

SZTE Fogorvostudományi Kar, Fogpótlástani és Orális Biológiai Tanszék, Szeged*
 SZTE Általános Orvostudományi Kar, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szeged**
 SZTE Természettudományi és Informatikai Kar, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék, Szeged***
 SZTE Fogorvostudományi Kar, Szájsebészeti Tanszék, Szeged****

Dekontamináló anyagok hatása a titánfelszín biointegrációs tulajdonságaira: *in vitro* humán epithel sejtkultúra vizsgálatok

DR. UNGVÁRI KRISZTINA*, DR. PELSŐCZI K. ISTVÁN*, KORMOS BERNADETT**, OSZKÓ ALBERT***,
 DR. RADNAI MÁRTA*, DR. NAGY KATALIN****, DR. FAZEKAS ANDRÁS*, DR. TURZÓ KINGA*

A peri-implantitisz terápiájában a kontaminálódott fogászati implantátum-felszín fertőtlenítése és kémiai tisztítása alapvető fontosságú. Fontos azonban az is, hogy a tisztítás ne eredményezzen a titánfelszínen olyan változást, ami az implantátum biointegrációra való alkalmasságát hátrányosan befolyásolná. A szerzők Grade 4-es tisztaságú, esztergált felszínű CP titán korongokat (CAMLOG™ Biotechnologies AG, Svájc) kezeltek 3% H₂O₂-dal (5 perc), túlteltett citromsavval (pH = 1; 1 perc) vagy klórhexidin géllal (5 perc). A korongok felszínét kezelés előtt és után atomi erő mikroszkóppal (AFM) és röntgen-fotoelektron spektroszkóppal (XPS) vizsgálták. A biointegrációra való alkalmasság minősítésére humán orális epithel sejtek 24 óra eltelte utáni kitapadását és 72 óra alatt bekövetkező sejtosztódását értékelték a szerzők dimetiliazolil-difeniltetrazólium bromid (MTT) teszttel és bicinkoninil sav (BCA) fehérje-meghatározó módszerrel. Az AFM mérések nem mutattak szignifikáns különbséget a felületek kezelés előtti és utáni érdessége között. Az XPS eredmények alapján a TiO₂ réteg (1-25 nm) szerkezete a kezeléseket követően egyik mintán sem változott. Az MTT és BCA vizsgálatok hasonló mértékű sejttapadást mutattak mindegyik vizsgálati csoportban, a sejt-prolifерáció MTT vizsgálatának eredménye viszont szignifikánsan magasabb értékű volt a H₂O₂-dal kezelt korongok esetében, mint a klórhexidin géllal kezelt korongokon. KÖVETKEZTETÉSEK A vizsgált korongok felszínén a dekontamináló anyagokkal való kezelés nem járt a biointegrációra való alkalmasságot károsan befolyásoló hatással. A H₂O₂-dal történő tisztítás után némileg növekedett a sejtosztódás mértékének a mutatója, a klórhexidin gélhez viszonyítva.

Kulcsszavak: peri-implantitisz, implantátumfelszín, dekontamináció, epithel sejtkultúra

Bevezetés

A titánnak és ötvözeteinek kedvező tulajdonságai miatt, széles körű orvosi és fogorvosi alkalmazásai ismertek [21, 24]. Erősen reaktív fém, nanoszekundumok (10⁻⁹ s) alatt 20–100 Å vastagságú oxidréteg keletkezik a felszínén. Ez a réteg átjárhatatlan az oxigén és más szennyeződések számára, ezáltal korróziórezisztenssé válik [19]. Kis sűrűsége (4,43 g/cm³; az acélnál 45%-kal könnyebb, de ugyanolyan erős) és kiemelkedő biokompatibilitása teszi a fogászati implantológia illetve az arc-, állcsont- és szájsebészet ideális anyagává.

Az implantátumok élettartamát az anyaguk, szerkezetük és az adott igénybevétel mellett nagymértékben befolyásolja a környező lágy- és keményszövetek (az alveoláris csont, a kötőszövet és a hámréteg) állapota. A fogászati műgyökerek behelyezését követő esetlegesen kialakuló szövődményekért általában eme szövetekben kialakuló, gyorsan terjedő gyulladás a felelős.

A peri-implantális gyulladások közül a peri-implantális mucositis olyan reverzibilis gyulladás, amely az implantátum körüli lágyszöveteket érinti, csontpusztulás nélkül. Ezzel szemben a peri-implantitisz esetén lágys- és keményszövetekre terjedő gyulladás figyelhető meg, mely visszafordíthatatlan, és csontlebontódással jár [2, 39]. Három, klinikailag releváns tanulmányban Brånemark-implantátumok behelyezése után követéses vizsgálatokat végeztek, hogy a peri-implantitisz előfordulási gyakoriságát meghatározzák [11, 28, 29]. *Fransson és mtsai* [11] minimum 5 éves követés során 662 páciens esetében, 3413 behelyezett implantátumot vizsgáltak. A páciensek 28%-ában progresszív csontpusztulást (egyéves és több mint ötéves vizsgálat között kialakult csontpusztulás) tapasztaltak. Az implantátumok számára vonatkoztatva, ez a százalék 12,4% volt. *Renvert és mtsai* [28] átlagosan 10,8 éves követéses vizsgálatukban (213 páciens, 976 Brånemark-implantátummal) azt tapasztalták, hogy a behelyezett implantátumok 14,9%-ánál volt több mint három csavar-

Érkezett: 2010. július 1.

Elfogadva: 2010. augusztus 30.

menetnyi csontpusztulás. Ez minimum 1,8 mm-nyi csontvesztésnek felel meg, és ezt tekintették peri-implantitisznek. *Roos-Jansáker és mtsai* [29] 9–14 éves követéses vizsgálatot végeztek 218 páciens 1057 implantátumának behelyezését követően. A klinikai és radiológiai értékelés szerint, kimutatták, hogy a páciensek 16%-ánál (kortól, nemtől, behelyezés helyétől, dohányzási szokásoktól függetlenül) alakult ki peri-implantitisz, míg az implantátumokra vonatkoztatva 6,6%-nál. A peri-implantitisz meghatározásánál szintén a 3 csavarmenetnél nagyobb csontpusztulást vették figyelembe. Az előfordulás gyakoriságában tapasztalható különbségek többféle okra vezethetők vissza. Többek között a peri-implantitisz diagnosztikai kritériumainak meghatározása, az implantátum behelyezésének konkrét jellemzői és a páciensek különböző gyógyulási hajlama is hozzájárulhat a különbség kialakulásához. A fertőzés és a mechanikai faktor (túlterhelés a suprastruktúra elkészítését követően) döntő fontosságú a peri-implantális gyulladások etiológiájában [38]. Habár az okok különbözők, mindkét faktor esetében bakteriális kolonizáció figyelhető meg az implantátum felszínén [18, 27]. A dentális implantátum körüli gyulladás kialakulásáért és fennmaradásáért leginkább a Gram-negatív anaerob mikroflóra a felelős [20]. Ha a környezeti tényezők a kórokozók számára optimálisak, akkor a baktériumok és toxinjaik nagymértékben felhalmozódnak, és gyorsan progrediáló, apikálisan terjedő csontpusztulás alakul ki, amely súlyos esetben az implantátum elvesztéséhez vezet.

A peri-implantitisz terápiájában az elhalt szövet maradéktalan eltávolítása és a kontaminálódott felszín tisztítása alapvető fontosságú, amelyet sebészi technikákkal egészíthetünk ki. Az implantátum felszínének tisztítása történhet mechanikai úton (homokfúvás), kémiai anyagokkal (citromsav, foszforsav, H_2O_2 , klórexidín-diglukonát [CHX], delmopinol, jód, klóramin-T, etiléndiamin-tetraecetsav [EDTA]) vagy különböző lézerek segítségével (CO_2 , dióda, Er:YAG, Nd:YAG). Sebészeti beavatkozásként alkalmazható az irányított szöveti regeneráció, a csontgraftok és -membránok különböző típusai [18, 33]. Súlyos esetben, szisztémás és lokális antibiotikum kezeléssel egészíthetjük ki a terápiát [14, 27, 33, 36].

