

# PARTICULARITĂȚI ALE HISTOINTEGRĂRII IN VIVO A IMPLANTELOR DENTARE DIN TITAN TRATATE LA SUPRAFAȚĂ

## *Characteristics of in vivo histointegration of surface treated titanium dental implants*

**Conf. Dr. Dan Mariș<sup>1</sup>, Conf. Dr. Maria Mariș<sup>2</sup>, Dr. Marius Mariș<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Disciplina Protetică Dentară Mobilă, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea „Ovidius“, Constanța*

<sup>2</sup>*Disciplina Parodontologie, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea „Ovidius“, Constanța*

<sup>3</sup>*Medic Rezident Ortodonție, București*

### REZUMAT

În ultimii ani, s-au făcut numeroase încercări pentru descoperirea unor materiale noi biocompatibile pentru tratamentul edentațiilor prin protezare pe implante dentare. Pentru a le îmbunătăți calitățile, implanturile din titan sunt tratate la suprafață, prin diferite metode, cu filme de biomateriale, care să le ofere pasivitate și o bună histointegrare.

Scopul acestei lucrări este de a evalua comparativ, in vivo, procesul de osteointegrare a implantelor din titan tratate la suprafață prin metode mecanice și prin acoperirea chimică a unui film de hidroxiapatită (prin metoda Spin coating).

Pentru realizarea scopului propus au fost fixate următoarele obiective:

- studierea aspectelor morfologice și histologice, în experiențe pe animale, a procesului osteoregenerativ a implantelor din titan tratate la suprafață.
- stabilirea dinamicii proceselor osteoregenerative și de osteointegrare a implantelor pentru diferite perioade de timp.
- analiza comparativă a procesului de osteointegrare în funcție de fenomenul de osteoinducție determinat de tratamentul de suprafață al titanului.

Rezultatele au arătat faptul că tratamentul de suprafață al implantelor din titan și obținerea de microretenții superficiale prin sablare dublă contribuie la osteointegrarea implantului. Rezultate pozitive s-au obținut prin tratamentul de suprafață cu HA. Astfel, se observă o mai bună apozitie osoasă în jurul implantului mai ales în perioada precoce a vindecării.

Osteogeneza se produce de la periferia defectelor osoase spre implant, este deci o creștere osoasă centripetă, în zona de interfață fiind prezent țesut osos neformat limitat de lamele osoase mature. Se formează inițial un os spongios, care va fi înlocuit în decurs de câteva săptămâni cu os lamelar. În sectoarele periferice se observă îngroșarea, frecvența trabeculelor osoase și sporirea masei osoase. În faza tardivă a vindecării osoase are loc definitivarea osteointegrării implantului, imaginea fiind de formare de os lamelar, concentric.

**Cuvinte cheie:** titan, tratament de suprafață, dublă sablare, Spin coating, osteointegrare

Adresă de corespondență:

Conf. Dr. Dan Mariș, Universitatea „Ovidius“, Str. Ilarie Voronca, Nr. 7, Cod 8700, Constanța

### ABSTRACT

Several attempts have been done lately in order to discover new biocompatible materials to be used during the treatment of edentation through prosthesis on dental implants. In order to improve their qualities, titanium implants are treated on the surface by means of different methods, with the help of films of biomaterials which can provide them passivity and a good histointegration.

The aim of this paper is to evaluate comparatively, *in vivo*, the process of osteointegration of titanium implants treated on the surface through mechanical methods and through chemical coating of a film of hydroxyapatite (by means of Spin coating). In order to achieve the proposed aim, the following objectives have been set:

- The study of morphological and histological aspects, in experiments on animals, of the osteoregenerative process of titanium implants treated on the surface;
- Setting the dynamics of the osteointegration process and of the osteointegration of implants for different periods of time;
- The comparative analysis of the process of osteointegration according to the osteoinduction phenomenon determined by the surface treatment of the titanium.

The results have shown that the surface treatment of titanium implants and the receiving of superficial micro retentions through double sanding, contribute to the implant osteointegration. Positive results have been obtained during the surface treatment with HA. Thus, a better osseous apposition around the implant, especially during the precocious period of the healing process, has been noticed.

