

Új módszerek az összeintegráció, a csontregeneráció és az orális lebenyképzés értékelésére

Doktori tézisek

Dr. Farkasdi Sándor

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Laczkóné Dr. Turzó Kinga, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Timár József, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Fábíán Tibor DMD, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

id. Dr. Rakonczay Zoltán, DSc., egyetemi tanár

Dr. Joób-Fancsaly Árpád, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2019

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a hiányzó fogak pótlására az intraosseális implantátumokat alkalmazzák leggyakrabban. Az intraosseális implantátumok klinikai sikere a titán anyag csontszövetbe való integrációs tulajdonságának köszönhető, amelyet osseointegrációnak nevezünk. Ez a fogalom a csontszövet és a titán anyaga között keletkező direkt kapcsolatot jelenti. Az osseointegrációt először PI Branemark írta le, több mint fél évszázaddal ezelőtt. Azóta számos in vitro, in vivo preklinikai és klinikai vizsgálatot végeztek el az osseointegráció mértékének értékelésre. A titán implantátumok körüli új csontképződés két elemből áll: kontakt és távoli oszteogenezisből. Az osseointegráció után a periimplantális csontszövet folyamatosan átépül. Az osseointegráció szintje és az implantátumok stabilitása invazív és nem invazív módszerekkel értékelhető. Az invazivitás ebben a besorolásban azon alapszik, hogy az analízis során a csont-implantátum kapcsolat megszakad vagy megmarad. A nem invazív módszerek közé tartozik a radiológiai elemzés/diagnosztika, rezonancia frekvencia analízis (RFA), „rezgés-csillapítási karakterisztika”, valamint a sebészek személyes érzékelése. Az RFA egy könnyen használható és sztemderden reprodukálható klinikai módszer. Az RFA alkalmazása során meghatározható az implantátumok stabilitása és a terhelhetőség ideje. Az invazív technikák közé tartoznak a kitépési/benyomási tesztek, be-/kitekerési nyomatókmérések, vágási nyomatókellenállás értékelése, nyomatók teszt vagy mikromobilitási vizsgálat és hisztomorfometria. A kitépési teszt a legrelevánsabb biomechanikai értékelést eredményezi az implantátum stabilitásának értékelése során. Ez abból adódik, hogy a fogak és az orális implantátumok fő terhelése függőleges irányból érkezik. Abban az esetben, ha a kitépési értékelés menetnélküli implantátumokon történik, akkor pontosan értékelhetjük az implantátum felületére ható csont-rögzítési szilárdságot. Napjainkban a hisztomorfológiai elemzést tekintik „gold standard” mérési módszernek az implantátum osseointegrációjának preklinikai értékelésére (ISO / TS_22911: 2016). A

preklinikai vizsgálatokban alkalmazott nem invazív és invazív módszerek kombinációja nagyon fontos eredményeket tud biztosítani, amely a későbbiekben a biztonságos alkalmazás alapja lehet. Ennek megfelelően a PhD tanulmányaim során a nem invazív módszerekből az RFA és a mikro-CT radiológiai diagnosztikát választottuk, amelyek a legmodernebb, legmegbízhatóbb értékelési módszerek. Az invazív módszertanból a kitépési tesztet és a hisztomorfometriát alkalmaztuk.

Abban az esetben, ha egy fogatlan területen a rendelkezésre álló csonttérfogat nem elegendő az implantátum elhelyezéséhez, akkor csontregenerációt szükséges elvégezni. Az ilyen keményszöveti hiányt csontdefektusnak (bone defect - BD) nevezzük. Ezen defektusok regenerálására különböző csontaugmentációs technikák léteznek. A legtöbb esetben csontpótló anyagokat használnak. Ezeket az anyagokat származásuk szerint lehet osztályozni. Abban az esetben, ha a csontpótlás során a recipiens és a donor azonos személy, akkor autograftnak nevezzük a csontpótló anyagot. Ha ugyanazon fajtából, vagyis másik emberből származik a csontpótló anyag, akkor azt allograftnak nevezzük. Ha az emberi fajtól eltérő fajtából származik – xenograft; ha laboratóriumi körülmények között állítják elő, akkor szintetikus vagy alloplastikus anyagnak nevezzük. Végül a fent felsorolt csontpótló típusok kombinációi is lehetségesek, akkor kombinált csontpótló anyagról beszélünk. A klinikai fogászati gyakorlatban a csontdefektusok augmentációjának és regenerálásának egyik leggyakoribb sebészeti beavatkozása az irányított csontregenerációs (GBR) eljárás. A regeneráció és a szövetpótlás lehetőségeinek vizsgálata során számos állatmodellt alkalmaznak. A preklinikai kísérlet alapján a vizsgált anyag további klinikai alkalmazhatóságának alátámasztottnak és bizonyítottottnak kell lennie. Sajnos a kísérleti állatmodellek egyike sem kombinálja a minimális állatfelhasználást, az egyszerű reprodukálhatóságot, az emberi állkapocshoz való hasonlóságot (hisztológiailag és anatómiai szempontból), a többszörös és többfajta elemzést az osseointegráció és csontregeneráció értékelésére. Még a jelenlegi

