

**mgr inż. tech. dent. Tadeusz ZDZIECH^a, dr Bogusław RAJCHEL^b,
prof. dr hab. n. tech. Maciej HAJDUGA^c**

^a Wyższa Szkoła Inżynierii Dentystycznej w Ustroniu / School of Dental Engineering in Ustron

^b Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk
Institute of Nuclear Physics. Henry Nuclear Physics Polish Academy of Sciences

^c Akademia Techniczno-Humanistyczna, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Bielsko-Biała
University of Technology and Humanities, Faculty of Mechanical Engineering and Computer Science, Bielsko-Biała

WPŁYW CHARAKTERU WARSTWY WIERZCHNIEJ TYTANOWEGO IMPLANTU PROTETYCZNEGO NA ADHEZJĘ FLORY BAKTERYJNEJ

Streszczenie

Wstęp i cel: Celem pracy jest analiza stopnia adhezji mikroorganizmów do powierzchni implantów protetycznych, w zależności zastosowania lub braku obróbki modyfikującej powierzchnie implantu. Warstwa wierzchnia wszczepu tytanowego została zmodyfikowana poprzez implantację jonów srebra, dawką jonów 10^{16} jon/cm² i energii implantacji 15 keV.

Materiał i metody: Badania zostały przeprowadzone na ośmiu wybranych gatunkach mikroorganizmów testowych należących do spektrum zarazków. Badaniu zostały poddane implanty stomatologiczne opracowane w systemie SPI®, który powstał na podstawie systemu HaTi Ladormana.

Wyniki: Zastosowanie obróbki modyfikującej powierzchnie implantów tytanowych, poprzez implantację jonów w strukturę zewnętrzną może być jednym z czynników ograniczających reakcje zapalne wokół wprowadzanych wszczepów.

Wniosek: Przeprowadzone badania mikrobiologiczne szczepów bakteryjnych, wykazały zwiększoną ilość szczepów na niezmodyfikowanej powierzchni tytanowego implantu w porównaniu z powierzchnią zmodyfikowaną jonami srebra, wpływając na ograniczenie reakcji zapalnych wokół wprowadzonego wszczepu.

Słowa kluczowe: Analiza, implantacja, *periimplantitis*, szczepy bakteryjne, działanie bakterio-bójcze, reakcje zapalne.

(Otrzymano: 08.04.2014; Zrecenzowano: 30.04.2014; Zaakceptowano: 05.05.2014)

EFFECT OF THE CHARACTER SURFACE LAYER TITANIUM PROSTHETIC IMPLANT ON THE BACTERIAL FLORA ADHESION

Abstract

Introduction and aim: The purpose of this study was to determine the degree of adhesion of microorganisms to the surface of prosthetic implants, depending on the environment in which the implant is used and surface prep techniques used to prepare the implant. The outer layer of the titanium implant has been treated to a silver ion implantation process at 10^{16} ions/cm² at a implantation energy level of 15 keV.

Material and methods: The tests were performed using eight different strains of microorganisms. Tests were carried out on eight selected species of micro-organisms belonging to the spectrum of test germs. Study were subjected to dental implants developed in the SPI ® System, which is based on the system Hati Ladormana

Results: The use of surface modifying treatment of titanium implants, ion implantation through the outer structure may be one of the factors limiting inflammatory reactions around the implant.

Conclusion: The results of the microbiological tests have indicated that the unmodified surface of the titanium implants were more prone to microbial adhesion when compared to the silver Ion implanted implant surface.

Keywords: Analysis, implantation, *periimplantitis*, bacterial strains, bactericidal activity, inflammatory reactions.

(Received: 08.04.2014; Revised: 30.04.2014; Accepted: 05.05.2014)

1. Wstęp

Pojęcie implantacji (wszczepianie), która w stomatologii określana jest implanoprotetyką, odnosi się do śródtkankowego wprowadzenia aloplastycznego lub ksenogenego materiału na drodze działań rekonstrukcyjnych w zakresie łuków zębowych i wzajemnej relacji okluzyjnej szczęki i żuchwy.

Jest to najbardziej skomplikowana i daleko bardziej od innych inwazyjna metoda rekonstrukcji czynnościowej układu stomatognatycznego zarówno w normie fizjologicznej, jak i zaburzeniach jego funkcji.

