Наноструктуровані поверхні зубних імплантатів

Еріберто Брессан[1], Лука Сбріколі[1], Ріккардо Гвассо[1], Іларія Токко[1], Марко Роман[2], Вінченцо Вінді-ні[1], Едоардо Стеллініі[1], Чіара Гардін[3], Летиція Ферроні[3], Стефано Сіволелла[1], Барбара Заван[3]

[1]Відділ нейронаук Університету Падуї, Падуя, Італія

[2]IDPA-CNR, Інститут динаміки екологічних систем Калле Ларга С. Марта 2137, Венеція (VE), Італія

[3]Відділення медико-біологічних наук Університету Падуї, Падуя, Італія

Nanostructured Surfaces of Dental Implants, Int. J. Mol. Sci. 2013, 14 , 1918-1931; doi:10.3390/ijms14011918

Резюме. Структурне і функціональне сполучення поверхні зубного імплантату з прилеглою кістковою тканиною (остеоінтеграція) має вирішальне значення для короткострокових і віддалених наслідків використання імплантату. Останнім часом посилення остеогенезу в області контакту кістки з імплантатом досягалось шляхом модуляції розширення та адгезії остеобластів, що забезпечувалось за рахунок структурних модифікацій поверхні імплантату, зокрема на рівні нанорозміру. В цьому контексті традиційні хімічні та фізичні процеси знаходять нове застосування для створення передових технологій імплантації в стоматології. У цій статті наводиться загальний огляд найпоширеніших способів виробництва, а також відповідних ситуацій та клітинно-поверхневих взаємозв'язків. У мережі Medline та вручну було проведено пошук досліджень, присвячених наноструктуризації поверхонь імплантатів і відповідним біологічним процесам. Особливу увагу приділено модифікаціям поверхні зубного імплантату на нанометровому рівні. Сьогодні, як і раніше, дуже мало доказових довгострокових даних про переваги наноструктурування рельєфу поверхні, оскільки перспективні результати, отримані в умовах in vitro та в результаті проведення досліджень на тваринах, ще необхідно підтвердити у процесі використання на людях. Однак немає жодних сумнівів щодо зростання зацікавленості у використанні нанотехнологій, і найближчим часом очікується публікація результатів низки досліджень.

Ключові слова: стовбурові клітини дорослих людей, нанотехнології, диференціація, остеогенез, поверхня, зубні імплантати.

ВСТУП

В останні 30 років імплантологія в стоматологічній практиці зазнавала повільного, але постійного розвитку. Коли через карієс, захворювання пародонту або адентію людина втрачає зуби, для заміни відсутніх зубів та для підтримки знімних протезів використовуються зубні імплантати або набори штучних зубів. Хірургічна процедура загалом стандартизована: місце майбутньої імплантації на кістці препарують калібровочними борами, потім у це місце вкручують титановий гвинтовий штифт із точно заданим обертальним моментом і швидкістю, тобто за чітко визначений період часу. Кінцева реставрація виконується, як правило, за декілька місяців. За цей час відбувається остеоінтеграція імплантату.

Після появи ідеї остеоінтеграції наприкінці 1970-х і 1980-х [1, 2], мало хто міг передбачити, що зубні імплантати вже за декілька років зроблять справжній фурор. Остеоінтеграція – це фактично структурне та функціональне зрощення поверхні імплантату з навколишньою кістковою тканиною. Саме остеоінтеграція вважається ключовим фактором короткострокового і віддаленого успіху

stomatol_2_14.indd 58 17.06.2014 12:36:06

зубного імплантату, і цей процес безпосередньо пов'язаний як з геометрією та топографією поверхні імплантату, так і з застосованою хірургічною методикою імплантації. Це зумовлює постійну зацікавленість технологіями стоматологічної імплантації. Розробляються такі системи імплантатів, які мають максимально відтворювати численні взаємодії на клітинному рівні, що зазвичай відбуваються при реконструкції кістки. Тому синтетичні матеріали повинні мати особливі елементи рельєфу поверхні, які за формою та діаметром максимально наближені до кісткової тканини, що необхідно для посилення інтенсивності й ступеня остеоінтеграції. Особливості елементів поверхні імплантату можна охарактеризувати відповідно до розмірів імплантатів.

На макроскопічному рівні конструкція гвинтових штифтів, форма та крок різьби є основними факторами стабілізації імплантатів. Згідно з висновками Abuhussein та співавт. [3] зубні імплантати мають проектуватись таким чином, щоб максимально забезпечувались сприятливі навантаження і мінімізувались несприятливі впливи вздовж лінії контакту імплантату з кісткою. Зокрема, збільшити площу поверхні контакту з оточуючою кістковою тканиною допомагає застосування меншого кроку та глибшої різьби, а також довших і більших імплантатів.

На мікроскопічному рівні розглядається покриття поверхні імплантату. Проводились дослідження in vivo [4] та in vitro [5, 6], щоб оцінити зміни взаємодій між імплантатом та кісткою під впливом модифікацій поверхні імплантату. Вважається, що мікроскопічні особливості створюють особливе мікросередовище, яке дає змогу досягти потрібної функціональності та інтеграції клітин [7]. Зокрема, автори довели, що мікрорельєф поверхні може впливати на остеоінтеграцію через протягування клітин, поліпшуючи зчеплення з клітинами [8-10]. Вважається, що вплив мікроскопічних особливостей поверхні імплантату на формування кісткової тканини в місці імплантації опосередковано бере участь в процесах остеоінтеграції [11–13].