iránymutatás (ISO / TS_22911: 2016) is csak morfológiai, radiográfiai és hisztopatológiai vizsgálatokat vár el, de nem foglalja magában az osseointegráció funkcionális vizsgálatát. Ez a hiányosság nyilvánvalóan jól kidolgozott preklinikai biomechanikai vizsgálatok hiánya miatt alakult ki.

A legtöbb állatmodellt anélkül fejlesztették ki az osseointegráció vizsgálatára, hogy figyelembe vették volna a csont-mikrostruktúra hasonlóságát az emberi állkapocscsont és az állatmodell csontstruktúrája között. 2009-ben Blazsek J. és mtsai először írták le, hogy a farokcsigolyát trabekuláris és körülötte kortikális rétegek alkotják, ily módon hasonló struktúrát mutat az emberi mandibulával, amely a titán implantátumok elhorgonyzására szolgál. Blazsek J. azt is megállapította, hogy a csontvelő parenchymája nincs jelen a farokcsigolyákban, ennél fogva nagyobb hasonlósággal bír az emberi állkapocscsonthoz, mint a patkány hematopoiitikus állománnyal rendelkező combcsontja, ami egy általánosan használt kísérleti milió. Ezen megállapítások alapján Blazsek J. és mtsai egy új kísérleti modellt fejlesztettek ki az új csontképződés, a csontregeneráció, az osseointegráció és a csontátépülés értékelésére a farokcsigolyákban lévő hosszirányban elhelyezett titán implantátumok körül. Ez az ún. „OSSSI” modell, az „OSSeoIntegration” szóból alkotva. A patkány farokcsigolyában létrejött osseointegráció eredeti analízise során csak olyan értékelési eljárásokat alkalmaztak, amelyek nem mutattak nagy érzékenységet. Ezért fontos volt az „OSSSI” modell továbbfejlesztése az osseointegráció mennyiségi és minőségi jellemzése érdekében.

A mandibula hátsó régiójának vertikális gerinc augmentációja (GBR típus) műtéttechnikától nagyban függő, kényes eljárás, amely megfelelő anatómiai és pontos sebészeti ismereteket igényel a komplikációk kockázatának minimalizálása érdekében. A műtét egyik legfontosabb és kihívást jelentő aspektusa a megfelelő lebeny preparálási technika, amely lehetővé teszi a seb passzív zárását, és csökkenti a mély anatómiai tereket érintő posztoperatív szövődmények esélyeit. A jelenlegi lebeny preparálási technikák némelyike

súlyos posztoperatív szövődményeket idézhet elő. Fontos, hogy preklinikai körülmények között értékeljük az orális és parodontális műtétekhez szükséges különböző lebeny preparálási technikákat, a linguális lebeny megnyújtása érdekében, amit a mandibula hátsó régiójának vertikális gerinc augmentációja során alkalmazunk.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Jelen munka *elsődleges célja* az eredeti, korábban *kifejlesztett, patkány farokba* helyezett implantátum csontosodását vizsgáló *modelljének* olyan *továbbfejlesztése*, hogy alkalmassá váljon az *implantátumok összeintegrációjának kvantitatív és kvalitatív monitorozására*, biomechanikai és strukturális értékelések kombinációjával:

1.a: a klinikai használatra kifejlesztett *rezonancia frekvencia analízis adaptálása a patkány farok modellhez* az összeintegráció pontosabb értékelése érdekében,

1.b: egy olyan *implantátum kialakítása*, amely a jövőben *alkalmas a felületi módosítások összeintegrációra* gyakorolt hatásának *vizsgálatára*, kizárva az implantátum makro-dizájn hatását a csont implantátum felületére történő kötődésének erősségére,

1.c: *komplex biomechanikai értékelés kidolgozása* a rezonancia frekvencia analízis és a kitépési erőmérés technikák kombinációjával

1.d: *a biomechanikai vizsgálatok kombinálása a strukturális vizsgálatokkal* annak érdekében, hogy megbízhatóan követhessük az összeintegrációs folyamatot kisélet modellben, amely preklinikai tesztrendszerként alkalmazható,

1.e: a sebészeti beavatkozás és a *posztoperatív gondozás továbbfejlesztése*.