Odgrywa też niebagatelna rolę w poprawie estetycznej oraz w celu uniknięcia postępu procesu inwolucji [1], [5].

Praktycznym celem nowoczesnej implantoprotetyki jest poprawa funkcji żucia, poprzez stabilizację uzupełnienia protetycznego, eliminację protezy ruchomej, ochronę tkanek zęba naturalnego, zapobieganie resorpcji kości, jak i wymagania subiektywne [6].

Pozytywny wynik leczenia implantoprotetycznego jest uzależniony od uzyskania osteointegracji wszczepów filarowych, czyli bezpośredniego, strukturalnego i czynnościowego połączenia pomiędzy żywą kością, a powierzchnią wszczepu.

Jednym z kryteriów świadczących o kostnej integracji wszczepu jest jego stabilizacja wtórna, która zależy od techniki operacyjnej, gęstości tkanki kostnej, sposobu opracowania łoża implantu, rodzaju powierzchni i kształtu implantu, a także od stabilizacji pierwotnej. Implantacja wszczepów nie zawsze łączy się z sukcesem.

Jednym z powodów niepowodzenia leczenia, który często wpływa na utratę wszczepu, jest zapalenie tkanek wokół implantu, określane mianem periimplantitis. Zapalenie okołowszczepowe (*periimplantitis*), określane jest jako reakcja zapalna wokół wprowadzonego wszczepu protetycznego, którego efektem jest postępujący ubytek tkanki kostnej, w której osadzony jest implant. Objawami, które wskazują na stan zapalny są między innymi: krwawienie, zwiększona głębokość sondowania, ruchomość i ropienie. Do czynników wpływających na wystąpienie objawów *periimplantitis* należą: występowanie patogennej mikroflory, nadmierne przeciążenie (bruksizm, parafunkcje) i indywidualnej reakcji systemu immunologicznego na występujące czynniki chorobotwórcze [7].

Elementami współodpowiedzialnymi za wystąpienie postępujących okołowszczepowych ubytków kostnych należy, ilość i jakość łoża kostnego, jak i dominacja Gram-dodatnich bez-tlenowców [1], [3].

Spośród mikroorganizmów parodontogennych, które zostały zaobserwowane w okolicy zagrożonych wszczepów, można wyróżnić: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetem comitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter recta*, *Peptostreptococcus micros*, *Bacteroides forsythus*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella nigrescens*, i gatunki capnocytoforów.

Również występują zarazki takie jak enterobakteie, *Staphylokokki* i *Candida*, które nie łączą się z periodontopatią, lecz są charakterystyczne dla pacjentów o złym stanie zdrowia i noszących protezy dentystyczne.

2. Materiał przeznaczony do badań

Badaniu zostały poddane implanty stomatologiczne opracowane w systemie SPI® (*j.ang. Swiss Precision Implant*), który powstał na podstawie systemu HaTi Ladormana. Producentem jest Szwajcarska firma *Thommen Medical Waldenburg*.

Implanty w systemie SPI® stosowane są zarówno w metodzie poddziąsłowej jak i przezdziąsłowej. Posiadają identyczne platformy dopasowane do typowych i indywidualnych nadbudów protetycznych.

Wykonywane są one z tytanu typu Grade4, charakteryzując się wysoką wytrzymałością i precyzją wykonania. Tabela 1 przedstawia skład chemiczny implantu tytanowego.

Tab. 1. Skład chemiczny tytanu typu Grade4
Tab. 1. The chemical composition of type titanium Grade4

Rodzaj pierwiastka:	Zawartość: %
Ti	99,00
C	< 0,10
Fe	< 0,50
H	< 0,0015
N	< 0,05
O	< 0,40

Źródło: Opracowanie własne Autorów
Source: Elaborated by the Authors

Wszystkie implanty SPI® mają kształt śruby, posiadają samonacinający gwint, a ich śródkostna część (infrastruktura) ma kształt cylindryczny lub stożkowo-cylindryczny. Stożkowaty zaokrąglony wierzchołek, sprzyja optymalnemu umieszczeniu implantu w łożu kostnym.