Ontogenesis is produced from the peripheral osseous defects towards the implant, being a centripetal osseous growth, in the interface area being present an osseous neo-formed tissue limited by mature osseous lamellas. A spongy bone is formed initially, which will be replaced after several weeks by a lamellar bone. The thickening, the frequency of osseous trabecules and the increase of the osseous mass can be noticed. In the late phase of osseous healing the osteointegration finishing of the implant takes place, the image being that of the formation of a concentric, lamellar bone.

**Key words:** titan, surface treatment, double sanding, Spin coating, osteointegration

### INTRODUCERE

În ultimii ani, s-au făcut numeroase încercări pentru descoperirea de materiale noi biocompatibile pentru tratamentul edentațiilor prin protezare pe implanturi dentare (1). Dar majoritatea sunt implanturi dentare pe bază de titan (2) și ceramică (3,4).

Titanul este considerat un material aproape inert și este bine tolerat, care în condiții optimizate este capabil de osteointegrare în țesutul osos. Mai mult, titanul permite formarea unui strat bogat în fosfat de calciu pe suprafața lui, precum și a unui film subțire și stabil de oxid, care-i conferă pasivitate (2). Deși titanul este considerat un metal biocompatibil, *in vitro* și *in vivo*, ionii  $Ti^{4+}$  inhibă *in vitro* activitatea osteoclastică și reduc sinteza proteinelor osteoblastice (5). Într-un studiu ce utilizează o linie celulară osteoblastică umană MG-63, definită ca osteoblaste proliferante, s-a arătat că ionii  $Ti^{4+}$  induc producția de interleukine IL-6 și activează astfel osteoclastogeneza (5). Dar există date care indică apariția dermatitei de contact ca răspuns la implanturile din titan.

$Ti6Al4V$  este cel mai frecvent aliaj pe bază de titan utilizat în implantologia medicală dentară.

Ceramicile pe bază de fosfați de calciu sunt hidroxiapatita (HA), sintetică sau derivată din corali, și fosfatul tricalcic (TCP). Aceste materiale, utilizate pentru acoperirea implanturilor dentare (6,7) sau umplerea unor defecte osoase, au o tehnologie complexă, se prepară la temperaturi și presiuni mari,

pentru a se obține ceramici dense, înalt cristaline și inerte. Ambele ceramici sunt osteoconductive, lipsite de un potențial osteogenic intrinsec, sunt înalt biocompatibile, dar diferă între ele prin răspunsul biologic dezvoltat la situsul implantat. Astfel, TCP este îndepărtat pe măsură ce noul țesut osos se dezvoltă, în timp ce HA are perioadă de latență aproape permanentă.

Implanturile din titan sunt tratate la suprafață prin diferite metode (8,9), cu filme de biomateriale, care să le ofere pasivitate și o bună histointegrare (10). În ultimii ani se aplică pe larg în practica medicală dentară preparatele cu hidroxiapatită sub diferite forme: pulbere, ceramică, granule, forme coloidale. Hidroxiapatita este o substanță minerală, acceptată în practică din anul 1970, care formează structuri osoase noi, însă este un înlocuitor osos biocompatibil neresorbabil, care susține matricea de țesut conjunctiv un timp îndelungat, are capacități osteoinductoare, stimulează creșterea și diferențierea celulelor-predecesori ai țesutului osos. Materialul stimulează activitatea mitotică a fibroblaștilor și a celulelor osteogene și totodată creează condiții de fixare, pentru un termen îndelungat, a ionilor de calciu și fosfor, necesari pentru matricea inductivă a osului și omogenizarea substanței fundamentale a lui. Utilizarea hidroxiapatitei în complex cu biopolimerii (polietilen, polipropilen, polisterol, teflon, colagen) sporește efectul de vindecare osoasă, probabil datorită optimizării suplimentare a procesului de reparație osteogenă în etapa de sinteză a fibrelor de colagen (2).