A CHX általánosan alkalmazott szer a fogorvosi kezelések során, szájbölgőgetőként és helyi antimikrobiális szerként is javasolják. A peri-implantitisz terápiájában a CHX oldatát öblögetőként, gyakran átöblítő oldatként használják, kiegészítve szisztémás antibiotikum adással [1, 14, 30, 33]. *Renvert és mtsai* [25, 26] a CHX és a minociklin hatásosságát vizsgálták. Tapasztalataik alapján a minociklin a periimplantális tasak szondázási mélységére és a vérzési index alakulására is pozitív hatással volt, míg a CHX csak enyhén csökkentette a vérzési index értékét. A CHX alkalmazása hatékony kiegészítésnek bizonyult sebészi terápia esetében is, irányított szöveti regeneráció során [12, 35].

Barbour és mtsai [6] vizsgálták a CHX kötődését

anatáz és rutil TiO_2 kristályokhoz. Kísérleteik során a CHX-et foszfát- és 4-morfolinoetánszulfonil sav (MES) pufferben vitték fel a TiO_2 kristályokra. Több CHX kötődött az anatáz TiO_2 kristályokhoz mint a rutilhoz, és gyorsabban vált le (deszorbeálódott) az anatázzal, mint a rutilról, a puffertípustól függően. Burchard [8] tanulmánya alapján a fibroblasztok szívesebben tapadnak ki a CHX-el kezelt felületre, mint az ön-fluorid-dal (SnF_2) kezeltre.

A peri-implantitisz sebészi kezelése során túltelített citromsav-oldatot is gyakran használnak a kontaminálódott implantátum tisztítására [10, 34]. Érdes Ti implantátumok felszínének (Nobel BiocareTM, Göteborg, Svédország) plakkal történő kontaminálódása után, a citromsavas és a 10%-os H_2O_2 -os kezelés hatására, azt tapasztalták, hogy mindkét anyag esetén újból összeintegrálódtak az implantátumok [3]. A 3%-os H_2O_2 hatásosnak bizonyult a peri-implantitisz sebészi terápiájában is, membrán alkalmazása esetén [31, 32].

Khoury [14] vizsgálataiban ennek a három anyagnak (citromsav, CHX és H_2O_2) a kombinációját alkalmazta a peri-implantitisz sebészi terápiájában. Az elhalt szövetek eltávolítása után a kontaminálódott implantátumfelszín többször CHX-el mosta, majd citromsavval kezelte 1 percre, amelyet H_2O_2 -dal és fiziológiás sóoldattal öblített le.

Dennison és mtsai [9] azt tapasztalták, hogy könnyebb a bevonat nélküli esztergált felszínű implantátumokat dekontaminálni citromsavval vagy CHX-vel, mintha hidroxí-apatittal lenne borítva a felszín.

A CHX, a citromsav és a H_2O_2 gyakran alkalmazott kémiai ágensek a peri-implantitisz terápiájában. A szakirodalomban nem találtunk olyan tanulmányokat, amelyek azt vizsgálták volna, hogy ezek az anyagok megváltoztatják-e a titán (Ti) felszín összetételét, felületi érdességét, és ezáltal befolyásolják-e a biológiai környezet választ. Kísérleteink tervezésekor azt tűztük ki célul, hogy nyomon kövessük az egyes anyagokkal történő kezelést követően a Ti felület összetételében, érdességében bekövetkezett esetleges változásokat. Vizsgáljuk továbbá a humán epithél sejtek tapadási és proliferációs készségének változását a próbatetek felületén, és értékeljük a biológiai környezet választ a különböző dekontamináló anyagokra.

Vizsgálati anyag és módszer

CP grade 4-es tisztaságú esztergált felszínű Ti korongokat használtunk (átmérő: 9 mm, vastagság: 1,5 mm, CAMLOGTM Biotechnologies AG, Svájc) a fogászati implantátumok nyaki részére jellemző érdességgel ($R_a < 0,2 \mu m$) [7]. A korongokat acetonnal és abszolút etánollal mostuk ultrahangos fürdőben, 15 percre. Tisztítás után a próbatesteket 3%-os H_2O_2 -vel, túltelített citromsavval (pH=1) vagy CHX géllal (Corsodyl dental gel; SmithKline Beecham Consumer Healthcare, Nagy-Britannia) kezeltük. A Corsodyl 1% w/w CHX-t tartal-

maz. A kezelés időtartamát 5 percen határoztuk meg a H_2O_2 és a CHX gél esetében, míg 1 percen a citromsavnál. A kezeléseket után a próbatesteket háromszor mostuk ultratiszta vízzel, majd levegőn szárítottuk. A kontroll-csoportot ultratiszta vízzel mostuk 5 percig.

Az AFM vizsgálatot a PSIA XE-100 készülékkel (Dél-Korea) végeztük. Az AFM módszer lehetőséget nyújt a felszín érdességének mikronos-nanométeres nagyságrendű vizsgálatára, miközben a szilikon tartókarra rögzített AFM tű (típusa: P/N 910M-NSC36 (MikroMasch Eesti OU, Észtország) megközelíti és eltávolodik a vizsgált felszíntől. A vizsgálatokat kontakt módban végeztük, a magassági, deflektációs és a 3D képeket rögzítettük. $10 \times 10 \mu m$ és $5 \times 5 \mu m$ -es felvételeket készítettünk. Az érdesség (R_a) meghatározását az AFM software program segítségével végeztük (legalább 6 független mérés alapján).

A Ti felszín kémiai összetételét XPS készülék segítségével értékeltük. A fotoelektronok Al $K\alpha$ primer sugárzásból származtak ($h\nu = 1486,6 \text{ eV}$), melyeket hemiszférikus elektronenergia-analizátor segítségével értékeltünk (PHOIBOS 150 MCD 9; SPECS). A röntgenágyút 150 W-on működtettük (12 kV, 12,5 mA). A kötési energiát normalizáltuk a bekötött szén C 1s csúcsához viszonyítva (285,1 eV). Az XPS spektrumban mutatkozó változásokat 30–60 perc He^+ bombázást követően detektáltuk. A He^+ ionokat ionágyúval (5 kV) generáltuk, és a beeső ionsugarat 200 nA-nél mértük. A bombázás kb. 10 nm felszíni anyagot távolított el. Széles illetve nagy felbontású, keskeny spektrumokat vettünk fel, és a Ti 2p, O 1s és C 1s karakterisztikus vonalakat vizsgáltuk.

Sejtkultúra-vizsgálatok

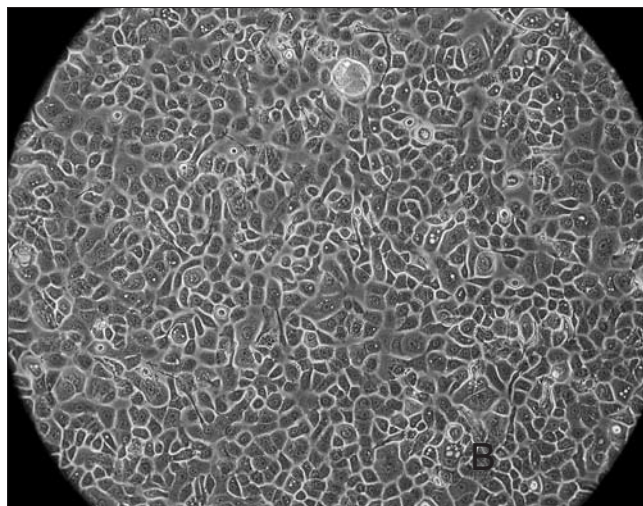
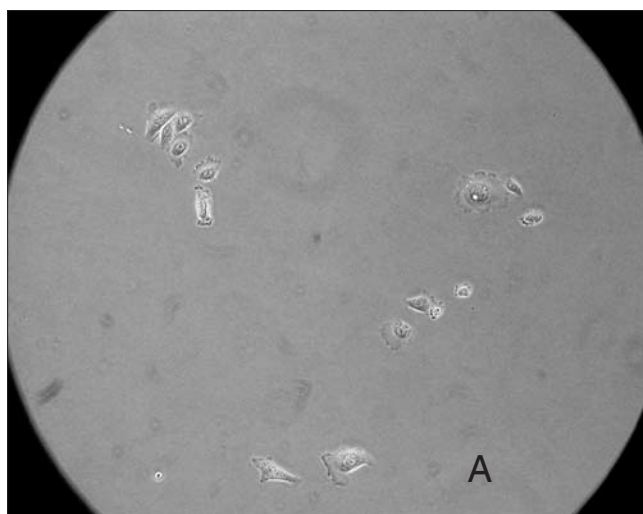
Egészséges páciensekből – egyébként is szükséges szájsebészeti beavatkozás során – eltávolított gyulladásmentes nyálkahártyából izoláltunk orális epithel sejteket. A donorok életkora 18 és 46 év között volt. A vizsgálati protokollt a Szegedi Tudományegyetem Humán Orvosbiológiai Etikai Bizottsága jóváhagyta, a kutatásetikai mérték mindenben megfelelt a Helsinkii Egyezménynek.