Dodatkowo, powierzchnia infrastruktury implantu jest wypiaszkowana tlenkiem glinu Al_2O_3 o gradacji 25 - 50 μm i termicznie wytrawiona roztworem kwasów - 50% HCl (32%), 25% H_2SO_4 (95-97%) i 25% H_2O w temperaturze 108 $^{\circ}C$, przez 5 minut, wpływając pozytywnie na proces osteointegracji.

3. Modyfikacja warstwy wierzchniej implantu

Implant uzyskuje swoje podstawowe cechy oraz biokompatybilność, dzięki składowi chemicznemu materiału, z którego został zbudowany. Największe jednak znaczenie dla akceptacji implantu przez tkankę, czyli procesu osteointegracji, ma skład jego warstwy wierzchniej. Z tego powodu coraz szersze zastosowanie mają obróbki modyfikujące powierzchnie implantów tytanowych, do których należą: implantacja jonów, utlenianie anodowe, procesy natryskiwania cieplnego, metoda zol-żel, procesy jarzeniowe oraz coraz popularniejsze metody hybrydowe.

Implantacja jonów jest procesem domieszkowania materiałów opartym o wykorzystanie wysokiej energii kinetycznej. Atomy domieszki są jonizowane w źródle jonów, a następnie przyspieszone w polu elektrycznym do energii od kilkudziesięciu do kilkuset kiloelektronowoltów (odpowiadającej prędkości setek do tysięcy kilometrów na sekundę). Uformowana wiązka jonów kierowana jest na powierzchnię dowolnego materiału. Dzięki odpowiednio dużej energii jonów zostają one wprowadzone (wbite) do bombardowanego materiału na głębokość do jednego mikrometra [7].

W tym przypadku warstwa wierzchnia implantu tytanowego została poddana procesowi implantacji jonów srebra dawką jonów 10^{16} / jon/cm² i energii implantacji 15 keV, za pomocą dwuwiązkowego implantatora jonów, w Instytucie Fizyki Jądrowej w Krakowie.

Urządzenie to umożliwia stosowanie metod jonowych do konstytuowania warstw wierzchnich ciał stałych oraz do formowania złożonych powłok ciał stałych. Proces implantacji jonów srebra został przeprowadzony na całej powierzchni cylindrycznego implantu wraz z gwintem poprzez zmianę kąta ustawienia pozycji horyzontalnej powierzchni impantu co 15°.

4. Metodyka badań

Badanie adhezji szczepów do implantu przeprowadzono na 5 szczepach testowych: *Actinobacillus actinomycetum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter recta*, *Peptostreptococcus miros*, *Bacteroides*, *Streptococcus mutant*. Wymienione szczepy wysiewano na Agar wzbogacony z dodatkiem 5% krwi baraniej i inkubowano przez 72 godziny w 37° C w warunkach beztlenowych z dodatkiem 5% CO₂. Po tym czasie szczepy zawieszano w roztworze fizjologicznej soli (10³ komórek/ml).

W każdej zawieszynie z mikroorganizmami umieszczano oba implanty. Próbę kontrolną stanowiły implanty zawieszane w soli fizjologicznej. Implanty w zawieszynie mikroorganizmów oraz w soli fizjologicznej inkubowano przez 60 minut w 37° C, wstrząsając zawieszyną co 15 minut. Po inkubacji implanty przemywano trzykrotnie w roztworze soli fizjologicznej, następnie umieszczono je w jałowej wilgotnej komorze.

W tym samym dniu, a następnie w odstępach 24 h. z komory wyjmowano implanty. Po osuszeniu implanty przykładano, a następnie delikatnie toczono na agarze wzbogaconym krwią. Hodowle inkubowano przez 72 godz. w 37° C, w warunkach beztlenowych z dodatkiem CO₂, po czym liczono wyrosłe kolonie.

Referencyjny szczep *Streptococcus mutans* wysiewano na agar wzbogacony. Hodowlę w warunkach tlenowych i w temperaturze 37° C inkubowano przez 48 godzin. Uzyskaną hodowlę zmywano roztworem soli fizjologicznej (PBS) i doprowadzano do gęstości 2McF. Uzyskaną w ten sposób zawieszynę bakteryjną podzielono na dwie części - jedną inkubowano przez 1 godzinę, natomiast drugą przez 3 godziny w temperaturze 25° C.