## SCOPUL LUCRĂRII

Scopul acestei lucrări este de a evalua comparativ, in vivo, procesul de osteointegrare a implantelor din titan tratate la suprafață prin metode mecanice (sablarea simplă cu oxid de aluminiu cu granulația de 250  $\mu\text{m}$  și sablarea dublă cu oxid de aluminiu 250  $\mu\text{m}$  și 50  $\mu\text{m}$ ) și acoperirea chimică a unui film de HA [prin metoda Spin coating, (9)].

## MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru realizarea scopului propus au fost fixate următoarele obiective:

- studierea aspectelor morfologice și histologice, în experiențe pe animale, a procesului osteoregenerativ a implantelor din titan tratate la suprafață.
- stabilirea dinamicii proceselor osteoregenerative și de osteointegrare a implantelor pentru diferite perioade de timp.
- analiza comparativă a procesului de osteointegrare în funcție de fenomenul de osteoinducție determinat de tratamentul de suprafață al titanului.

S-au utilizat pentru implantare endoosoasă eşantioane din titan, rotunde, cu diametrul de 5 mm și grosimea de 0,5 mm. Ele sunt supuse condiționării de suprafață prin sablare. Titanul aparține firmei de livrare ANCIS International, certificat ISO 9001-00 al LRQA cu nr. 354125, TITANIUM T40, Grade 4, iar eşantioanele au fost confecționate la Tehnomed Impex București.

Metoda de depunere pe titan a HA s-a făcut prin metoda Spin coating, pulberile utilizate au fost obținute în condiții hidrotermale la IMNR București (Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Metale Neferoase și Rare).

În studiu am aplicat metode moderne de investigații și a fost elaborat un model experimental pe iepuri. Au fost prezentate argumente care demonstrează, comparativ, efectul osteoinductiv al biomaterialului aplicat pentru diferite perioade de timp.

### Evaluarea tratamentului de suprafață a titanului

Tratamentul de suprafață al probelor a fost studiat cu ajutorul unui microscop electronic cu baleiaj Hitachi S-2600 N, echipat cu un sistem de analiză dispersiv în energie (EDS). Rezultatele obținute sunt prezentate în imagini de electroni secundari, imaginile obținute de pe suprafețele investigate.

### a. Examinarea suprafețelor din titan sablate

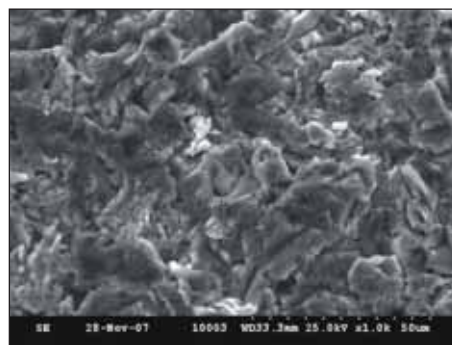


FIGURA 1. Suprafața rezultată prin sablare simplă, granulație de 50  $\mu\text{m}$  X 1000

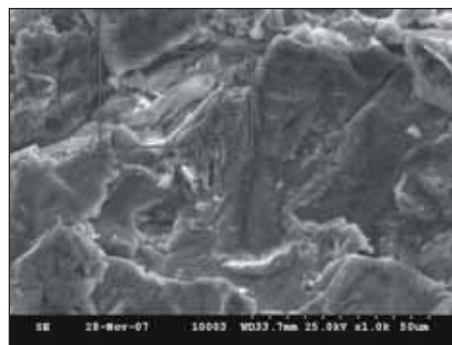


FIGURA 2. Suprafața rezultată prin sablare simplă, granulație de 250  $\mu\text{m}$  X 1000