A nyálkahártya-darabokat először 2% antibiotikum-antimikotikum oldattal (Sigma-Aldrich GmbH, Németország) kiegészített Salsol A oldatban mostuk (Human Rt., Gödöllő, Magyarország). Ezután a mintákat dispase enzimoldatban (Grade II, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) inkubáltuk egy éjszakán át, $4^\circ C$ -on. Másnap elválasztottuk egymástól a dermiszt és az epidermiszt [16]. Az izolált epidermiszt 0,25%-os trypsin-EDTA oldatban inkubáltuk (Sigma-Aldrich GmbH, Németország) 5 percig, $37^\circ C$ -on, így a szövetből sejteket nyertünk. A sejtuszuspenziót 200 g-n 10 percig $4^\circ C$ -on centrifugáltuk, majd a továbbiakban az epidermális sejteket 25 cm^2 -es flaskákban tenyésztettük (Orange Scientific, Belgium).

Az orális epithel sejteket keratinocita szérumentes mediumban (Gibco BRL, Eggstein, Németország) te-

nyésztettük. A tápfolyadékot $5 \mu g/ml$ rekombináns epidermális növekedési faktoral (Gibco BRL, Eggstein, Németország), 50 mg/ml borjú agyalapi mirigy-kivonattal (Gibco), 1% L-glutaminnal és 1% antibiotikum/antimikotikum oldattal egészítettük ki (1% penicillin G, 1% streptomycin szulfát és 0,0025% amphotericin B; Sigma-Aldrich GmbH, Németország).

A tápfolyadékot hetente háromszor cseréltük le a sejtenyészeteken. A primer epithel sejtkultúra 8–16 nap alatt vált konfluenssé. A konfluens primer kultúrákat PBS-el mostuk (phosphate-buffered saline, $pH = 7,4$, Gibco) és 2–4-percig kezeltük 0,25%-os trypsin-EDTA oldattal (Sigma-Aldrich GmbH, Németország). A sejteket 2–4 egyenlő részbe passzáltuk. A kultúrákat $37^\circ C$ -on, párás környezetben, 5%-os CO_2 tartalom mellett tenyésztettük.



1. ábra

Humán epithel sejtkultúra fénymikroszkópos felvételei.

Az (A) felvételen néhány letapadt epithel sejt látható, míg a (B) felvételen konfluens tenyészet.

Inverz optikai mikroszkóppal (Nikon TS 100, Japán) felvételeket készítettünk a tenyésztőoldatban lévő letapadt sejtekről $200\times$ nagyításban. A primer (1a. ábra) és konfluens (1b. ábra) tenyészetben láthatóak az

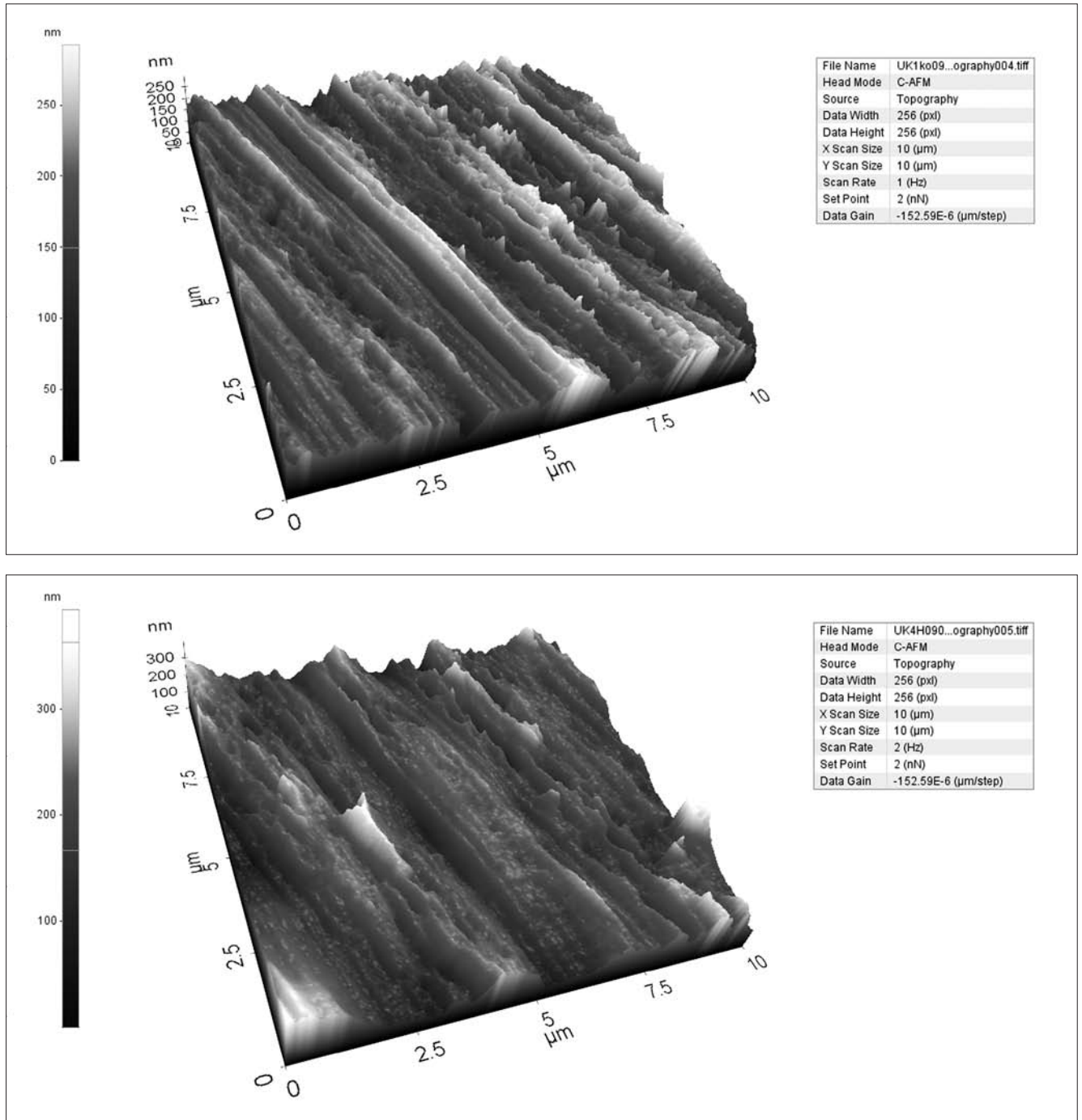
egészséges sejtek, a tápban fertőzésre utaló jel nem látható.

Sejtletapadás és proliferáció vizsgálata

A sejtenyésztés előtt a kontroll és kezelt Ti-korongok mindkét felszínét UV-C alatt 20 percig sterilizáltuk.

A vizsgálatainkhoz harmadik passzázsban lévő orális epithel sejt kultúrát használtunk. A sejt letapadást 24 h, a proliferációt 72 h elteltével vizsgáltuk. Négy független kísérletet végeztünk, minden csoportban 5 korongszámmal.