2. Arra is törekedtünk, hogy kísérleti modellt dolgozzunk ki *egyszerre több, a patkány farokcsigolya* hosszanti tengelyére merőleges *csontdefektus*

regenerációjára, valamint *több intraosszeális implantátum egyidejű behelyezésére* és azok *gyógyulásának nyomon követésére*, módosítva ezzel az eredeti patkány farokcsigolya modellt.

3. Végül igyekeztünk *meghatározni* két olyan *különböző lebeny preparálási technika hatékonyságát*, amelyeket az orális és parodontális műtétek során alkalmaznak a mandibula hátulsó régiójában. Ennek érdekében a linguális lebeny mobilitásának mértékét hasonlítottuk össze, friss humán cadaver fej preparátumokon, a mylohyoideus izom „nem leválasztó” és „leválasztó” lebeny preparálási technikáinak alkalmazását követően.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Az eredeti in vivo patkány farokcsigolya modell továbbfejlesztése az oszseointegráció kvantitatív és kvalitatív elemzéséhez

A Blazsek és mtsai (2009) által kifejlesztett eredeti „OSSSI” modell újnak és eredetinek számított, azonban nem tette lehetővé az implantátumok oszseointegrációjának kvantitatív értékelhetőségét. Ezért szükséges volt a modell tovább fejlesztése, a sebészi protokoll, az implantátum kialakítás, a post operatív állatgondozás és a csontintegrációs folyamatok detektálásának finomítása révén.

3.1.1 Új implantátum dizájn fejlesztése, amely alkalmas a felületi módosítások oszseointegrációra gyakorolt hatásainak vizsgálatára

Az RFA mérések kivitelezéséhez egy speciális, direkt kontaktuson alapuló kapcsolatot alakítottunk ki az implantátum és a 62-es típusú SmartPeg (az Osstell eszköz mágneses transzducere) között. Az implantátum méretei a kifejlett hím Wistar patkányok (380 – 500 g) kaudális farokcsigolya csontjának térfogata alapján kerültek meghatározásra. A limitáló tényezők a farokcsigolya hossza (9.8 mm) és szélessége (3.8 mm) voltak. A fenti paramétereknek megfelelően három különböző makró dizájn került kialakításra: teljes menetes,

fél menetes és menet nélküli. Minden esetben az implantátumok cylinder alakúak 1.3 mm-es magátmérővel, és 2.9 mm-es nyaki átmérővel. Az implantátumok teljes hossza 9.5 mm, amelyből 7.5 mm volt felületkezelt, és ez került beültetésre a csontba. A maradék 2 mm (nyaki rész) kilógott a csontból, és nem volt felületkezelt. Az implantátumfej minden esetben azonos módon került kialakításra, hogy a SmartPeg egység tökéletesen kapcsolódhasson bármelyik implantátum típusához.

3.1.2 Rezonancia frekvencia analízisen és kitépési erő mérésen alapuló komplex biomechanikai értékelő rendszer fejlesztése

Egyedi fejlesztésű implantátumaink feji része olyan geometriai kialakítást kapott, mely lehetővé teszi a 62-es típusú SmartPeg direkt rögzítését. Az implantátumfejben egy belső csavarmenetet került alakítottunk ki, így a SmartPeg könnyen becsavarható. A SmartPeg kapcsolat fejlesztéséhez az irodalomban megtalálható stratégiákat alkalmaztuk. A belső menet lehetővé tette, hogy a SmartPeg mellett, egy erre a célra kifejlesztett kampó is becsavarozható legyen. Ez a kitépési tesztek során került hasznosításra.