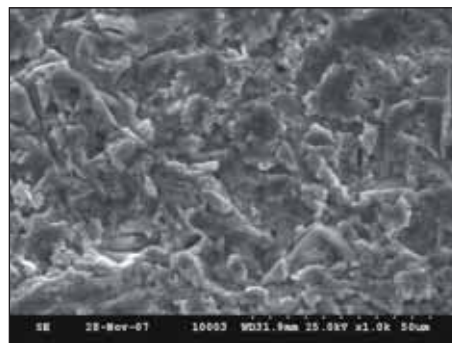
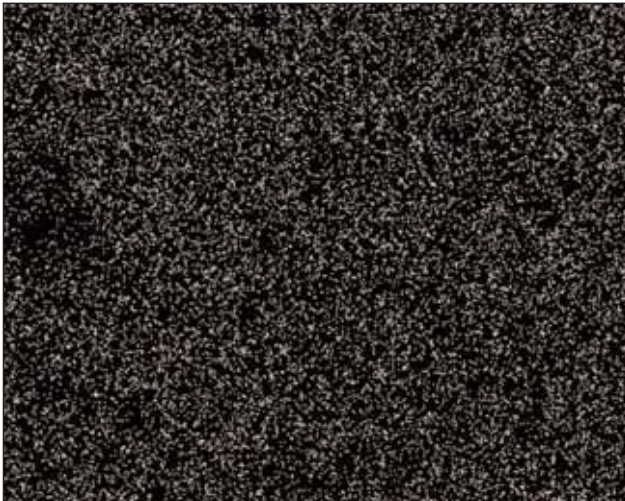


FIGURA 3. Suprafața rezultată prin sablare dublă X 1000

Examinarea suprafețelor sablate arată aspectul lor morfologic: rugos, uniform, iar gradul de rugozitate scade sau crește în funcție de valoarea și acțiunea mecanică a granulațiilor. La simpla sablare a eşantioanelor (Figurile 1-2), gradul de rugozitate și relieful accidentat al suprafețelor este direct proporțional cu mărimea granulelor de oxid de aluminiu cu care se obține porozitatea. Se remarcă faptul că adâncimea „craterelor“ nu are aceeași valoare cu mărimea granulațiilor, ele fiind mai mici de 10-20 de ori. Pentru dubla sablare (Figura 3), analiza suprafețelor rugoase neprezintă caracteristici diferite față de suprafețele eşantioanelor tratate prin simpla sablare. Astfel, a doua sablare îmbunătățește

caliatea de suprafață a eșantionului prin rotunjirea muchiilor ascuțite și tăioase ale cavitațiilor create în prima sablare.

#### b. Examinarea suprafețelor din titan tratate cu hidroxiapatită



**FIGURA 4.** Harta distribuției elementelor componente

Distribuția particulelor de hidroxiapatită este cuprinsă într-un spectru mare de dispersie situat în intervalul 0,1 μm-25 μm, predominând fracția micronică și submicronică (0,1 μm-3 μm). Repartiția elementelor constituente este prezentată în imaginile privind hărțile de distribuție din Figura 4. Se remarcă așezarea neuniformă a hidroxiapatitei pe suprafața titanului, ea fiind grupată în insule de dimensiuni diferite în care este prezent Ca și P.

#### Inserarea implanturilor

S-a ales un lot de iepuri și s-au inserat chirurgical în unghiul mandibular eșantioane din titan. Evaluarea procesului de histointegrare a implanturilor s-a făcut la 7 zile, la 30 de zile și la 60 de zile.

În ceea ce privește aspectele etice ale cercetării raportate la animale, s-au respectat strict etica, regulamentele internaționale în domeniu și legislația impusă de UE [directiva din 24 noiembrie 1986 a Consiliului Europei (86/609/EEC), recomandările „Office of Laboratory Animal Welfare“, National Institutes of Health, SUA, legile României legate de protecția animalelor).

#### a. Sterilizarea implanturilor și a instrumentarului din titan și aliajelor din titan

Implanturile și elementele protetice se livrează de către producător nesterile. Sterilizarea se efectuează înaintea implantării utilizatorului la pupinel, în conformitate cu prevederile Ordinului Ministerului

Sănătății nr. 185/2003. Este interzisă reutilizarea implanturilor sau a eșantioanelor care au fost implantate greșit și apoi extrase.

Eșantioanele sablate din titan, cu depunerile de HA, se sterilizează în blistere sterilizabile.