Сьогодні подальше вдосконалення процесу остеогенезу в області контакту кістка–імплантат залежить від нановластивостей, які мають стимулювати диференціацію стовбурових клітин в області остеогенезу [7]. Нанотехнологія передбачає створення функціональних матеріалів, засобів та систем шляхом управління властивостями речовин у нанометровому масштабі (1–100 нм). Застосування нанотехнологій для біомедичних поверхонь зумовлюється здатністю клітин взаємодіяти з нанометровими частинками. Біологічна дія в основному опосередкована через інтегрини та шляхи зв'язування з аргінін-гліцин-аспартат-послідовностями пептидів. Адгезія клітин до позаклітинного матриксу (ПКМ) спричиняє кластеризацію інтегринів у фокальні адгезивні комплекси (ФА) та активує внутрішньоклітинні сигнальні каскади [14]. У зв'язку з цим нанохарактеристики мають вирішальне значення для модуляції поведінки стовбурових клітин [15]. Зокрема, було показано, що структура поверхні відіграє ключову роль, оскільки остеобласти здатні «кодувати» тримірні характеристики поверхні (наприклад, лінії, пори, точки), а також модулює їхнє нарощування відповідно до потрібних структурних особливостей [4, 10, 11]. Нанорозмірні структури настільки важливі, що навіть невелика зміна діаметру нанотрубки здатна замість адгезії клітин і широкого розмноження (спостерігається у нанотрубках TiO_2 15–30 нм) спричинити посилений їх розпад (за діаметру > 50 нм) [16]. Кавальканті-Адам та ін. [17] підтвердили це спостереження, показавши, що розмір 58 нм сприяє формуванню ФА, тоді як розмір 108 нм не справляє стимулюючого впливу на розвиток ФА.

stomatol_2_14.indd 59 17.06.2014 12:36:06

Ураховуючи важливість нановластивостей поверхонь стоматологічних імплантатів для досягнення остеоінтеграції, ми написали оглядову статтю, присвячену найпоширенішим технологіям виробництва і пов'язаним з ними клітинним взаємодіям з поверхнями.

КЛІТИНИ І ПОВЕРХНІ

За загальним визначенням, стовбурові клітини (СК) – це клітини, які здатні до самооновлення і диференціації в різних специфічних тканинах (наприклад, жирова тканина, кістки та хрящі, нервові клітини) [18]. Їхніми основними функціями є розвиток тканин, гомеостаз, і, у випадку ушкодження тканин, регенерація. Були виявлені рідкісні клітини – так звані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (МСК), які існують у різних мезенхімальних тканинах, – наприклад, у стромі кісткового мозку, жировій тканині, зубній пульпі. Наразі МСК використовуються як інноваційний інструмент у регенеративній медицині, а біологія одонтологічної області стовбурових клітин сьогодні є робочим інструментом для розробки біомедичних засобів для протезування зубів і кісток [19]. Звісно, сучасна стоматологія здатна вирішувати проблеми, пов'язані із заміщенням дефектів зубного ряду, за допомогою аутотрансплантатів або металевих імплантатів, але цим процедурам притаманні певні обмеження, зокрема пошкодження сусідніх зубів, резорбція кістки тощо.

Клітинна терапія втілює найскладніше, і, можливо, найуспішніше застосування стовбурових клітин (СК). Завдяки здатності диференціюватися на різні типи функціональних клітин, СК мають величезний терапевтичний потенціал щодо відновлення та регенерації аутологічної тканини. Нестандартна стратегія на основі СК полягає в реконструкції тканин за допомогою клітин, сполучених з придатними біоматеріалами, що дає можливість відтворити in vivo біохімічне та біофізичне мікросередовище [19]. Такий підхід вже дав перспективні результати в лікуванні незворотно пошкодженої гомологічної тканини внаслідок хвороб або травм [20]. Однак широке впровадження СК-терапії у клінічну практику можливе лише після з'ясування принципового питання щодо точного контролю над реакцією СК з точки зору самооновлення та диференціації клітин, зокрема, необхідно глибше вивчити взаємозв'язки між СК, компонентами навколишнього мікросередовища (фактори росту, міжклітинні контакти та взаємодії між клітинами й позаклітинним матриксом) з одного боку та зовнішніми силами [21] – з іншого [22].

З цієї точки зору найбільш придатними до застосування стовбуровими клітинами є людські мезенхімальні стовбурові клітини (лМСК), які здатні самооновлюватися та мають мультипотентний потенціал диференціації.

Ці клітини розвиваються в різні типи субстрат-залежних клітин, зокрема адипоцити, хондроцити, міобласти і остеобласти. Їх потенціал диференціації залежить від еластичності субстрату, геометричної форми та мікрорельєфу субстрату [23].

Адгезія між клітинами-субстратом або клітинами – позаклітинним матриксом (ПКМ) виникає за участі динамічних мультпротеїнових структур, так звані фокальні адгезії (ФА). Вони мають велике значення для передання сил, цитоскелетної регуляції та передання сигналів. У цих місцях клітини встановлюють трансмембранне сполучення між елементами ПКМ та цитоскелетним актином. Трансмембранні білки інтегрину керують цими процесами [24]. Інтегрини, гетеродимери містять альфа- і бета-субелементи, які забезпечують зв'язування власного позаклітинного домену з білками ПКМ – фібронектином, ламініном і вітронектином.