A dimetiltiazolil-difeniltetrazólium bromid (MTT) vizsgálat során az élő sejtek mitokondriális enzimjeik segítségével redukáltuk a sárga színű MTT-t, amely során kék színű formazán kristályok keletkeznek. A kristályok feloldása után kapott oldat színintenzitása arányos a mintában lévő sejtek számával [22]. Ezt a módszert alkalmaztuk először a sejtek letapadásának és túlélésének vizsgálatánál. A Ti korongokat 48-lyukú sejtenyészítő edénybe tettük, majd mindegyikre 10^4 sejtet szélesztettünk. A sejteket 24 vagy 72 h időtartamig tenyészítettük a Ti próbatesteken. Ezután a felülűzöt el-

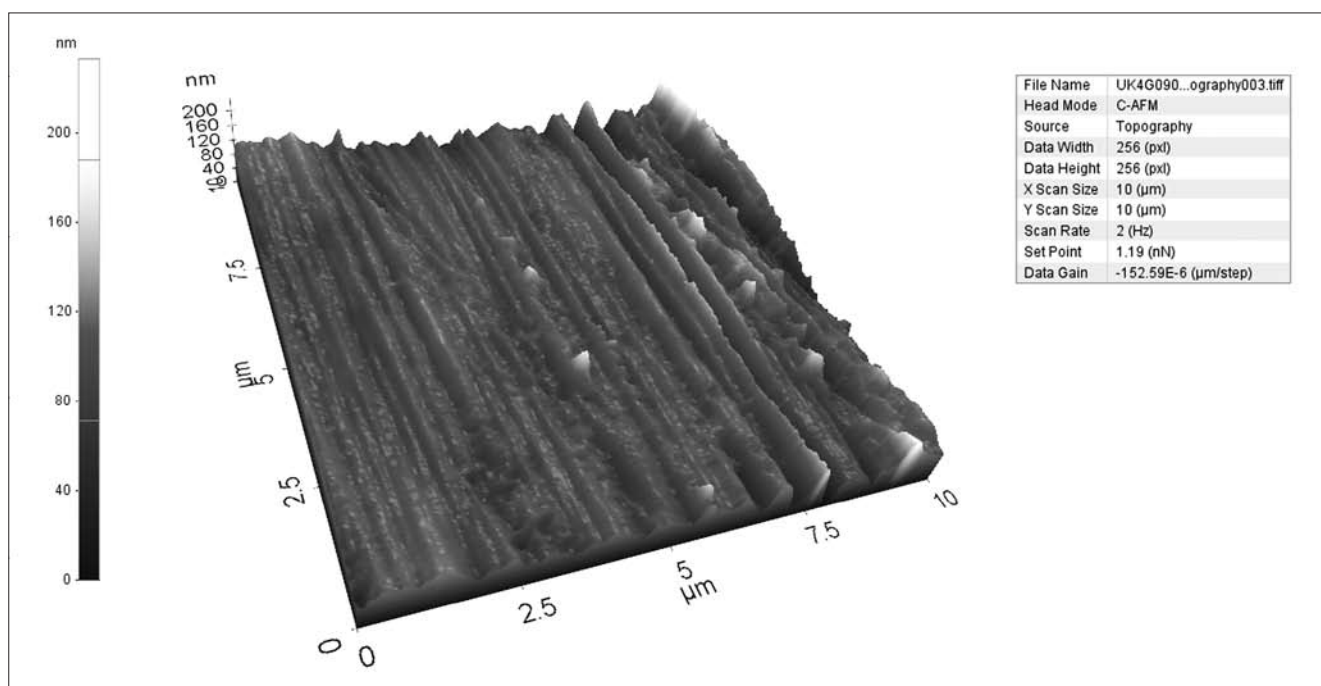
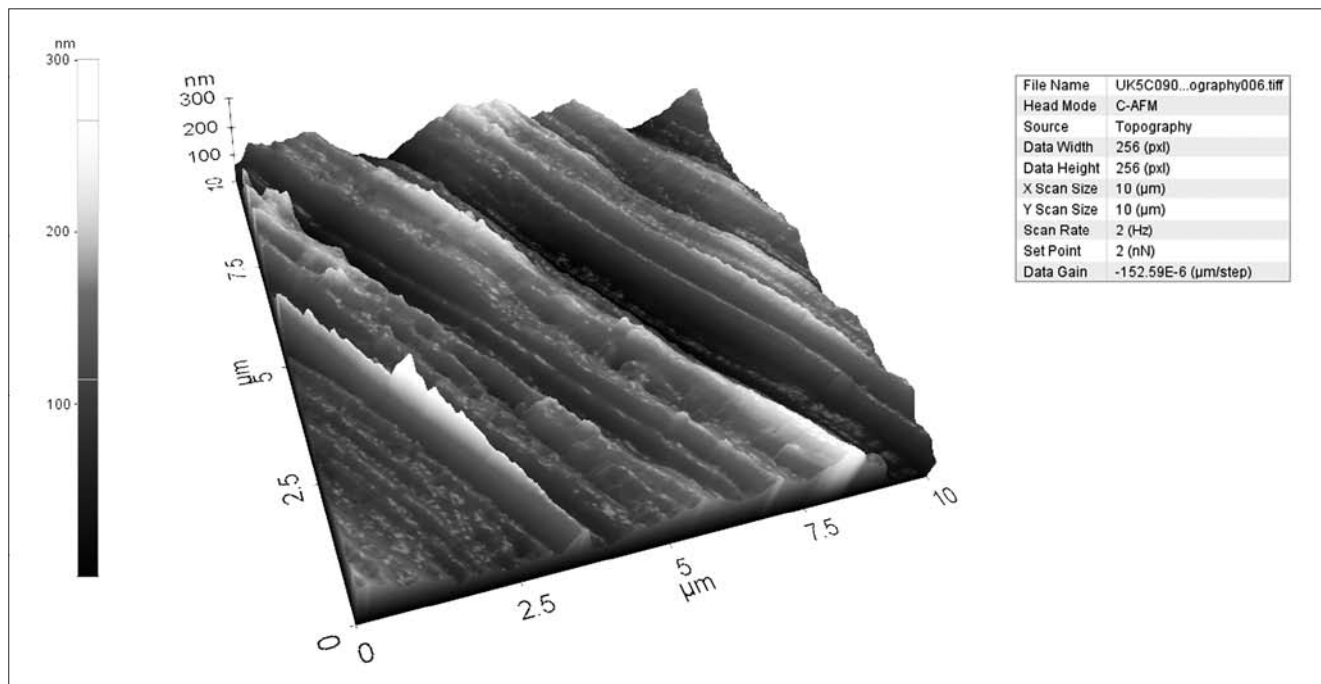


2. ábra

Kontroll (kezeletlen) minta (A) és 3%-os H₂O₂-vel kezelt korong (B) felszíni érdességének 3 dimenziós (3D) AFM felvétele. Az esztergált felszínre jellemző párhuzamosan futó barázdák színe egyre világosabb a barázda mélyétől felfelé. Méret: 10x10 μm

távolítottuk, majd a sejtekre RPMI tápfolyadékban oldott, 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT (Sigma-Aldrich GmbH, Németország) festéket mértünk, amellyel a sejteket 4 órán át inkubáltuk, 37 °C-on. Ezután a felülűszót óvatosan eltávolítottuk, majd a kristályokat 2%-os sodium dodecyl szulfát oldatban (SDS) és 0,04 mM sósavas isopropanolban feloldottuk. Az optikai denzitást (OD) 540 nm-nél mértük Multiscan Ex spektrofotométer (Thermo LabSystems, Vantaa, Finnország) és Ascent Software (Thermo LabSystems, Vantaa, Finnország) segítségével.

A fehérjemennyiség meghatározását (élő és elhalt sejtekből) „micro BCA™ protein assay kit”-tel (Pierce, Rockford, IL, USA) végeztük. A fehérjemérés standardjaként borjúsérum-albumint (Pierce, USA) használtunk. A sejteket lízis pufferrel feltártuk (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄ és 1 µg/ml leupeptin), majd rámértük a zöld színű reagenst. Az oldatot 2 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Az oldat lila színűvé vált a benne lévő fehérje mennyiségével arányosan. Az op-



3 a-b. ábra

Tútelített citromsavval (pH = 1) (A) és klórhexidin (CHX) géllal kezelt korongok (B) felülete látható a háromdimenziós AFM felvételeken. Méret: 10x10 µm

tikai denzitást (OD) 540 nm-en mértük Multiscan Ex spektrofotométer (Thermo Labsystems, Vantaa, Finnország) és Ascent Software (Thermo Labsystems, Vantaa, Finnország) segítségével.