3.1.2.1 Az egyedileg kifejlesztett SmartPeg – implantátum kapcsolat validálása az RFA alkalmazásával

Az újonnan kialakított kapcsolat validálása gipszbe ágyazott implantátumokkal történt RFA mérések alapján. Az RFA méréseket minden implantátum esetén négy irányból végeztük. Az implantátumokat az amputált patkány farokcsigolyába helyeztük az újonnan kialakított implantátumkapcsolat következő értékeléséhez. Az implantátum ágy kialakításához szükséges fűrési protokoll ex vivo került kialakításra, az élő állatokban történő kísérletek megkezdése előtt. A csontfűrész minden egyes lépése az előre kialakított standard protokoll alapján történt. A műtétek során egy egyedileg fejlesztett sebészi sablon is használatra került. A sablon, úgy pozicionálta a fűrőket, hogy az implantátum ágy mindig a csigolyák közepébe

kerüljön kialakításra, függetlenül az csigolyák átmérőjétől. A sablont a Full-Tech Kft.-vel (Magyarország) együttműködésben fejlesztettük. Az implantátumokat a felületkezelt részig ültettük be a csontba.

3.1.2.2 Az implantátum – kampó kapcsolat értékelése a kitépési tesztek során

A kitépési tesztek értékelése teljes menetes implantátumokkal történt a csigolyában végzett RFA mérések után. A kitépéshez a korábban már leírt speciális kampót használtuk. A kitépés során mért legnagyobb erő egy Instron 5965 (Instron®, Amerikai Egyesült Államok) erőmérő berendezéssel lett rögzítve.

Az RFA és a kitépési tesztek mérési metodikájának hatékony értékelésére alapozva a primer stabilitás a fentiekben említett módszerekkel került értékelésre poliuretán műcsont blokkokban teljes menetes, fél menetes és menet nélküli implantátumokkal.

3.1.2.3 A három implantátum geometria értékelése RFA-val

3.1.2.3.1 Mesterséges csontblokkok

Az *In vitro* implantátum stabilitás méréséhez D1, D2, D3, D4, D5 standard sűrűségű (Misch klasszifikációja alapján) csont blokkokat (Sawbones Kft., Amerikai Egyesült Államok) (modell 1522–05; Pacific Research Laboratories, Vashon Szigetek, Washington állam) alkalmaztunk.

3.1.2.3.2 Implantátum ágy kialakítás és implantálás

Az implantátum ágyakat egymástól megegyező távolságokra alakítottuk ki a műcsont blokkokban. A primer stabilitás eléréséhez a 3 különböző geometriájú implantátum a felszínkezelt részig került behelyezésre a csontblokkokba.

3.1.2.3.3. Implantátum stabilitás mérése RFA alkalmazásával

Az RFA méréseket, az implantátumok műcsont blokkba helyezése után végeztük el. Minden egyes implantátum esetében az RFA méréseket négyszer ismételtük meg négy különböző irányból.

3.1.3 Az összeintegrációs folyamatok megbízható és reprodukálható nyomon követése biomechanikai és strukturális vizsgálatok kombinációjával

Ezekben az in vivo vizsgálatokban a fentiekben ismertetett menet nélküli implantátumok kerültek használatra. A kifejlesztésre került fűrési protokoll lehetővé tette, hogy a menet nélküli implantátum egyszerűen benyomva az implantátum ágyba ott megszoruljon, anélkül, hogy rés keletkezne az implantátum és a csont között. Ennek köszönhetően az implantátum direkt kontaktusban volt a csonttal. Ezt az in vivo modellt, ahol a menet nélküli implantátumok a csigolya hossz tengelyével párhuzamosan kerültek beültetésre „Direkt OSSI” modellnek neveztük el.

3.1.3.1 Kísérleti állatok a „Direkt OSSI” modellhez

Összesen 63 darab hím Wistar patkányt (450 – 550g) használtunk el a kísérletekhez. Etikai engedély szám: PEI/001/2894-11/2014.

Az állatok műtétje és terminálása általános altatás alatt történt. Az altatáshoz nátrium-pentobarbitált (Nembutal, CEVA, Franciaország, 40 mg/ testsúly kilogramm, i.p.) használtunk.

3.1.3.2 Mini-implantátum dizájn

Az in vivo kísérletek során az újonnan tervezett, gyártott, és értékelt menet nélküli, cylinder alakú implantátumok kerültek beültetésre. A menet nélküli implantátumok lehetővé tették, hogy tisztán csak a biológiai integráció kerüljön értékelésre a geometriai tényezők (menet vágó tulajdonságok, menet szám, lyukak) befolyásoló hatásai nélkül. Emellett a menetek elhagyásával sikerült csökkenteni a röntgen diagnosztika során keletkező fém-okozta műtermékek mennyiségét is.