stomatol_2_14.indd 60 17.06.2014 12:36:06

Цитозольний домен інтегринів зв'язується з великою кількістю білків, зокрема з паксиліном і зиксіном, – або безпосередньо, або через структурні білки (scaffolding proteins). Деякі з цих білків беруть участь у зміцненні зв'язків між позаклітинним матриксом і цитоскелетом, інші задіяні в процесах адгезія-опосередкованого передання сигналів. Клітинну адгезію можна розділити на три категорії: фокальні комплекси (ФКс), ФА і фібрилярні адгезії. ФКс разом із головною ламеллю мігруючих клітин утворюють ранні адгезії, які перетворюються на фокальну адгезію при активації RhoA [25, 26] або в результаті зовнішніх механічних стимулів [27, 28]. ФА розвиваються у фібрилярні адгезії внаслідок скорочення актоміозину. В якості молекулярного маркера зрілих ФА було запропоновано використовувати рекрутмент білку зіксин. Зіксин полегшує полімеризацію актину у відповідь на механічні сили і виділяється з ФА при розсіюванні сил [29]. Фокусні адгезії тісно пов'язані з міграцією клітин, рушійними чинниками якої є багаторазові цикли протрузії передньої кромки, формування нових матриксних адгезій і втягування задньої кромки. ФА відіграють подвійну роль в рухливості. З одного боку, вони забезпечують надійне зв'язування з ПКМ, необхідне для виникнення в актоміозиновій системі сил, які спричиняють виштовхування вперед тіла клітини і задньої кромки, а з іншого – вони також здатні стримувати процес міграції. Механічні зв'язки між матриксом і цитоскелетом зумовлюють виникнення в клітинах тягових сил, які передаються в ядро клітини через внутрішньоклітинні шляхи, отримана сила запускає перетворення сигналів (трансдукцію) в біохімічні сигнали, які в свою чергу впливають на реакцію СК, зокрема на синтез специфічних факторів транскрипції в ядрі. Науковцями запропоновані різні шляхи механотрансдукції, в тому числі Ras/MAPK, PI3K/Akt, RhoA/Рок, Wnt/катенін і TGF-бета шляхи, які загалом базуються на інтегринових та механочутливі іонних каналах.

Останні дослідження показали, що механічні стимули, зокрема твердість субстрату, нанотопографія адгезивних поверхонь та зовнішньоклітинні сили, навіть за відсутності біохімічних факторів здатні спрямовувати метаболічні шляхи клітини in vitro.

РОЗВИТОК УТВОРЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН І КІСТКОВА ТКАНИНА

Остеогенез є активним, чітко регульованим процесом, який на кінцевому етапі забезпечує утворення нормальної васкуляризированої кісткової структури. Формування кісткової тканини залежить від взаємодії декількох факторів, а саме: (I) генезису таких специфічних типів клітин, як клітини-попередники та остеобласти, (II) мінералізованого позаклітинного матриксного каркасу, (III) розчинних біологічно активних молекул (цитокінів, факторів росту, гормонів, іонів, вітамінів), (IV) механічних стимулів. У дорослому організмі остеобласт утворюється із стромальної фібробластної стовбурової клітини кісткового мозку, яка називається мезенхімальною стовбуровою клітиною (МСК), що є негемопоетичною мультипотентною стовбуроподібною клітиною, вкрай важливою для процесів остеогенезу і здатною диференціюватися як в остеобластні, так і в неостеобластні кліткові лінії [31].

Розвиток утворення і диференціація МСК в остеогенні лінії регулюється певною групою факторів. Серед них відправним і найбільш специфічним маркером є Runx2. Runx2 активує і регулює остеогенну диференціацію за допомогою двох незалежних сигнальних шляхів через трансформуючий фактор росту бета 1 (ТРФβ-1) і кістковий морфогенетичний білок 2 (КМБ2) [32].

stomatol_2_14.indd 61 17.06.2014 12:36:06

Разом з Runx2, КМБ2 і бездистальний (distal-less) гомеобокс 5 (БДс5) комітують МСК у остеогенну лінію. Розвиток утворення є процесом, який обмежує здатність МСК реагувати та зазнавати диференціації в напрямку остеогенної лінії. Крім індукції остеогенної диференціації, Runx2 гальмує диференціацію МСК в напрямку адипогенної лінії. КМБ2 індукує експресію Osx незалежно від Runx2 [33].

Після утворення МСК диференціюються на преостеобласти. Преостеобласти мають еліптичну форму з видовженим ядром і здатні до проліферації. Вони спричиняють експресію Runx2, D1x5, msh гомеобоксний гомолог 2 (Msx2), P2Y4 і P2Y14 [34] та деякі маркери остеобластів, зокрема ALP, колаген 1-го типу і остеопонтин (ОПН), але ця експресія слабкіша, ніж незрілих остеобластів. Лужна фосфатаза є одним з найбільш ранніх білків, і вона регулює мінералізацію кісток.

Преостеобласти в незрілі остеобласти диференціюють β- катенін, Runx2 і Osx. Ці клітини мають веретеноподібну форму. Вони продукують білки кісткового матриксу, кістковий сіалопротеїн і ОПН [35].

На пізніх стадіях Runx2 гальмує дозрівання остеобластів. Osx спричиняє кінцеве дозрівання остеобластів і індукує експресію остеокальцину. Після повної диференціації остеобластів вони набувають кубічної форми і виробляють самомінералізований органічний матрикс. У зрілих остеобластах експресія ОПН зменшується, але одночасно посилюється експресія інших білків, таких як P2X5, лужна фосфатаза, колаген 1-го типу та остеокальцин [36].

ОСТЕОІНТЕГРАЦІЯ ЗУБНИХ ІМПЛАНТАТІВ

Біоматеріали за жодних обставин не можуть бути абсолютно інертними, у кращому випадку – біопереносними. Функції сполучення між клітинами та субстратом є не просто межею між організмом-хазяїном та імплантованим засобом – це, скоріше, первинні стимули клітинної адгезії і подальшої індукції та регенерації тканин. Дійсно, функціонування та цитосумісність конструкції в умовах in vitro може бути оцінена спостереженням за життєздатністю та адгезією клітин на межі з субстратом [37]. Спектр матеріалів, що сьогодні використовуються у біомедичних прикладних застосуваннях, а також відсутність у них біофункціональності відображають назрілу необхідність у біоміметичних конструкціях, а також визначають виклики в цій царині, тобто врешті-решт усе залежить від контролю взаємодій на межі сполучення клітин з субстратом [38].