#### b. Tehnica chirurgicală de inserție a eșantioanelor din titan

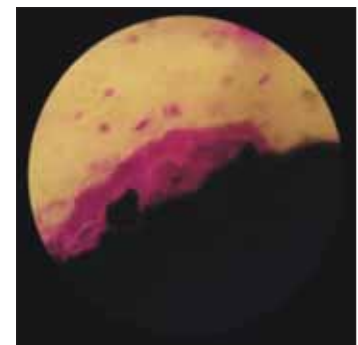
În primele 3 zile după operație, la fiecare 24 de ore în apa potabilă pentru iepuri se adăuga amoxiciclină pentru a preveni asocierea infecției. Regimul alimentar era diferit, cu includerea la început a alimentelor moi, apoi animalele au primit dieta obișnuită: pâine, morcovi, mere. Observațiile au arătat că animalele se comportau obișnuit, deși în zona operată se observă la început edem, hiperemie moderată, fenomene care dispar la 2-3 zile după intervenția chirurgicală. La un animal, edemul s-a menținut 4 zile, iar după aseptizarea țesuturilor cu tinctură de iod de 5% edemul a dispărut în a 6-a zi.

### REZULTATE

#### Imagini la microscopia optică la o săptămână de la inserarea implanturilor

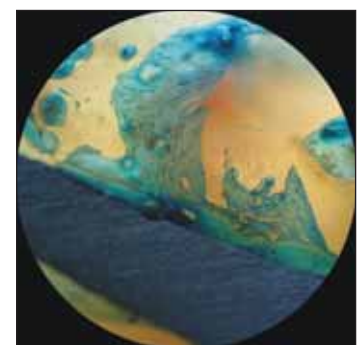
##### a. Implanturi cu sablare simplă cu oxid de aluminiu, granulație de 250 μm

**FIGURA 5. MO X 800.** Pe suprafața implantului se pun în evidență vârful ascuțite rămase după sablare și spațiul lacunar dintre implant și os, cu o vascularizație bogată. Colorație: violet de gențiană 2%.



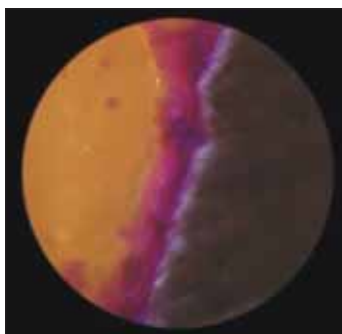
##### b. Implanturi cu sablare dublă cu oxid de aluminiu, granulație de 250 μm și 50 μm.

**FIGURA 6. MO X 700.** Suprafața cu SD a implantului este uniformă, vârful rotunjite. Țesutul de granulație prezent, cu o circulație sangvină bogată. Colorație: albastru de metilen 2%.



**c. Implanturi sablate cu depunerea pe suprafața lor a HA.**

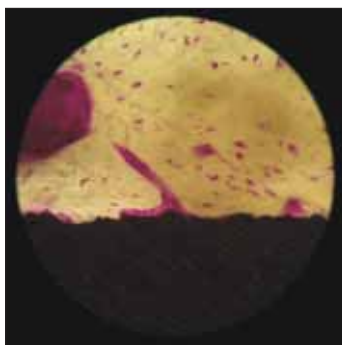
**FIGURA 7. MO X 600.**  
Se observă stratul de HA aplicat pe suprafața implantului și fenomenele de congestie periferică. Colorație: violet de gențiană 2%.



**Imagini la microscopia optică la două luni de la inserarea implanturilor**

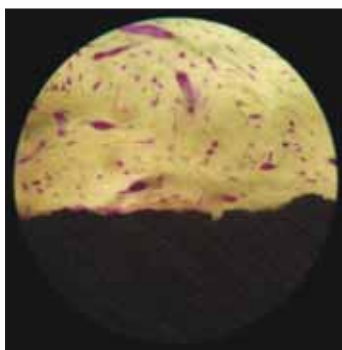
**a. Implanturi cu sablare simplă cu oxid de aluminiu, granulație de 250 μm.**

**FIGURA 8. MO X 600.**  
Țesut de granulație redus, mărginit de trabecule osoase cu contur neregulat. Colorație: violet de gențiană 2%.