3.1.3.3 A “Direkt OSSI” kísérletes modell műtéti eljárása

A műtéti eljárást a korábban már publikált modell alapján alakítottuk ki, számos, igen fontos módosítással. A farok disztális részének amputálása után a C4-es csigolya exponálódott felületén egy axiális irányú kavítást alakítottunk ki. A kavítás kialakításához a speciálisan erre a célra kifejlesztett és legyártott

fúrókat (dárda, csiga és nyak fúró) (Full-Tech Kft., Magyarország) használtunk. A fúráshoz a korábban említett sebészi sablont alkalmaztuk, amely növelte az ismételhetőséget és standardizálhatóságot. Ezt követte az implantátum behelyezése a kialakított üregbe, majd a lágyszövetek összevarrása az implantátum felett.

3.1.3.4 Postoperatív kezelések

A műtéti eljárásnak megfelelő speciális kezelési protokoll került kialakításra és használatra.

3.1.3.5 A “Direkt OSS1” modell kísérleteihez tartozó mintagyűjtés és minta értékelés

Az állatokat a következőképpen dolgoztuk fel: 21 állat 4 hét után, 21 állat 8 hét után és 7 állat 12 hét után, valamint 14 állat 16 hét után. A minták egy részén biomechanikai (RFA, kitépési teszt) méréseket végeztünk, míg a másik részén strukturális (mikro CT és hisztomorfometria) vizsgálatokat.

3.1.3.5.1 Biomechanikai értékelések

A kétfajta biomechanikai tesztet a termináció napján végeztük el. Először az RFA értékelését hajtottuk végre, majd a kitépési tesztet. 14-14 állatot értékeltünk ki a 4. és 8. héten, míg 7-7 állatot a 12. és 16. posztoperatív héten értékeltünk.

3.1.3.5.1.1 RFA

Először az RFA-méréseket végeztük el. Minden integrálódott implantátum esetében négyszer ismételtük az RFA-t.

3.1.3.5.1.2 Kitépési teszt

A nem invazív RFA értékelése után az axiális extrakciós erő vizsgálatát alkalmaztuk a másodlagos implantátum stabilitás értékelésére. A teszteléséhez („pull-out”) az Instron 5965 erőmérő készüléket (Instron®, USA) használtuk. A kitépési tesztet az ASTM F543 - 17 szerint végeztük, és minden egyes implantátumnál meghatároztuk a kitépési erő csúcs értékeit.

3.1.3.5.2 Strukturális analízis

Huszzonegy mintát ($n = 7$ állat csoportonként) használtunk a strukturális vizsgálatokhoz, azaz a mikro-CT és hisztomorfometriai elemzésekhez. A strukturális elemzés értékelési végpontjai a 4., 8. és 16. héten voltak.

3.1.3.5.2.1 Mikro-CT analízis

3D röntgen adatgyűjtést végeztünk az implantátum stabilitás strukturális alapjainak kimutatására a rekonstruált 3D-s képeken (1172 SkyScan mikro-CT, Bruker, USA). A mikro-CT szkennelés és a szkennelési rekonstrukciós algoritmus protokollját kísérleti körülményeinkhez igazítva terveztük és optimalizáltuk a fémfelület röntgenszórásából adódó fém műtermékek kiküszöbölésére. Az ezek alapján számított érintkezési felszín / szövetfelszín arányokat (i.S/TS) használtuk egy 2D analízisben a csont-implantátum kontakt (BIC) jellemzésére. A csont térfogat meghatározásához a titán implantátum körül 38-voxel ($0,461 \mu\text{m}$) vastagságú, hengeres térfogatot (volume of interest, VOI) választottunk ki. A százalékos csont térfogat érték meghatározásához a csont térfogat / szövet térfogat arányát (BV/TS) számítottuk ki.

3.1.3.5.2.2 Szövettan és hisztomorfometria

A mikro-CT mérések után a mintákat beágyaztuk és előkészítettük a hisztomorfometriai elemzéshez. A hisztomorfometriai analízis során a csont-implantátum kontakt (BIC) felületet fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk.