Основний догмат технології медичних засобів полягає у використанні виняткової здатності біологічних систем реагувати на поверхню матеріалів або на хімічні подразники, і на цій основі розробляються наступні покоління біоматеріалів [39]. Щоб дослідити реакцію того чи іншого матеріалу в природних умовах, треба зрозуміти роль, яку відіграють цитоскелет, клітинні мембрани та позаклітинний матрикс (ПКМ) після імплантації чужорідного матеріалу [40]. Розширення знань про позаклітинне середовище, топографічні та хімічні стимули, що мають місце на клітинному рівні, а також про реакції клітин на ці стимули призвело до розробки нових ортопедичних матеріалів, які вже здатні регулювати процес прикріплення клітин і їх подальше функціонування [38].

Останнім часом стало очевидним, що клітини здатні використовувати для збору та використання просторової інформації такі особливості конфігурації поверхні, як філоподію (або мікрошипи), якщо діаметр кінців стано-

stomatol_2_14.indd 62 17.06.2014 12:36:06

вить 50–100 нм. Клітини здатні використовувати філоподію для встановлення контактного контролю з нерівномірностями поверхні розміром 10 нм, що приблизно відповідає розмірам типових білків [40]. Крім того, спостереження показали, що МСК проявляють більш сильну взаємодію з рельєфом, ніж диференційовані клітини – наприклад, фібробласти. Ці свідчення дуже сильної чутливості стовбурових клітин до свого нанооточення додають нових доказів того, що топографічне середовище є важливим фактором тканиноспецифічної диференціації [41]. Рекрутмент імунологічних клітин в області імплантату містить складний каскад імунних медіаторів, серед яких різні типи клітин, розчинні сигнальні молекули та міжклітинні взаємодії. Попередні дослідження показали, що макрофаги є основними клітинами реакції на чужорідні організми. Після прилипання до імплантованого матеріалу поодинокі клітини макрофагів у результаті складної серії подій зливаються і формують багатоядерні гігантські клітини, ця реакція супроводжується рекрутментом фібробластів і утворенням фіброзної тканини. Сполучення гігантських клітин з поверхнею біоматеріалу корелюється з вивільненням певних ферментів (наприклад, естерази, ліпази) та інших біореактивних проміжних медіаторів, які можуть призвести до руйнування або втрати імплантатом своїх функцій [37]. Звідси випливає, що регуляція клітинної адгезії, або селективна адгезія специфічних клітинних фенотипів, відіграє вирішальну роль у регулюванні оптимальної тканино-специфічної інтеграції при одночасному запобіганні рекрутменту запальних клітин і утворенню рубцевої тканини.

З іншого боку, інертні матеріали можуть успішно використовуватись і в таких прикладних застосуваннях, в яких білок або клітинні взаємодії здатні погіршити функціональність пристрою. Дослідження in vitro показали, що швидке адсорбування ендогенних білків у поверхню матеріалу забезпечує структурну основу, на якій в подальшому може початися клітинна адгезія. Сучасні імплантати використовують хімічні й топографічні модифікації для регуляції клітинної адгезії [38], диференціації та нашарування тканини de novo.

Таким чином, сьогодні вже відомо і доведено, що більшість стимулів розвитку клітини визначається такими другорядними параметрами, таких, як твердість субстрату [42], його хімічний склад [43], можливість його мінералізації [44, 45], наявність належного позаклітинного матриксу [46, 47] і багатьох інших.

Зокрема, останні досягнення в царині нанотехнологій, які охоплюють покоління мікро- та нанорозмірних структур, були успішно використані для розробки другого покоління імплантних матеріалів. Ці адаптовані стратегії детальніше описуються в наступних розділах.

МОДИФІКАЦІЇ ПОВЕРХНІ

Застосування нанотехнологій для поверхонь зубних імплантатів залежить від широкої низки передумов. Зокрема, поверхні можуть набувати організованої (ізотропної) або неорганізованої (анізотропної) структури. У зв'язку з труднощами практичного застосування стандартизованих послідовностей для складних конструкцій у зубних імплантатах, як правило, використовується анізотропна структура [48].

Для створення потрібного нанорельєфу поверхні зубних імплантатів використовується велика різноманітність методів. Їх можна поділити на хімічні та фізичні процеси.

stomatol_2_14.indd 63 17.06.2014 12:36:06

ХІМІЧНІ МОДИФІКАЦІЇ

Анодне окислення

Анодування є одним із найпоширеніших методів створення наноструктур з діаметром менше 100 нм на титанових імплантатах [49]. Для утворення оксидного шару на поверхні імплантату використовується електрична напруга та постійний струм (гальванічний струм). Титанова деталь у цьому процесі використовується в якості аноду, а в якості катоду – пластина з інертної платини. Потім до аноду і катоду під'єднуються мідні дроти, якими вони сполучаються відповідно з позитивним і від'ємним виходом джерела живлення 30В/3А.

Під час цього процесу між анодом і катодом лишається певний проміжок (приблизно 1 см), і вони занурені в розчин електроліту в тефлоновій лабораторній склянці. Електролітом є розчин фториду водню (0,5 мас. % або 1,5 мас. %). Згодом сильна кислота у деяких місцях розчиняє шар оксиду, утворюючи структуру поверхні, яка відтворює конвективні лінії гальванічного струму. Таким чином, підбираючи відповідним чином величину напруги і густини електроліту можна контролювати діаметр нанотрубок та зазор між ними (рисунок 1).