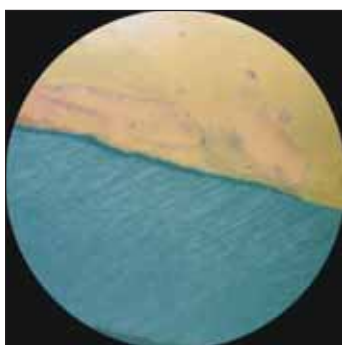
**b. Implanturi cu sablare dublă cu oxid de aluminiu, granulație de 250 μm și 50 μm.**

**FIGURA 9. MO X 500.**  
Este prezentă o congestie în jurul implantului și în țesutul osos alături de osteogeneza în dezvoltare. Colorație: violet de gențiană 2%.



**c. Implanturi sablate cu depunerea pe suprafața lor a HA.**

**FIGURA 10. MO X 500.**  
Pe suprafața implantului, HA este nerezorbită. Defectul osos este umplut cu structură osoasă, care substituie complet țesutul fibros. Se observă travee subțiri de țesut osos. Colorație: violet de gențiană 2%.



## DISCUȚII

După fixarea și decalcificarea preparatelor, s-au pregătit piesele histologice. Secțiunile histologice au fost colorate cu albastru de metilen 2% sau violet de gențiană 2% și examinate la microscopul optic.

### Particularități ale procesului de histointegrare la 7 zile

La 7 zile după operație se observă zona defectului osos, periferia căruia este ocupată de țesut de granulație, bogat în celule și vase sangvine. Osul mandibular este traumatizat, dar nu se observă fenomene inflamatorii în desfășurare. De asemenea, imaginea la microscopul electronic pune în evidență spațiul implant-os cu debridările osoase postchirurgicale de inserare a implanturilor.

### Particularități ale procesului de histointegrare la 30 de zile

În secțiunile obținute din profunzimea materialului colectat din zona implantului, apare o arie de țesut de granulație, mărginită de trabecule osoase cu contur neregulat, pe suprafața cărora se depistează numeroase osteoblaste în fază activă, care formează travee și punți osoase spre implant. Lama de țesut osos distrusă în operație se restabilește prin formarea de os din ambele margini ale defectului chirurgical. Fenomenele de refacere a osului sunt mai avansate pentru implantul care are suprafața tratată mecanic prin dubla sablare, față de cel care a primit un tratament de suprafață prin sablare simplă cu oxid de aluminiu cu granulație de 250 μm.

La implantul tratat la suprafață cu HA, în zona defectului osos se observă un platou de țesut osos nou-format. Între țesutul osos nou-format și peretele osos al defectului creat rămâne o zonă foarte îngustă, ocupată de țesut fibros bogat în vase sangvine, macrofage și osteoclaste situate pe suprafața traveelor osoase. În secțiunile histologice din zonele mai profunde ale țesutului studiat zona defectului este aproape complet ocupată de țesut osos nou format, țesutul conjunctiv păstrându-se în formă de fâșie îngustă numai pe suprafața peretelui.

Imaginea microscopică arată în apropierea HA sectoare de țesut osos maturizat concomitent cu procesul de remodelare a osului cu participarea activă a osteoclastelor.

### Particularități ale procesului de histointegrare la 60 de zile

După 60 de zile de la intervenția chirurgicală, defectul osos în mandibulă produs de inserția

implantului, este umplut cu structură osoasă, care substituie complet țesutul fibros. Spațiul dintre implant și osul adiacent are dimensiune redusă, el fiind complet estompat la implanturile tratate prin dublă sablare sau cele acoperite cu HA. Se observă travee subțiri de țesut osos nou format, cu o rețea în ochiurile căreia se află țesut fibros, aria fiind acoperită cu multiple travee osoase, la periferia căruia sunt situate numeroase celule osoase tinere.

