000 cells/ml in 1 ml volume of cultivating medium to the HA/ZrO₂ samples. Cultivation proceeded for 96 h, at the temperature of 37 °C, at 3.3% pressure of CO₂ and at 100% humidity. Each test has its own control with no samples. There was 47% growth of the cells on the surface of the sample and 53% growth of the cells in the surroundings (Table 2). The sum of the cells on the sample and in its surroundings is well comparable with the number of cells in the control cultivation.

Two of the HA/ZrO₂ samples were separated after 72 h of the cultivation processed in the test of spreading to study the immuno-histochemical reaction. The fibroblasts created sub-confluent and confluent growth.

4. Conclusions

Thin films of HA were grown by pulsed laser deposition on the titanium alloy Ti6Al4V with intermediate ZrO₂ buffer layers. For HA deposition ArF and KrF excimer lasers were used. Films were crystalline or amorphous depending on deposition conditions. Scanning electron microscopy demonstrated smooth surface covered by droplets with the diameters

of 5–20 μm in case of HA/ZrO₂ films and of 1 or 2 μm in case of single ZrO₂ films. The Ca/P ratio of crystalline HA films was higher than that of natural HA and it differed within the range of 2.8–3.0. Single ZrO₂ films were tested of adhesion. In the scratch test, maximum value of critical normal force was measured for ZrO₂ film deposited at 400 °C. The indentation test showed different reaction of the ZrO₂ samples. For ZrO₂ film deposited at 20 °C no cracks were observed while for films deposited at higher temperature the cracks were observed. Biocompatibility of the HA/ZrO₂ films was the best of all tested samples. After 24 h the test of attachment showed that 53% of cells have attached on the surface of the sample and 47% of cells have attached in the surroundings. The test of spreading showed the 47% growth of the cells on the surface of the sample and the 53% growth of the cells in the surroundings. The fibroblasts created subconfluent and confluent growth and showed fibronectin homogenously.

Acknowledgements

This project was supported by the GA ASCR, Project No. A1010110 and IGA No. 8512-3. Our thanks should be also expressed to CTU Research Project No. 6640770030 and No. 88/1.

References

- Bukat, A., Fassina, P., Greco, F., Piantelli, S., Piconi, C., Zaghini, N., 1990. In: Hulbert, J.E., Hulbert, S.F. (Eds.), *Bioceramics*, vol. 3. Terre Haute, pp. 355.
- Chang, E., Chang, W.J., Wang, B.C., Yang, C.Y., 1997. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8, 201.
- Chou, B.Y., Chang, E., 1999. *Biomaterials* 20, 1823.
- Chou, B.Y., Chang, E., 2002. *Surf. Coat. Technol.* 153, 84.
- Davidson, J.A., Mishra, A.K., Poggie, R.A., Wert, J.J., 1992. In: *Proceedings of the Transaction of 38th ORS*. p. 404.
- Dion, I., Bordenave, L., Lefebvre, F., 1994. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5, 18.
- Dostálová, T., Himmlová, L., Jelinek, M., Grivas, C., 2001. *J. Biomed. Opt.* 6 (2) 239.
- Jelinek, M., Olšan, V., Jatrábik, L., Studnička, V., Hnatowicz, V., Kvitek, J., Havránek, V., Dostálová, T., Zergioti, I., Petrakis, A., Hontzopoulos, E., Fotakis, C., 1995. *Thin Solid Films* 257, 125.
- Jelinek, M., Dostálová, T., Fotakis, C., Studnička, V., Jatrábik, L., Havránek, V., Grivas, C., Hnatowicz, V., Kadlec, J., Patentlakis, A., Peřina, V., Pospíchal, M., 1996. *Laser Phys.* 6 (1) 144.
- Li, J., Liu, Y., Hermansson, L., 1993. *Clin. Mater.* 12, 197.
- Piconi, C., Maccauro, G., 1999. *Biomaterials* 20, 1.
- Tateishi, T., Hyodo, K., Kondo, K., Miura, K., 1994. *Mater. Sci. Eng. C1*, 121.