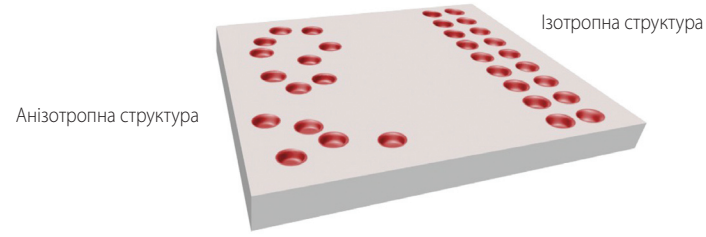

Рисунок 1
Відмінність між ізотропною (однаковість в усіх напрямках) та анізотропною наноструктурою поверхні. Через складність форм зубних імплантатів зазвичай використовується анізотропна структура поверхні

Наприклад, після анодування титану в розведеній фтористоводневій кислоті при 20 В протягом 20 хв утворюються поверхневі нанотрубки, а анодування при 10 В упродовж того ж часу створює наночастинки. Крім того, відстань між нанотрубками/наночастинками може бути різною на різних поверхнях. Нанорозмірні елементи поверхні рельєфу можуть бути розділені проміжками мікро- або нано-масштабу (рисунок 2).

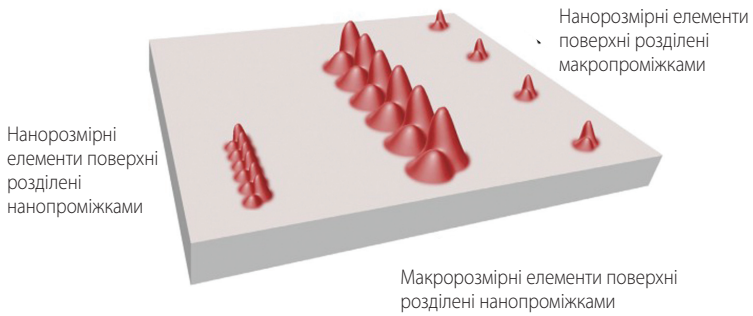

Рисунок 2
Характеризація наноповерхонь: нанорозмірні елементи поверхні розділені нанопроміжками, посередині макророзмірні елементи поверхні розділені нанопроміжками і, з іншого боку, нанорозмірні елементи поверхні розділені макропроміжками

stomatol_2_14.indd 64 17.06.2014 12:36:07

Окислювальне наноструктурування наділяє титанові метали властивістю селективно впливати на поведінку клітин шляхом посилення росту остеобластних клітин із одночасним обмеженням проліферації фібробластів. Вплив фізико-хімічних стимулів на експресію генів і білків значною мірою залежить навіть від незначних відмінностей розмірів наноелементів рельєфу поверхні, про що вже згадувалось вище [48]. Von Wilmowsky та співавт. надали докази того, що конфігурація поверхні імплантату з елементами рельєфу поверхні у формі TiO_2 нанотрубок 30 нм позитивно впливає на контакт імплантату з кісткою (КІК) та формування кісткової тканини в періімплантній області [50].

КОМБІНАЦІЇ КИСЛОТ (ОСНОВ) З ОКИСЛЮВАЧАМИ

Поєднання декількох сильних кислот є ефективним способом для створення тонкої решітки нанозаглиблень на поверхні титану (діаметром 20–100 нм) [48]. Титанову заготовку протруюють розчином сильної кислоти, наприклад, H_2SO_4 і H_2O_2 при постійній температурі протягом певного проміжку часу. Потім травлення зупиняють додаванням дистильованої води. Далі відновлені диски промивають етанолом в ультразвуковій ванні протягом 20 хв і сушать [51].

Якщо використовується анодне окислення, то регулюванням певних параметрів реакції, наприклад, температури, тривалості процесу і розчинених речовин, можна контролювати кількість і глибину нанозаглиблень, модулюючи таким чином функції клітин після імплантації. Зокрема, обробка титанового імплантату гвинтовидної форми кислотою H_2SO_4–H_2O_2 створює наноструктуру, яка в умовах in vivo продемонструвала здатність посилювати остеогенез [48]. Vetrone та співавт. [52] підтвердили це спостереження, заявивши про стимуляцію росту стовбурових клітин за допомогою окислювального наноструктурування. Феррейра із співавт. [15] додатково охарактеризували найоптимальне нанорозташування нанотрубок TiO_2 і виявили, що діаметр 15 нм з вертикальним згладжуванням пов'язаний із більшим поширенням та посиленою диференціацією мезенхімальних стовбурових клітин пацюків в області остеогенної лінії. Зазначимо, що розмір 15 нм приблизно відповідає теретичним горизонтальним інтервалам інтегрінових рецепторів в ФА комплексах [53] (рисунок 3).

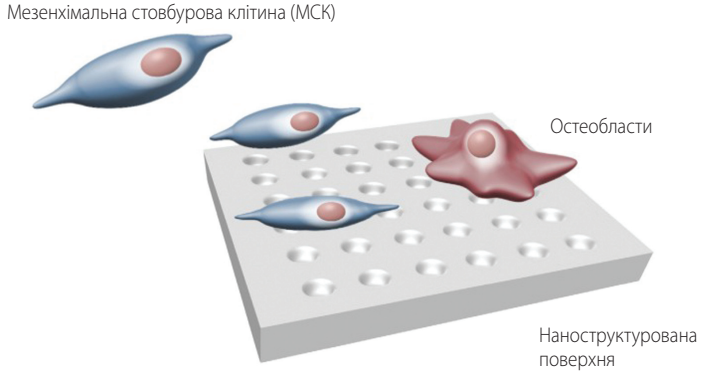

Рисунок 3
Процес диференціації мезенхімальних стовбурових клітини (МСК). Наноструктуровані поверхні сприяють остеогенній диференціації МСК при одночасному обмеженні диференціації фібробластів

stomatol_2_14.indd 65 17.06.2014 12:36:07

ФІЗИЧНІ МОДИФІКАЦІЇ

Плазмове напилення

Процес плазмового напилення дозволяє створювати високотехнологічні наноструктури з розмірами елементів рельєфу поверхні зазвичай менше 100 нм. Спочатку у вакуумі з поверхні видаляється бруд. Потім під дією кінетичної енергії заряджені іони металів або плазми бомбардують поверхню заготовки. Цей процес дозволяє на різні матеріали (наприклад, метали, полімери, кераміку) наносити плівки з різних металів (наприклад, Ag, Au, Ti тощо) [54]. У стоматологічних імплантатах частинки титану осаджуються на поверхню за однорідною структурою.