3.2 Preklinikai modell kidolgozása a többszörös csonthibák regenerációjának és egyidejűleg elhelyezett többszörös implantátum beültetések integrációjának nyomon követésére

A Blazsek és mtsai (2009) által kidolgozott elvek alapján más irányba is továbbfejlesztettük az eredeti „OSSSI” modellt, lehetővé téve a több implantátum egyidejű elhelyezését a farokra merőleges pozícióban, továbbá többszörös csontdefektus kialakítását patkány farokban, francia kollégákkal együttműködésben egy közös Magyar-Francia Tudományos és Technológiai

projekt keretében. Először a patkány farokcsigolyán alapuló kísérleti modell kifejlesztésére összpontosítottunk, amely a csontdefektusok regenerációjának nyomon követése céljából. Ezt a kísérleti kialakítást „BD OSSI” modellnek neveztük el. Másodszor, az eredeti „OSSI” modell módosításával kidolgoztunk egy, a farkra hossz tengelyére merőleges irányú, több implantátum elhelyezésére alkalmas kísérleti elrendezést. Ezt a modellt „Gap OSSI” kísérleti modellnek neveztük el.

3.2.1 Patkány fark csigolyák ex vivo fűrési protokolljának kifejlesztése transzverzális csontdefektusok létrehozása érdekében

A patkány farokcsigolyák csonthatárait figyelembe véve megállapítottuk az implantátum-ágy fűrési protokollját és keresztirányú fűrési helyét. A fűrőfej kiválasztása során a lehető legnagyobb transzverzális csontdefektus létrehozására törekedtünk, amely még reprodukálhatóan lehetővé tette az adott csigolya maradó csontállomány integritásának megőrződését.

3.2.2 „BD OSSI” és „Gap OSSI” modellek kísérleti beállításai

A „BD OSSI” és a „Gap OSSI” kísérleti munkáit a franciaországi Montpellieri Egyetemen végeztük. A „BD OSSI” kísérleti modellel a patkány farokcsigolyák csontos szerkezetében létrehozott csontdefektusok öngyógyító képességeinek értékelését helyeztük fókuszba. A „Gap OSSI” modell kifejlesztésével a fark tengelyére keresztirányban elhelyezett implantátumok osseointegrációs folyamatának értékelését kívántuk elvégezni. Mindkét kísérleti rendszerben hím Wistar patkányokat használtunk (380–450 gramm súlyú állatokat) a „BD OSSI” modell értékelésére, majd a „Gap OSSI” modellhez ugyanúgy (a Montpellieri Egyetem etikai engedélyével, referenciaszám 1083 16/06/2014).

3.2.2.1 A „BD OSSI” modell kísérleti beállítása

Ebben a kísérleti modellben az állatokat két csoportra osztottuk a csontdefektus létrehozása utáni gyógyulási idő alapján. Az első csoportban a

gyógyulást 4 hét múlva értékeltük, a második csoportban 8 hét után végeztük el a kiértékelést. Három patkányt használtunk csoportonként. Mindegyik állat esetében négy transzverzális defektust alakítottunk ki a C2-C5 farok csigolyákban. Mindkét csoportban véletlenszerűen két csigolyát hagytunk üresen a csontdefektus létrehozása után. A két másik csontdefektus a két másik csigolyában xenograftal lett feltöltve a graft beépülésének értékeléséhez. Mikro-CT-s kiértékelést használtunk az önmegújító képesség és a graft stabilitásának értékelésére a csontdefektusokban.

3.2.2.2 A „Gap OSSI” modell kísérleti beállítása

Három patkányt használtunk a többszörös, transzverzálisan elhelyezett implantátum összeintegrációs értékelésére patkány farokcsigolyákban. Mindegyik kiválasztott caudalis csigolyába (a C2-től C5-ig) az egyedileg tervezett titán implantátumokat nyomással helyeztük a csontágyba. Az implantátumok alakját úgy terveztük, hogy lehetővé tegye a „távoli oszteogenezist” (új csontnövekedés az implantátumágy csontos falától az implantátum teste felé). Az implantátumtest körüli részen az implantátum és a csont közötti rést üresen hagytuk. A szövettani és mikro-CT-s módszereket használtuk a titán implantátumok körüli „távoli oszteogenezis” értékelésére 12 hetes gyógyulás után.

3.3 Linguális lebenyek nyújtásához használt két különböző lebeny preparálási technika hatékonyságának összehasonlító értékelése friss human cadaver fejeken

Ezt a vizsgálat a Bécsi Orvostudományi Egyetem Anatómiai Intézetében történt az etikai engedélynek megfelelően. A vizsgálatához 12 olyan friss humán cadaver fej került felhasználásra, amelyek esetében mindkét oldalon hiányoztak a hátsó fogak, és hasonló mértékű alveoláris gerinc reszorpciót mutattak. A tanulmány során véletlenszerűen lett kiválasztva, hogy a mandibulák egyes oldalain melyik technika legyen alkalmazva. A műtéti

beavatkozások ugyanolyan feltételek mellett és ugyanazon operáló és asszisztáló személyek (Dr. Urbán István mint operáló orvos valamint, ezen tézis PhD hallgatója mint asszisztens) által lettek elvégezve.