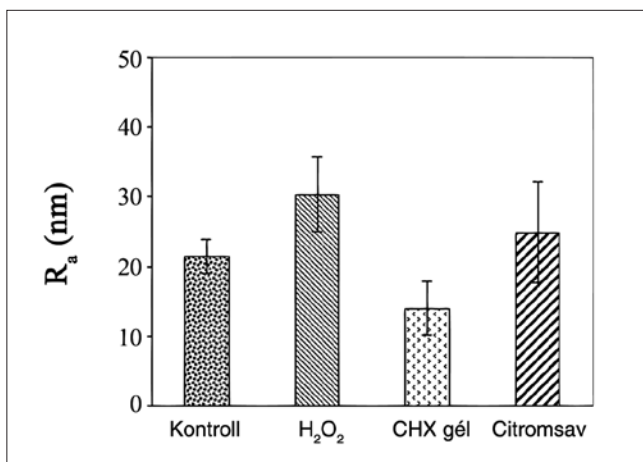
Adatok feldolgozása, statisztika

Átlag \pm átlag szórása (standard error of the mean – SEM) értékeket számoltuk ki az AFM, az MTT és a fehérjetartalom vizsgálat esetében is. Normalitás vizsgálat után, egytényezős varianciaanalízist végeztünk (ANOVA), majd Tukey és Scheffé *post hoc* tesztek alkalmaztunk az értékek páronkénti összehasonlítására (SPSS 15.0, SPSS, Chicago, Illinois, USA). A szignifikancia-szintet 0,05-nek vettük ($p < 0,05$).

Eredmények

AFM vizsgálat

Az *in vitro* vizsgálatok előtt a Ti-korongok felszínét AFM és XPS segítségével vizsgáltuk. A 2a és 2b ábrákon jól látható, hogy párhuzamosan futó barázdák vannak az esztergált felszínen, a szín egyre világosabb a barázda mélyétől felfelé. Az AFM mérések a kontroll-csoportban $R_a = 22 \pm 3$ nm felületi érdességet adtak (2a. ábra). A citromsavval kezelt mintákon 25 ± 7 nm (3a és 4 ábra), míg a 3% H_2O_2 csoportba tartozó



4. ábra

A kontroll, a H_2O_2 -vel, a klórhexidin (CHX) géllal és a citromsavval kezelt Ti-korongok felületi érdességének (R_a) ábrázolása oszlopdiaqramon, az átlag értékek és az átlag szórásának jelölésével. Az AFM vizsgálat a kontroll (kezeletlen) csoportban

$R_a = 22 \pm 3$ nm (átlag \pm SEM) felületi érdesség értéket adott. Ez az érték 30 ± 5 nm a H_2O_2 (3%) -dal kezelt csoportban, 14 ± 4 nm a CHX géllal történt kezelés esetén, míg 25 ± 7 nm a citromsavval (pH = 1) kezelt próbatesten.

A statisztikai analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a csoportok között.

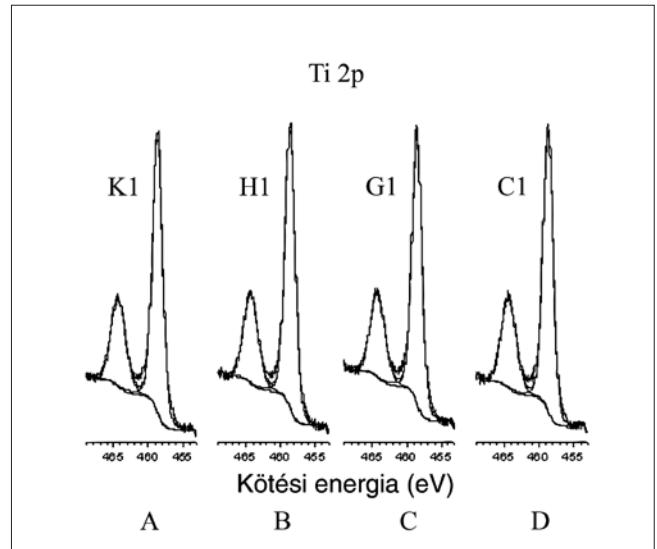
zó próbatesten 30 ± 5 nm volt az érdesség (2b és 4 ábra). A CHX géllal kezelt csoportban 14 ± 4 nm volt (3b és 4 ábra). A csökkenést – amely nem volt szig-

nifikáns – valószínűleg a gél Ti-felszínhez történő adszorpciója okozta [6].

XPS vizsgálat

Az XPS vizsgálat során a kezelt és kezeletlen minták felszínén is jelen voltak az általában megfigyelhető elemek: a Ti, O, C és N.

A Ti^{4+} -nak megfelelő Ti 2p 3/2 elektronok kötési energiája $458,6 \pm 0,1$ eV-nál volt mérhető minden mintán (5. ábra). A kettős Ti csúcsok (Ti 2p, 458,6 és 464 eV-nál) és az O 1s jel (530 eV) bizonyítja a TiO_2 réteg je-



5. ábra

A kontroll (A; K1), a H_2O_2 -vel (B; H1), a klórhexidin géllal (C; G1) és a citromsavval (D; C1) kezelt Ti korongok Ti 2p jele az XPS spektrumban. A TiO_2 minden felszínen jelen van

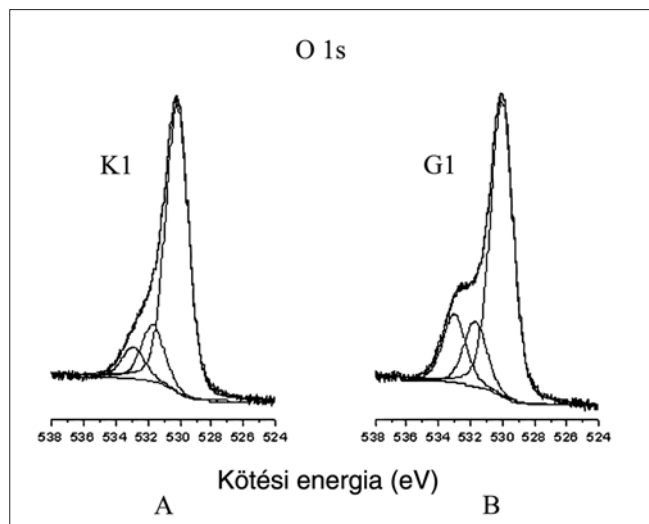
lenségét [4,15]. A különféle oldatokkal történő kezelés nem változtatta meg a korongok felszínein a Ti 2p jelet (5. ábra).

Változást tapasztaltunk azonban az O 1s csúcsnál, amelyet három csúcsra lehet felbontani (6a. és 6b. ábrák). A legintenzívebb, $\sim 530,1$ eV-nál mérhető, amely a TiO_2 -ban lévő O-t jelzi, míg a $\sim 531,7$ eV-nál mért csúcs a felszíni OH csoportoknak köszönhető. Az 532,9–533,0 eV között mérhető harmadik csúcs a C–O és/vagy C=O kötésekben jelenlévő O-tól származik. Ez utóbbi jel a CHX géllal kezelt minták esetében volt a legintenzívebb (6b. ábra), amely valószínűleg a CHX felszínbe történő adszorpciójából származik [6]. Ezt a C 1s jel felbontása is alátámasztja (nem közölt ábra), melyet minden mintánál 4 csúcsra lehetett bontani. A géllal kezelt mintáknál a 287 eV -nál mért csúcs intenzívebb volt, mint a többi csoport esetében.

A kezeletlen mintákon a C 1s jel gyengülése tapasztalható (7. ábra), 30–60 perc He^+ bombázás után. Ez azoknak a szénzennyeződéseknek köszönhető, amelyek a tisztítás után maradtak a felszínen, vagy a levegőből adszorbeálódtak a tárolás során. Ezek az elemek általában jelen vannak a Ti implantátum felszínén [23].