Дослідження in vitro та in vivo продемонстрували, що щільність остеобластів на поверхні імплантату можна підвищити нанокорпускулярним осадженням частинок титану за допомогою технологій плазмового напилення. Так, Reising і співавт. [54] виявили інтенсивніше відкладення кальцію на вкритих титаном наноповерхнях порівняно з поверхнями без титанового покриття.

Бластинг (струминна обробка)

Бластинг – це метод, коли за допомогою обробки струменем мікроскопічних частинок на поверхні імплантату створюється пористий шар. Його товщина регулюється гранулометричними параметрами частинок. Наприклад, поверхня серійних внутрішньокісткових титанових імплантатів являє собою пористий шар з шорсткістю у діапазоні від 50 до 200 нм, створений за допомогою корпускулярного бластингу і обробки фтористим воднем [48]. Доведено, що шорстка поверхня стимулює експресію остеобластних генів, а також посилює формування кісткової тканини і фіксацію імплантату в кістці, тобто сприяє остеоінтеграції [55, 56]. Хоча й повідомлялись поодинокі випадки асоційованих запальних реакцій [57], частота успіху загадом задовільна і більшість імплантатів через рік після операції забезпечували хорошу остеоінтеграцію та стабільність [48].

Серед різних доступних матеріалів для бластингу найчастіше використовують оксид алюмінію. Однак Апарісіо із співавт. [58] виявили певні особливості бластингу алюмінієм стоматологічних імплантатів, які можуть несприятливо впливати на остеоінтеграцію. Серед таких особливостей можна виділити від'єднання частинок під час загоювання і абсорбцію в прилеглі тканини.

TiO_2, який також використовується для бластингу, виявив під час експериментальних досліджень цікаві результати. Зокрема, оброблені TiO_2-бластингом імплантати корелювали зі значним збільшенням БІК порівняно з механічно обробленими поверхнями [59]. Цей результат був підтверджений Расмуссоном із співавт. [60], які досліджували остеогенні властивості титанових поверхонь, оброблених корпускулярним бластингом.

Подальше вдосконалення бластингової технології було досягнуто за рахунок впровадження кислотного травлення та корпускулярного бластингу біокераміки (BGB/AE), що дало можливість отримати субмікрометричну топологію поверхні титанових імплантатів. Проведені за два місяці після встановлення імплантатів оцінювання показали достовірно більш високий БІК та щільність остеоцитів навколо модифікованих імплантатів порівняно із звичайними імплантатами, обробленими травленням двома кислотами [48]. З клінічної точки зору поєднання бластингу і травлення на поверхнях корелювало з 96,2 % загальним рівнем успіху за десятирічний термін [61]. Не дивно, що в подальшому Masaki та співавт. [62] продемонстрували, що навколо поверхні таких імплантатів людські мезенхімальні стовбурові клітини підвищували експресію

stomatol_2_14.indd 66 17.06.2014 12:36:07

коллагену 1-го типу і лужної фосфатази, яка є ключовим ферментом біомінералізації на поверхні контакту імплантату з кістковою тканиною.

ВИСНОВКИ

У цій статті основну увагу приділено модифікаціям поверхні стоматологічних імплантатів на нанометровому рівні. Сьогодні, як і раніше, немає достатньо доказів довгострокових переваг нанорозмірних елементів рельєфу поверхні, оскільки перспективні результати, отримані під час досліджень in vitro та на тваринах, ще мають бути підтверджені на людях. Крім того, бракує даних щодо виділення іонів металу в прилеглі тканини і відповідні потенційні системні наслідки. До того ж нанорозмірні маніпуляції ускладнюються тією обставиною, що на поверхні матеріалу відбувається багато різних хімічних перетворювань, які вкрай важно дослідити на предмет позитивних чи шкідливих впливів на організм [63]. Однак зростання інтересу до нанотехнологій безсумнівне, і найближчим часом очікується публікація великої кількості досліджень. Поточні розробки дають підстави вважати, що виробники зубних імплантатів інвестують все більше ресурсів, щоб забезпечити пацієнтів найміцнішим та найбільш біологічно сумісним матеріалом для протезування зубів.

ПОДЯКИ

Цю роботу було проведено коштом університету Падуї, Progetto di Ateneo, для BZ.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Література

1. Branemark P.I., Hansson B.O., Adell R., Breine U., Lindstrom J., Hallen O., Ohman A. Osseointegrated titanium implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 1977, 16, 1–132.

2. Albrektsson T., Branemark P.I., Hansson H.A., Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man. Acta Orthop. Scand. 1981, 52, 155–170.

3. Abuhussein H., Pagni G., Rebaudi A., Wang H.L. The effect of thread pattern upon implant osseointegration. Clin. Oral Implants Res. 2010, 21, 129–136.

4. Trisi P., Lazzara R., Rebaudi A., Rao W., Testori T., Porter S.S. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. J. Periodontol. 2003, 74, 945–956.

5. Buser D., Schenk R.K., Steinemann S., Fiorellini J.P., Fox C.H., Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. J. Biomed. Mater. Res. 1991, 25, 889–902.