3.3.1 Lebeny preparálási technikák

A kontrollként használt technika során a lebeny nyújtás a m. mylohyoideus leválasztásával történt. A teszt oldalon egy m. mylohyoideus rezerváló (az izom leválasztásával nem járó) technika volt alkalmazva. Ez a technika 3 kulcsfontosságú anatómiai zónában jár preparációval. Az I-es zónában történik a trigonum retromolare felemelése “tunneling” technikával. A II-es zónában kerül sor a lebeny leválasztására a m. mylohyoideus rezervációjával. A III -as, anterior zónában történik a lebenyen lévő csontthártya nyújtása.

3.3.2 Eredmények értékelése

A vertikális irányú nyújthatóság mértékét mindkét oldalon az I, II és III zónákban mértük az alveoláris gerinctől a linguális lebeny széléig.

A mérés során a linguális lebeny a maximális passzív nyújthatóságáig feszítettük ki egy nagy pontosságú erőmérő berendezéssel, amely egy ércsipesszel kapcsolódott a lebenyhez. A nyújtás iránya vertikális volt, merőlegesen a szájfénékre.

3.4 Az in vitro és in vivo értékelések statisztikai elemzése

Minden vizsgálatban az adatokat átlag \pm SEM (az átlagban standard hibája) formában adtuk meg. Mindegyik statisztikai kiértékelést a Statistica 12 szoftverrel (TIBCO Software Inc., USA) végeztük a megfelelő statisztikai próba kiválasztásával.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az összeintegráció kvantitatív, kvalitatív monitorozása a „Direct OSSI” modell alkalmazásával az eredeti in vivo patkány farok implantátum modell finomítására

4.1.1 Egyedi kialakítású implantátumok validációs mérései, amelyek alkalmasak a különböző felületmódosítások osseointegrációra való hatásainak vizsgálatára a patkány farok modellben

Az elsődleges validációs mérések a SmartPeg és a teljes menetes implantátumok közé tervezett újonnan kialakított kapcsolattal sikeresek voltak. 20 gipszágyba rögzített implantátum RFA mérésének eredménye $58,82 \pm 1,59$ ISQ volt. Ez a megfigyelés igazolta az újonnan kifejlesztett kapcsolat alkalmazhatóságát a 62-es típusú SmartPeg és a testreszabott implantátum között.

4.1.2 Komplex biomechanikai kiértékelés kifejlesztése a rezonanciafrekvencia-analízis és kitépési erőmérési technika kombinációjával

Az egyedileg tervezett implantátumok ex vivo csigolyákban végzett RFA és kitépési erő mérései szintén sikeresek voltak. Az 5 teljes menetes implantátum átlagos RFA primer stabilitása csigolyákban ex vivo $33,81 \pm 4,17$ ISQ volt. A patkánycsigolyába beültetett implantátumok csontágyból történő eltávolításához szükséges átlagos kitépési erő $89,60 \pm 6,05$ N volt, és egyöntetű, megismételhető eredményeket mutatott.

A menet-nélküli implantátumok ISQ-értékei szignifikáns különbségeket mutattak, a kétfajta menetes típusú implantátumhoz viszonyítva az különböző PUF-denzitások tekintetében. Ki kell emelni, hogy a menet-nélküli implantátumok ISQ-értékei fokozatos és folyamatos lineáris csökkenést mutattak a csontdenzitás csökkenésével. Ez a tulajdonság nem volt jellemző a teljes-menetes és fél-menetes implantátumokra. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a menet-nélküli implantátumok a legmegfelelőbbek az implantátum körüli környezeti különbségek értékelésére, mint amilyen például a befogadó szövet denzitása, és potenciálisan az osseointegráció foka.