MTT- és fehérjemennyiség-meghatározás

A titánkorongokon 24 és 72 órán át növesztett sejtekkel végzett MTT mérés eredményeit a 8. ábrán látható diagrammon ábrázoltuk. A 24 óra után végzett MTT mérés nem mutatott szignifikáns különbséget az egye-



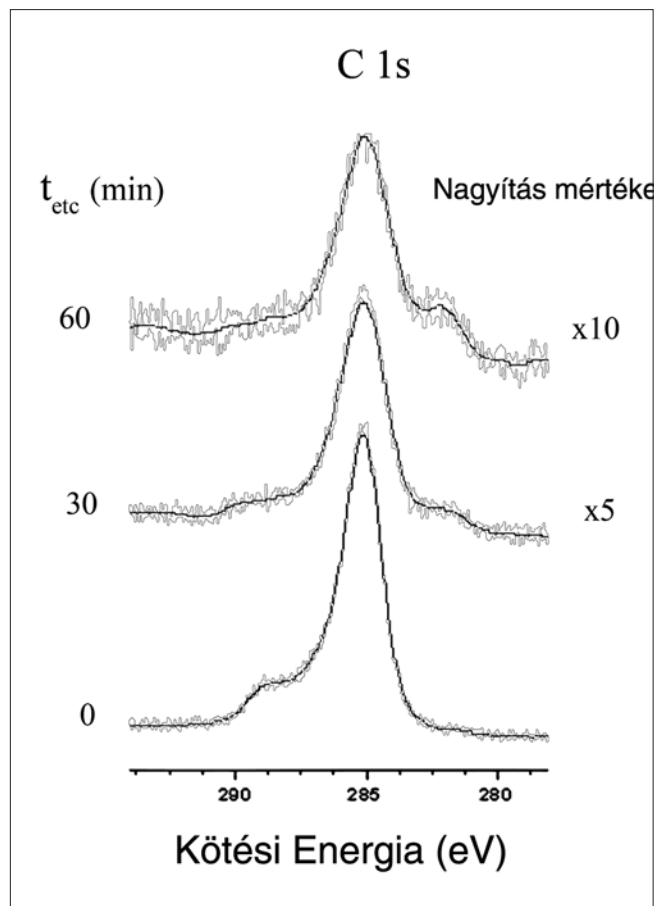
6. ábra

Az XPS spektrum O 1s jelei a kontroll (A) és a klórhexidin (CHX) géllal kezelt (B) korongok esetében. A jel három csúcsra oszlik: a legintenzívebb (530.1 eV) a TiO_2 -ban lévő O-t jelzi, míg az ~ 531,7 eV-nál mért csúcs a felszíni OH csoportoknak köszönhető. A harmadik, 532,9–533,0 eV közötti csúcs a C-O és/vagy C=O kötésekben jelenlévő O-tól származik. Az utóbbi jel a CHX géllal kezelt korongok esetében a legintenzívebb (B), ami a CHX felszínbe történő kötődésével magyarázható.

csoportokban mért abszorbanciák között. ($\text{OD}_{540,\text{kontroll}} = 0,059 \pm 0,006$, $\text{OD}_{540,\text{H}_2\text{O}_2} = 0,081 \pm 0,009$, $\text{OD}_{540,\text{CHX gél}} = 0,067 \pm 0,006$, $\text{OD}_{540,\text{citromsav}} = 0,077 \pm 0,009$). Nagyobb értéket kaptunk a H_2O_2 -dal és a citromsavval kezelt korongok esetében, mint a kontroll és a CHX géllal kezelt próbatesten, azonban a különbség nem volt szignifikáns. A 72 óra után végzett MTT teszt enyhe sejtmennyiség növekedést mutatott a H_2O_2 -dal és a citromsavval kezelt korongokon. A H_2O_2 -dal kezelt korongokon lévő sejt proliferáció mértéke szignifikánsan magasabbnak ($p = 0,011$) bizonyult a CHX géllal kezelt csoporthoz viszonyítva ($\text{OD}_{540,\text{kontroll}} = 0,087 \pm 0,006$, $\text{OD}_{540,\text{H}_2\text{O}_2} = 0,101 \pm 0,009$, $\text{OD}_{540,\text{CHX gél}} = 0,067 \pm 0,006$, $\text{OD}_{540,\text{citromsav}} = 0,092 \pm 0,009$). A többi csoport között nem találtunk szignifikáns eltérést.

A titánkorongokon 24 és 72 órán át növesztett sejtekkel végzett fehérjevizsgálat eredményeit a 9. ábrán lévő diagrammon láthatjuk. A 24 órát követő fehérjetartalom-mérés hasonló értékeket adott mind a 4 csoportban: $\text{OD}_{540,\text{kontroll}} = 0,162 \pm 0,009$, $\text{OD}_{540,\text{H}_2\text{O}_2} = 0,170 \pm 0,007$, $\text{OD}_{540,\text{CHX gél}} = 0,168 \pm 0,007$, $\text{OD}_{540,\text{citromsav}} = 0,168 \pm 0,008$. A fehérjekoncentráció-mé-

rés eredménye 72 óra után hasonló volt mind a négy csoportban: $\text{OD}_{540,\text{kontroll}} = 0,185 \pm 0,011$, $\text{OD}_{540,\text{H}_2\text{O}_2} = 0,199 \pm 0,016$, $\text{OD}_{540,\text{CHX gél}} = 0,194 \pm 0,014$, $\text{OD}_{540,\text{citromsav}} = 0,209 \pm 0,017$.



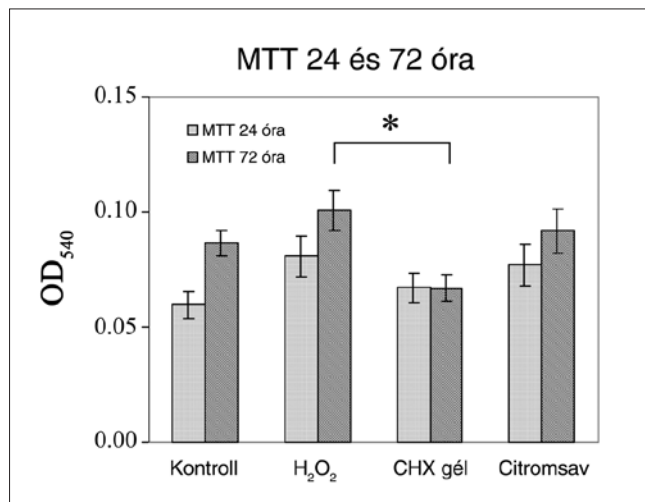
7. ábra

Kontroll-minták XPS spektrumának C 1s jele, növekvő időtartamú He^+ bombázást követően. A legalsó görbe 0 perc bombázást, a középső görbe 30 perc, míg a legfelső görbe 60 perc He^+ bombázást jelent. A bombázás ~ 10 nm anyagot távolít el a felszínről. A C 1s jel fokozatos gyengülése igazolja a szén szennyeződések jelenlétét.

Megbeszélés

Az epithel sejtek különböző érdességű felszíneken történő letapadását, túlélését több tanulmányban vizsgálták már. Kimutatták, hogy az epithel sejtek nem tapadnak olyan erősen a savmaratott vagy homokfúvott felszínhez, mint a simához (polírozott, $R_a < 0,5 \mu\text{m}$) [17]. A sima felszín elősegíti az epithel sejtek növekedését, osztódását és kapcsolódását a Ti-felszínhez [5]. Mivel az AFM vizsgálat során kapott R_a érdesség értékek hasonlóak voltak mind a négy csoportban és egyedül csak a CHX géllal kezelt csoport esetében tapasztaltunk enyhe csökkenést a kontroll korongokhoz képest, megállapítható, hogy a felszínek simák

voltak, és egyformán alkalmasak a sejtek letapadására, proliferációjára. A sejt-proliferáció vizsgálatánál kapott különbségeket nem eredményezhette a felszín érdességei között mutatkozó különbség, mert vizsgálatunkban az esztergált felszínű korongok érdessége mind 0,014 és 0,030 μm között változott, az alkalmazott szertől függően. *Klinge* szerint az ilyen felszín simának tekinthető, és nem valószínű, hogy az epithel sejtek érzékelik az ilyen kis érdességbeli változásokat [17]. *Stájer* vizsgálatában azt tapasztalta, hogy savas pH és nagy fluoridkoncentráció jelenléte együttesen okozhatja a titán felszín korrózióját, mely negatívan befolyásolja az epithel sejtek letapadását, proliferációját [37]. A hazai irodalomban többek között *Joób-Fancsaly és mtsai* [13] vizsgálták már korábban fibroblaszt és oszteoblaszt sejtek proliferációs képességét különböző fizikai beavatkozásokkal módosított titán



8. ábra

MTT vizsgálat eredményei 24 (letapadás) és 72 óra (proliferáció) elteltével.