Po inkubacji wykonano testy pozwalające na określenie stopnia adhezji mikroorganizmów do implantów. Wykonano następujące testy: Alamar blue, redukcji MTT oraz barwienie safraniną.

W przypadku inkubacji przez 24h bakterie inkubowano w podłożu mikrobiologicznym BHI (*ang. Brain Heart Infusion*).

4. Wyniki badań

Wyniki przeżywalności bakterii na implantach poddanych procesowi implantacji jonów srebra zamieszczono w tabeli 2.

Natomiast wyniki przeżywalności bakterii na implantach bez powłoki jonów srebra zamieszczono w tabeli 3.

5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnosić co następuje:

- Przeprowadzone badania mikrobiologiczne wybranych szczepów bakteryjnych, wykazały zmniejszoną przeżywalność bakterii na implantach z jonami srebra, w porównaniu z przeżywalnością bakterii na implantach, których powierzchnia nie została nimi wzbogacona.
- Zastosowanie obróbki modyfikującej powierzchnie implantów tytanowych, poprzez implantację jonów w strukturę zewnętrzną może być jednym z czynników ograniczających reakcje zapalne wokół wprowadzanych wszczepów.

Tab. 2. Przeżywalność bakterii na implantach poddanych procesowi implantacji jonami srebra
Wynik pierwszego i drugiego badania

Tab. 2. Survival of bacteria on implants subjected to the process of implantation of silver ions
The result of the first and second test

Dzień inkubacji	Liczba wyrosłych kolonii									
	<i>Actinobacillus actinomycetum</i>		<i>Fusobacterium nucleatum</i>		<i>Campylobacter recta</i>		<i>Peptostreptococcus miros</i>		<i>Bacteroides forsythus</i>	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	108	93	82	76	52	73	99	101	94	89
2	94	83	63	69	68	52	81	92	67	69
3	80	73	33	31	42	36	36	31	39	32
4	46	62	12	11	2	4	13	10	8	14
5	12	15	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Źródło: Opracowanie własne Autorów

Source: Elaborated by the Authors

Tab. 3. Przeżywalność bakterii na implantach nie poddanych procesowi implantacji jonami srebra
Wynik pierwszego i drugiego badania

Tab. 3. Survival of bacteria on implants not subjected to the process of implantation of silver ions
The result of the first and second test

Dzień inkubacji	Liczba wyrosłych kolonii									
	<i>Actinobacillus actinomycetum</i>		<i>Fusobacterium nucleatum</i>		<i>Campylobacter recta</i>		<i>Peptostreptococcus miros</i>		<i>Bacteroides forsythus</i>	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	156	149	141	152	126	143	149	132	121	131
2	123	127	131	127	117	127	127	112	85	98
3	115	121	84	111	90	66	73	81	72	81
4	83	92	62	73	63	44	53	69	35	39
5	79	85	56	62	32	35	32	42	12	21
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Źródło: Opracowanie własne Autorów

Source: Elaborated by the Authors

Literatura

- [1] Ackermann, Al-Nawas B., Behneke A.: *Implantologia*. Wyd. Medyczne Urban & Partner. Wrocław 2004.
- [2] Knychalska-Karwan Z.: *Stomatologia wieku podeszłego*. Wyd. Czelej, 2009.
- [3] Majewski S.P.: *Biologiczne mechanizmy przebudowy struktur kostnych i gojenia tkanek miękkich jamy ustnej po zabiegach implantacyjnych*. Implantoprotetyka 2009, Nr 1, s.3-7.
- [4] Pamuła E., Menaszek E., Orzelski M., Simanowicz P., Krok M., Rumian Ł., Dobrzyński P.: *Modyfikacja powłoki DLC metoda implantacji jonów srebra*. Inżynieria Biomateriałów, 2011, Nr 105, s. 2-4.
- [5] Rateitschak E., M., Wolf H., F., Rateitschak K., H.: *Periodontologia*. Wyd. Czelej, 2012.
- [6] Spiechowicz E.: *Protetyka stomatologiczna. Podręcznik dla studentów stomatologii*. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, 2006.
- [7] Zbigniew J.: *Choroby przyzębia. Zapobieganie, diagnostyka i leczenie*. Wyd. PZWL 2005.