6. Garcia A.J., Reyes C.D. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. J. Dent. Res. 2005, 84, 407–413.

7. Variola F., Yi J.H., Richer L., Wuest J.D., Rosei F., Nanci A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. Biomaterials 2008, 29, 1285–1298.

8. Le Guehennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent. Mater. 2007, 23, 844–854.

9. Cochran D.L., Schenk R.K., Lussi A., Higginbottom F.L., Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. J. Biomed. Mater. Res. 1998, 40, 1–11.

10. Tomasi C., Bressan E., Corazza B., Mazzoleni S., Stellini E., Lith A. Reliability and reproducibility of linear mandible

stomatol_2_14.indd 67 17.06.2014 12:36:07

measurements with the use of a cone-beam computed tomography and two object inclinations. Dentomaxillofac. Radiol. 2011, 4, 244–250.
11. Mendonca G., Mendonca D.B.S., Aragäo F.J.L., Cooper L.F. Advancing dental implant surface technology. From micron to nanotopography. Biomaterials 2008, 29, 3822–3835.
12. Liu H., Webster T.J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. Biomaterials 2006, 28, 354–369.
13. Whitesides G.M. The "right" size in nanobiotechnology. Nat. Bioteehnol. 2003, 21, 1161–1165.
14. Sniadecki N.J., Desai R.A., Ruiz S.A., Chen C.S. Nanotechnology for cell substrate interactions. Ann. Biomed. Eng. 2006, 34, 59–74.
15. Ferreira L., Karp J.M., Nobre L., Langer R. New Opportunities: The use of nanothechnologies to manipulate and track stem cells. Cell Stem Cell 2008, 3, 136–146.
16. Bauer S., Park J., Faltenbacher J., Berger S., von Der Mark K., Schmuki P. Size selective behavior of mesenchimal stem cells on ZrO_2 and TiO_2 nanotube arrays. Integr. Biol. (Camb.) 2009, 1, 525–532.
17. Cavalcanti-Adam E.A., Volberg T., Micoulet A., Kessler H., Geiger B., Spatz J.P. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. Biophys. J. 2007, 92, 2964–2974.
18. Suchaneka J., Soukupb T., Visekb B., Ivancakovaa R., Kucerovac L., Mokryb J. Dental pulp stem cells and their characterization. Biomed. Pap. Med. Fae. Univ. Palaeky Olomoue Czeeh Repub. 2009, 153, 31-36.
19. Atala A., Lanza R., Thomson J.A., Nerem R.M. Prineiples of Regenerative Medieine, Elsevier: Burlington, MA, USA, 2008, Volume 1448.
20. Macchiarini P., Jungebluth P., Go T., Asnaghi M.A., Rees L.E., Cogan T.A., Dodson A., Martorell J., Bellini S., Parnigotto P.P. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Laneet 2008, 372, 2023–2030.
21. Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Seienee 2009, 324, 1673–1677.
22. Nava M.M., Raimondi M.T., Pietrabissa R. Controlling Self-Renewal and Differentiation of StemCells via Mechanical Cues. J. Biomed. Bioteehnol. 2012, 2012, 797410:1–797410:12.
23. Kulangara, K., Yang, Y., Yang, J., Leong, K.W. Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function. Biomaterials 2012, 33, 4998-5003.
24. Kanchanawong P., Shtengel G., Pasapera A.M., Ramko E.B., Davidson M.W., Hess H.F., Waterman C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. Nature 2010, 468, 580–584.
25. Ballestrem C., Hinz B., Imhof B.A., Wehrle-Haller B. Marching at the front and dragging behind: Differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. J. Cell Biol. 2001, 155, 1319–1332.
26. Rottner K., Hall A., Small J.V. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. Curr. Biol. 1999, 9, 640–648.
27. Galbraith C.G., Yamada K.M., Sheetz M.P. The relationship between force and focal complex development. J. Cell Biol. 2002, 159, 695–705.
28. Riveline D., Zamir E., Balaban N.Q., Schwarz U.S., Ishizaki T., Narumiya S., Kam Z., Geiger B., Bershadsky A.D. Focal contacts as mechanosensors: Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-depependent and ROCK-independent mechanism. J. Cell Biol. 2001, 153, 1175–1186.
29. Lele T.P., Pendse J., Kumar S., Salanga M., Karavitis J., Ingber D.E. Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. J. Cell Physiol. 2006, 207, 187–194.
30. McMurray R.J., Gadegaard N., Tsimbouri P.M., Burgess K.V., McNamara L.E., Tare R., Murawski K., Kingham E., Oreffo R.O., Dalby M.J. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. Nat. Mater. 2011, 10, 637–644.
31. Zhang Y., Khan D., Delling J., Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. Sci. World J. 2012, 2012, 793823.
32. Lee M.H., Kim Y.J., Kim H.J., Park H.D., Kang A.R., Kyung H.M., Sung J.H., Wozney J.M., Kim H.J., Ryoo H.M. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-p1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. J. Biol. Chem. 2003, 278, 34387–34394.
33. Matsubara T., Kida K., Yamaguchi A., Hata K., Ichida F., Meguro H., Aburatani H., Nishimura R., Yoneda T. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. J. Biol. Chem. 2008, 283, 29119–29125.