Élő sejtmennyiségek átlagai és az átlagok szórása látható a kontroll, a H₂O₂-vel, a klórhexidin (CHX) géllal és a citromsavval kezelt Ti korongok esetében.

A H₂O₂-vel kezelt korongokon mért élő sejt mennyiség 72 óra után szignifikánsan nagyobb volt, mint a CHX géllal kezelt korongokon. A többi csoport esetében nem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns különbséget

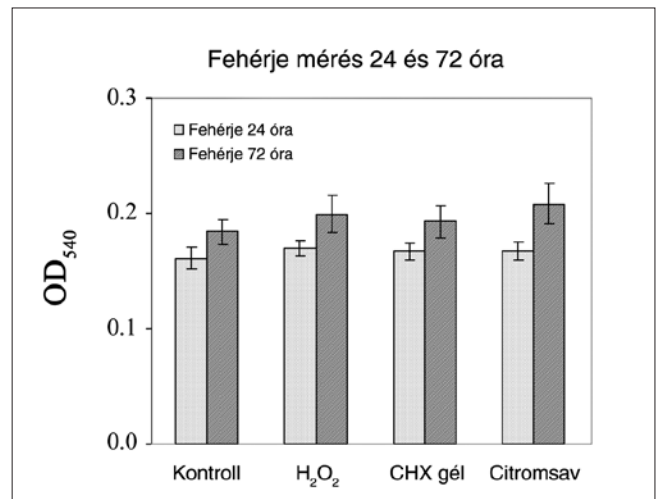
felszíneken, így ez a kutatási terület Magyarországon is eredményes múltra tekint vissza.

Az XPS vizsgálat a kezeletlen és kezelt korongok esetében is intakt TiO₂ réteget mutatott ki. Változást a CHX géllal kezelt korongok esetében tapasztaltunk, mivel az O 1s jelben intenzív csúcs jelent meg a C-O és/vagy C=O kötésben lévő O-nek köszönhetően. Ez az eredmény a CHX gél felszínbe történő adszorpcióját bizonyítja, melyet más szerzők munkái is alátámasztanak [6].

A korongokon 24 órán át tenyésztett sejteken végzett MTT vizsgálat nem mutatott szignifikáns eltérést a különböző kémiai anyagokkal kezelt csoportok kö-

zött. A fehérjekoncentráció mérése sem mutatott szignifikáns eltérést az egyes csoportok között.

A 72 órát követő MTT vizsgálat különbségeket mutatott ki a csoportok között a sejt proliferációban. Szignifikánsan magasabb értéket kaptunk a H₂O₂-dal kezelt csoportban a CHX géllal kezelt mintákhoz képest, míg a protein koncentráció mérésénél nem kaptunk statisztikailag értékelhető különbséget. Az eredmények közötti eltérést a módszerek különbözőségével magyarázhatjuk: míg az MTT vizsgálat csak az élő sejteket méri, addig a fehérje koncentráció vizsgálatá-



9. ábra

A fehérjemérés eredményei 24 és 72 óra elteltével. A fehérjemennyiség átlagai és átlagainak szórásai láthatóak a kontroll, a H₂O₂-vel, a CHX géllal és a citromsavval kezelt Ti korongok esetében.

A statisztikai analízis során nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző csoportok között

nál az élő és elhalt sejtekből származó fehérjét is lemérjük. Mivel az érdességek nem voltak szignifikánsan különbözőek, ezért a CHX géllal kezelt korongok esetében mért kisebb sejtmennyiséget a felszíni összetételben bekövetkezett változásnak tulajdonítjuk. A citromsavval kezelt minták esetében is magasabb volt a proliferáció mértéke a kontroll mintákhoz viszonyítva, azonban ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a CHX gél alkalmazása során a felszínen anyagbeépülés (adszorpció) történhet a titánfelszínbe. A TiO₂ felszín tisztítása H₂O₂-val vagy citromsavval hasonló vagy jobb hatással volt a sejtek túlélésére és szaporodására, a kontrollhoz képest. *In vitro* kísérleteink bizonyították, hogy az előbb említett két dezinfektáló anyag hatékonyan alkalmazható a peri-implantitisz terápiájában, mivel nemhogy nem csökkentette, hanem még növelte is a sejtek proliferációját. Ez igazán figyelemre méltó, hiszen valójában toxikus anyagokról van szó.

Hosszú távú terveink között szerepel, oszteoblaszt

sejtekkel is elvégezni ezeket a kísérleteket, hogy a keményszöveti sejtek reakcióját is értékelhessük ezen kémiai tisztító anyagokra. A jövőben szeretnénk a titán felszínt is változtatni, hogy ne csak esztergált, hanem más, például polírozott vagy homokfújt-savmaratott felszínen is vizsgálhassuk a sejtek letapadását. Végül, de nem utolsósorban a felületre vitt anyagokat is változtatjuk majd, hogy minél szélesebb körű információt gyűjthessünk és adhassunk át a gyakorló fogorvosoknak (implantológusoknak) a különböző tisztító anyagok és a titán kölcsönhatására vonatkozóan.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki a Szájsebészet Tanszék (SZTE, FOK) munkatársainak a humán nyálkahártya mintákért, a CAMLOG™ Biotechnologies AG-nak (Svájc) a titán próbatestekért. Köszönet illeti Dr. Boda Krisztinát (SZTE, ÁOK, Orvosi Informatikai Intézet) a statisztikai kiértékelésben nyújtott segítségével, Prof. Dr. Rakonczay Zoltánt (SZTE, FOK, Fogpótlástani és Orális Biológia Tanszék) és Prof. Dr. Kemény Lajost (SZTE, ÁOK, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika) a kutatási háttér megteremtéséért. Ezt a kutatást a SIMI-NAS 5. EU keretprogram (GRD3-2001-61801), a GVOP-3.2.1.-2004-04-0408/3.0, az ETT-248/2009 és az OTKA F-68440 pályázatok, valamint a Logintech Kft. (Szeged, Magyarország) támogatta.