Pentru implanturile din titan acoperite cu HA, locul defectului osos este substituit de țesut osos spongios, travee osoase nou-formate bine structurate, numeroase osteoblaste și osteoclaste pe suprafața traveelor osoase.

În nici una dintre piesele histologice n-au fost observate procese inflamatorii, modificări distructive sau necroza țesuturilor osoase. De asemenea, n-au fost depistate granule de HA la distanță de implant. Există zone în care traveele osoase cresc în dimensiuni și capătă o structură lamelară, în comparație cu procesele de histointegrare după 30 de zile.

## CONCLUZII

Pentru a realiza scopul și obiectivele propuse, a fost elaborat un model experimental de studiu in vivo, pentru care am aplicat metode moderne de investigații. Au fost prezentate argumente care demonstrează, comparativ, efectul de histointegrare diferit al implantelor din titan cu o structură superficială tratată prin diferite metode.

Tratamentul de suprafață al implanturilor din titan și obținerea de microretenții superficiale prin sablare, determină o energie superficială care face ca celulele vii să rămână aranjate în jurul implantului și să contribuie la osteointegrarea implantului. Astfel, pentru implanturile care au o sablare dublă, se observă o mai bună apozitie osoasă în jurul implantului, mai ales în perioada precoce a vindecării.

Implanturile tratate la suprafață cu HA realizează o reacție mai rapidă în procesul de osteointegrare. Formarea de țesut osos pe suprafața granulelor de HA demonstrează capacitatea osteoconductoare a biomaterialului cercetat.

## Mulțumiri

*Aducem mulțumiri colectivului de cercetători conduși de Dr. Ing. Piticescu R. de la IMNR București care au realizat depunerea pe titan a HA prin metoda Spin coating.*

## BIBLIOGRAFIE

1. Kareem H., El Askary, Abd El Salam – Regenerative barriers in immediate implant placement: A literature review – *Implant Dentistry*, Vol. 17(3), 360-371, 2008.
2. Uram-Tuculescu S., Bratu E., Lakatos S. – Titanul în stomatologie – Ed. Signata, Timișoara, 37-45, 2001.
3. Veis A., Dabarakis, N., Parisi N. A., Tsirlis A., Karanikola T. – Bone regeneration around implants using spherical and granular forms of bioactive glass particles – *Implant Dentistry*, Vol. 15(4), 386-394, 2006.
4. Ozen J., Ural A.U., Dalkiz M., Beydemir B. – Influence of dental alloys and an all-ceramic material on cell viability and interleukin-1 beta release in a three-dimensional cell culture model – *J. Med. Scien.*, vol. 35, 203-208, 2005.
5. Campos M.I., Godoy dos Santos, Leme M. S., Trevilatto P.C. – Interleukin-2 and Interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants – *Implant Dentistry*, Vol. 14(4), 391-398, 2005.
6. Vidigal G. M. Jr., Crispino A. F., Groisman M, Soares de A. – Histomorphometric analysis of HA-coated implants interface with irradiated and nonirradiated bone – *Implant Dentistry*, Vol. 17(4), 414-421, 2008.
7. Nishikawa T., Kazuya M., Kazuya T., Yoshihisa K. – Bone repair analysis in a novel biodegradable hydroxyapatite/collagen composite implanted in bone – *Implant Dentistry*, Vol. 14(3), 252-260, 2005.
8. Wennerberg A., Albrektsson T. – Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screw blasted with 25 um and 75 um sized particles of Al O<sub>3</sub> – *Journ. of Biomedical Materials Research*, vol.30, 251-260, 1996.
9. Piticescu R., Chițanu G.C., Popescu M.L., Lojkowski W., Opalinska A., Strachowski T. – New hydroxyapatite based nanomaterials for potential use in medical field – *Annals of Transplantation* vol. 9 (1A), 20-25, 2004.
10. Nagai M., Hayakawa T., Fukatsu A., Yamamoto M., Fukumoto M., Nagahama F., Mishima H., Yoshinari M., Nemoto K., Kato T. – In vitro study of collagen coating of titanium implants for initial attachment – *Dent. Mater. J.* vol. 21, 250-260, 2002.