stomatol_2_14.indd 68 17.06.2014 12:36:08

34. Harada S., Rodan G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature 2003, 423, 349–355.
35. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J. Cell. Biochem. 2006, 99, 1233–1239.
36. Pavlin D., Zadro R., Gluhak-Heinrich J. Temporal pattern of stimulation of osteoblast-associated genes during mechanically-induced osteogenesis in vivo: Early responses of osteocalcin and type I collagen. Connect. Tissue Res. 2001, 42, 135–148.
37. Biggs M.J., Richards R.G., Dalby M.J. Nanotopographical modification: A regulator of cellular function through focal adhesion. Nanomedicine 2010, 6, 619–633.
38. Biggs M.J., Richards R.G., Gadegaard N., McMurray R.J., Affrossman S., Wilkinson C.D., Oreffo R.O., Dalby M.J. Interactions with nanoscale topography: Adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage. J. Biomed. Mater. Res. A 2009, 91, 195–208.
39. Dalby M.J., Macintyre A., Roberts J.N., Yang J., Lee L.C., Tsimbouri P.M., McNamara L.E. Nanoscale titanium surface treatments for marrow progenitor culture. Nanomedicine 2012, 7, 20–21.
40. Dalby M.J., Gadegaard N., Tare R., Andar A., Riehle M.O., Herzyk P., Wilkinson, C.D., Oreffo R.O. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. Nat. Mater. 2007, 6, 997–1003.
41. Wood M.A., Bagnaninchi P., Dalby M.J. The beta integrins and cytoskeletal nanoimprinting. Exp. Cell. Res. 2008, 314, 927–935.
42. Discher D.E., Janmey P., Wang Y.L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science 2005, 310, 1139–1143.
43. Benoit D.S., Schwartz M.P., Durney A.R., Anseth K.S. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. Nat. Mater. 2008, 7, 816–823. Tye, C.E., Rattray, K.R., Warner, K.J., Gordon, J.A., Sodek, J., Hunter, G.K., Goldberg, H.A. Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. J. Biol. Chem. 2003,
278, 7949–7955.
45. Giordano C., Chiesa R., Sandrini E., Cigada A., Giavaresi G., Fini M., Giardino R. Physical and biological characterizations of a novel multiphase anodic spark deposition coating to enhance implant osseointegration. J. Mater. Sei. Mater. Med. 2005, 16, 1221–1229.
46. Anderson J.M., Kushwaha M., Tambralli A., Bellis S.L., Camata R.P., Jun H.W. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells directed by extracellular matrix-mimicking ligands in a biomimetic self-assembled peptide amphiphile nanomatrix. Biomaeromoleeules. 2009, 10, 2935–2944.
47. Even-Ram S., Artym V., Yamada K.M. Matrix control of stem cell fate. Cell 2006, 126, 645–647.
48. Variola F., Brunski J.B., Orsini G., Tambasco de Oliveira P., Wazen R., Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: State-of-the art and perspectives. Nanoseale 2011, 3, 335–353.
49. Yao C., Slamovich E.B., Webster T.J. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. J. Biomed. Mater. Res. A 2008, 85, 157–166.
50. Von Wilmowsky C., Bauer S., Lutz R., Meisel M., Neukam F.W., Toyoshima T., Schmuki P., Nkenke E., Schlegel K.A. In vivo evaluation of anodic TiO_2 nanotubes: An experimental study in pig. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 2009, 89, 165–171.
51. Nanci A., Wuest J.D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S., McKee M.D. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. J. Biomed. Mat. Res. 1998, 40, 324–335.
52. Vetrone F., Variola F., Tambasco de Oliveira P., Zalzal S.F., Yi J.H., Sam J., Bombonato-Prado K.F., Sarkissian A., Perepichka D.F., Wuest J.D. et al. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. Nano Lett. 2009, 9, 659–665.
53. Grössner-Schreiber B., Herzog M., Hedderich J., Dück A., Hannig M., Griepentrog M. Focal adhesion contact formation by fibroblasts cultured on surface-modified dental implants: An in vitro study. Clin. Oral Implants Res. 2006, 17, 736–745.
54. Reising A., Yao C., Storey D., Webster T.J. Greater osteoblast long-term functions on ionic plasma deposited nanostructured orthopedic implant coatings. J. Biomed. Mater. Res. A 2008, 87, 78–83.
55. Ellingsen J.E., Johansson C.B., Wennerberg A., Holmen A. Improved retention and bone-tolmplant contact with fluoride-modified titanium implants. Int. J. Oral Maxillofae. Implants 2004, 19, 659–666.
56. Abrahamsson I., Albouy J.P., Berglundh T. Healing at fluoride-modified implants placed in wide marginal defects: An

stomatol_2_14.indd 69 17.06.2014 12:36:08

experimental study in dogs. Clin. Oral Implants Res. 2008, 19, 153–159.
57. Stanford C.M., Johnson G.K., Fakhry A., Gratton D., Mellonig J.T., Wanger W. Outcomes of a fluoride modified implant one year after loading in the posterior-maxilla when placed with the osteotome surgical technique. Appl. Osseointegr. Res. 2006, 5, 50–55.
58. Aparicio C., Gil F.J., Fonseca C., Barbosa M., Planell J.A. Corrosion behavior of commercially pure titanium shot blasted with different materials and size of shot particles for dental implant applications. Biomaterials 2003, 24, 263–273.
59. Ivanoff C.J., Hallgren C., Widmark G., Sennerby L., Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO2 blasted and turned titanium microimplants in humans. Clin. Oral Implants Res. 2001, 12, 128–134.
60. Rasmusson L., Kahnberg K.E., Tan A. Effects of implant design and surface on bone regeneration and implant stability: An experimental study in the dog mandible. Clin. Implant Dent. Relat. Res. 2001, 3, 2–8.
61. Buser D., Mericske-Stern R., Dula K., Lang N.P. Clinical experience with one-stage, non-submerged dental implants. Adv. Dent. Res. 1999, 13, 153–161.
62. Masaki C., Schneider G.B., Zaharias R., Seabold D., Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. Clin. Oral Implants Res. 2005, 16, 650–656.
63. Brunette D.M., Chehroudi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. J. Biomeeh. Eng. 1999, 121, 49–57.

stomatol_2_14.indd 70 17.06.2014 12:36:08