Irodalom

1. ABU-TA'A M, QUIRYNEN M, TEUGHELIS W, VAN STEENBERGHE D: Asepsis during periodontal surgery involving oral implants and the usefulness of peri-operative antibiotics: a prospective, randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 58–63.
2. ALBREKTSSON T, ISIDOR F: Consensus report of session IV. In: LANG, N. P. & KARRING, T: (eds). *Proceedings of the First European Workshop on Periodontology*. London: Quintessence; 1994. 365–369.
3. ALHAG M, RENVERT S, POLYZOIS I, CLAFFEY N: Re-osseointegration on rough implant surfaces previously coated with bacterial biofilm: an experimental study in the dog. *Clin Oral Impl* 2008; 19: 182–187.
4. AMEEN AP, SHORT RD, JOHNS R, SCHWACH G: The surface analysis of implant materials. I. The surface composition of a titanium dental implant material. *Clin Oral Implants Res* 1993; 4: 144–150.
5. BAHARLOO B, TEXTOR M, BRUNETTE DM: Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2005; 74A: 12–22.
6. BARBOUR ME, O'SULLIVAN DJ, JAGGER DC: Chlorhexidine adsorption to anatase and rutile titanium dioxide. *Colloids and Surfaces A. Physicochem Eng Aspects* 2007; 307: 116–120.
7. BOLLEN CML, PAPAIOANNOU W, VAN ELDERE J, SCHEPERS E, QUIRYNEN M, VAN STEENBERGHE D: The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Imp Res* 1996; 7: 201–211.
8. BURCHARD WB, COBB CM, DRISKO CL, KILLOY WJ: Effects of chlorhexidine and stannous fluoride on fibroblast attachment to different implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1991; 6: 418–426.
9. DENNISON DK, HUEZELER MB, QUINONES CRG: Contaminated implant surfaces: an *in vitro* comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. *J Periodontol* 1994; 65: 942–948.
10. DEPORTER AD, TODESCAN R JR.: A possible "rescue" procedure for dental implants with a textured surface geometry: a case report. *J Periodontol* 2001; 72: 1420–1423.
11. FRANSSON C, LEKHOLM U, JEMT T, BERGLUNDH T: Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 440–446.
12. HÄMMERLE C, FOURMOUSIS I, WINKLER JR, WEIGEL C, BRÄGGER U, LANG NP: Successful bone fill in late peri-implant defects using guided tissue regeneration. A short communication. *J Periodontol* 1995; 66: 303–308.
13. JOÓB-FANCSALY Á, HUSZÁR T, DIVINYI T, ROSIVALL L, SZABÓ GY: A titán-implantátumok felületi mikromorfológiájának hatása a fibro- és oszteoblaszt sejtek proliferációs aktivitására. *Fogorv Szle* 2004; 97: 251–255.
14. KHOURY F, BUCHMANN R: Surgical therapy of peri-implant disease: a 3-year follow-up study of cases treated with 3 different techniques of bone regeneration. *J Periodontol* 2001; 72: 1498–1508.
15. KILPADI DV, RAIKAR GN, LIU J, LEMONS JE, VOHRA Y, GREGORY JC: Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: Spectroscopic analyses. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 646–659.
16. KITANO Y, OKADA N: Separation of the epidermal sheet by dispase. *Br J Dermatol* 1983; 108: 555–560.
17. KLINGE B, MEYLE J: Soft-tissue integration of implants. Consensus report of Working Group 2. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 93–96.
18. KOTSOVILIS S, KAROUSSIS IK, TRIANTI M, FOURMOUSIS I: Therapy of peri-implantitis: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008; 621–629.
19. LAUTENSCHLAGER EP, MONAGHAN P: Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int Dent J* 1993; 43: 245–253.
20. LEONHARDT A, RENVERT S, DAHLÉN G: Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Impl Res* 1999; 10: 339–345.
21. MEFFERT RM, LANGER B, FRITZ ME: Dental implants: a review. *J Periodontol* 1992; 63: 859–870.
22. MOSMANN T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63.
23. NIST XPS Database. Principal Photoelectron Lines Result. 2000. Available at <http://srdata.nist.gov/xps>.
24. PARK JB, KIM YK: Metallic biomaterials. 2nd ed. In: BRONZINO JD, ed. *The Biomedical Engineering Handbook*. Boca Raton: CRC Press and IEEE Press, Second Edition; Vol. 1, 2000. 37–5–37–11.
25. RENVERT S, LESSEM J, DAHLÉN G, LINDAHL C, SVENSSON M: Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 362–369.
26. RENVERT S, LESSEM J, DAHLÉN G, RENVERT H, LINDAHL C: Mechanical and repeated antimicrobial therapy using a local drug delivery system in the treatment of peri-implantitis: A Randomized Clinical Trial. *J Periodontol* 2008; 79: 836–844.
27. RENVERT S, ROOS-JANSÁKER A-M, CLAFFEY N: Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 305–315.
28. RENVERT S, ROOS-JANSÁKER AM, LINDAHL C, RENVERT H, PERSSON GR: Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Impl Res* 2007; 18: 509–516.
29. ROOS-JANSÁKER AM, LINDAHL C, RENVERT H, RENVERT S: Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 290–295.
30. ROOS-JANSÁKER A-M, RENVERT H, LINDAHL C, RENVERT S: Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with periimplant lesions. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 296–301.
31. ROOS-JANSÁKER A-M, RENVERT H, LINDAHL C, RENVERT S: Submerged healing following surgical treatment of peri-implantitis: a case series. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 723–727.
32. ROOS-JANSÁKER A-M, RENVERT H, LINDAHL C, RENVERT S: Surgical treatment of periimplantitis using a bone substitute with or without a resorbable membrane: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 625–632.
33. ROOS-JANSÁKER A-M, RENVERT S, EGELBERG J: Treatment of peri-implant infections: a literature review. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 467–485.
34. SCHOU S, HOLMSTRUP P, JORGENSEN T, SKOVGAARD LT, STOLTZE K, HJORTING-HANSEN E, WENZEL A: Implant surface preparation in the sur-

gical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14: 412–422.

35. SCHOU S, HOLMSTRUP P, JORGENSEN T, STOLTZE K, HJORTING-HANSEN E, WENZEL A: Autogenous bone graft and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis. I. Clinical and radiographic observation in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14: 391–403.

36. SCHWARZ F, BIELING K, BONSMANN M: Nonsurgical treatment of moderate and advanced periimplantitis lesions: a controlled clinical study. *Clin Oral Invest* 2006; 10: 279–288.

37. STÁJER A, UNGVÁRI K, PELSŐCZI KI, POLYÁNKA H, OSZKÓ A, MIHALIK

E, RAKONCZAY Z, RADNAI M, KEMÉNY L, FAZEKAS A, TURZÓ K: Corrosive effects of fluoride on titanium: investigation by X-ray photoelectron spectroscopy, atomic force microscopy, and human epithelial cell culturing. *J Biomed Mater Res A* 2008; 87: 450–458.

38. URIBE R, PENARROCHA M, SANCHIS JM, GARCIA O: Marginal peri-implantitis due to occlusal overload. A case report. *Med Oral* 2004; 9: 159–162.

39. ZITZMANN NU, BERGLUNDH T: Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Review. J Clin Periodontol* 2008; 35 (Suppl.8): 286–291.

DR. UNGVÁRI K, DR. PELSŐCZI KI, KORMOS B, OSZKÓ A, PROF. DR. RAKONCZAY Z, DR. RADNAI M,
 PROF. DR. KEMÉNY L, PROF. DR. NAGY K, PROF. DR. FAZEKAS A, DR. TURZÓ K:

Impact of decontaminating solutions on titanium surface: an epithelial cell culture study

INTRODUCTION The effects of three different decontaminating solutions in clinical use for peri-implantitis therapy on the chemical structure and surface roughness of commercially pure (CP) Ti were investigated. A further aim was to survey the response of the biological environment to these changes, by examining the attachment and proliferation of human epithelial cells after treatment of the Ti surfaces with these solutions. **MATERIALS AND METHODS** CP (grade 4) machined titanium discs (CAMLOG™ Biotechnologies AG, Switzerland) were treated with 3% H₂O₂ (5 min), saturated citric acid (pH = 1; 1 min) or chlorhexidine gel (CHX, 5 min). The surface properties were followed through the use of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and atomic force microscopy (AFM). The epithelial cell attachment and proliferation was examined by means of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and biconchonic acid (BCA) protein-content assays. **RESULTS** XPS showed an intact TiO₂ layer on each sample and CHX was adsorbed by the surface, as C-O and/or C=O bond formation was revealed. AFM results gave no significant changes in the roughness after treating the surfaces with the cleaning solutions. While MTT and BCA assays did not show significant differences in epithelial cell attachments, the cell proliferation was significantly increased after H₂O₂ treatment as compared to CHX (not shown by BCA assays). **CONCLUSIONS** The applied decontaminating agents do not damage the Ti surface. H₂O₂ can be used effectively in decontaminating the implants affected by peri-implantitis, as the human epithelial cell growth was improved, in contrast with CHX.

Key words: peri-implantitis, implant surface, decontamination, epithelial cell culture

PÁLYÁZAT KÖRMÖCZI-PÁLYADÍJRA

Felhívjuk minden, a *Fogorvosi Szemlében* publikáló, 35 évnél fiatalabb első szerzős cikk szerzőjét, hogy pályázzanak a 2010-es Körmöczi-pályadíjra.

Pályázni csak a 2010-ben, a *Fogorvosi Szemlében* megjelent közleményekkel lehet.

Kérjük, a közlemény különnyomatának egy példányát mellékelje a pályázathoz.

A pályázat beadási határideje: 2011. július 15.

A pályázatokat, kérem, postán juttassák el a címemre.

Dr. Tóth Zsuzsanna
 az MFE főtitkára
 SE Konzerváló Fogászati Klinika
 1088 Budapest, Szentkirályi utca 47.