4.1.3 Az összeintegráció komplex monitorozása biomechanikai és strukturális vizsgálatokkal; a továbbfejlesztett sebészi körülmények és posztoperatív gondozás értékelése

4.1.3.1 Az implantátum összeintegráció biomechanikai értékelése

A patkány farok modellben az **ISQ-értékek** mérsékelt változását tapasztaltuk a kezdeti gyógyulási időszak alatt. Az ISQ-értékek szignifikáns növekedése (1,6-szoros) történt a 4. héttől ($32,84 \pm 8,86$ ISQ) a 16. hétig ($58,58 \pm 1,32$ ISQ). Azonban nem volt szignifikáns különbség a 4. hetes ($32,84 \pm 8,86$ ISQ), a 8. hetes ($34,67 \pm 2,08$ ISQ) és a 12. hetes ($32,2 \pm 2,08$ ISQ) gyógyulási időknek megfelelő értékek között. A **kitépési erő** (pull-out force) az idővel jelentősen nőtt, míg a műtét utáni 12. héten elért egy plató fázist. A kitépési erő teszt nagy érzékenységét demonstrálja a tény, hogy ennek az erőnek a mértéke körülbelül 500%-kal nőtt a 4. és a 12. hét között. Ebben a paraméterben nem volt további szignifikáns változás a 12. és a 16. hét között. Az adott ISQ-értékek és a hozzájuk tartozó kitépési erők között csak gyenge korrelációs kapcsolatot lehetett kimutatni ($r=0,203$). Ez elsősorban a rezonancia frekvencia analízis viszonylag alacsony érzékenységének köszönhető a kitépési teszttel szemben.

4.1.3.2 Az összeintegráció strukturális értékelése

A mikro-CT vizsgálat 2D elemzésének eredményei azt mutatták, hogy az **i.S/TS** értékek $52 \pm 5,78\%$, $47 \pm 4,62\%$ és $61 \pm 4,49\%$ voltak a 4., 8. és 16. héten. A statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) a 8. és a 16. hét között volt tudunk megfigyelni. A 3D értékelésben a **BV/TV** értékek $58 \pm 6,64\%$, $56 \pm 4,48\%$ és $61 \pm 4,93\%$ értékeknek bizonyultak a 4., 8. és 16. héten. A BV/TV eredményekben nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között. Pozitív korrelációt találtunk a csont mikromorfometriás eredményekre vonatkozóan a BV/TV és az i.S/TS adatok között ($r=0,544$). Ez a korreláció azt mutatja, hogy összefüggés mutathat ki a csont-implantátum érintkezési felszín és a csont térfogat/szövet térfogat értékek között az egyes mintákban. A 4. héten alacsony szintű csont-implantátum kapcsolat (BIC) volt kimutatható, ami $29 \pm 3,54\%$ -os csont-implantátum érintkezési felszín

lefedettségnek felel meg a hisztomorfometriás elemzés szerint. A 4. héthez ($62\pm 3,31\%$) képest a BIC értékek szignifikánsan növekedtek a 8. hétre ($p < 0,05$). A 16. hétre a BIC értékek további szignifikáns emelkedést ($74\pm 2,12\%$ -ra) mutattak ($p < 0,05$ vs. 8. hét). Az implantátum körüli csont rendszerint trabekuláris struktúrájú volt. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a BIC mérésekkel specifikusan tudjuk értékelni az összeintegráció előrehaladását a 16 hetes kísérleti időszak alatt.

A BV/TV és a hisztomorfometriás BIC eredmények között nem volt korreláció ($r = 0,014$). Azonban az i.S/TS és a BIC értékei között egy nagyon gyenge, de pozitív korrelációt mutattunk ki ($r = 0,096$).

4.2 Több csontdefektus egyidejű regenerációjának követésére („BD OSSI”) és szimultán beültetett implantátumok összeintegrációjának („Gap OSSI”) vizsgálatára kifejlesztett kísérleti modellek eredményei

Megállapítottuk, hogy a transzverzális defektus maximális mérete $2,9 \times 3$ mm lehet. Ezt a csigolya transzverzális fűrési protokolljának in vitro kifejlesztése során alapítottuk meg. Ezt a defektus méretet azután a „BD OSSI” és a „Gap OSSI” modellekben eredményesen reprodukáltuk. Két új sebészeti eljárást sikerült létrehozunk; az egyiket a patkány farok többszörös transzverzális csontdefektusainak regenerációjának elemzésére („BD OSSI”), a másikat pedig egyszerre több implantátum behelyezésére patkány farkcsigolyájukba („Gap OSSI”).

A „BD OSSI” modell értékelésére használt mikro-CT analízis során kapott morfológiai eredmények nem mutattak csontképződést a 4. vagy 8. hét után az üresen hagyott defektusok ($2,9 \times 3$ mm) esetében. Amikor azonban a kavítás kitöltéséhez xenograft csontpótló-anyagot használtunk, 4 és 8 hét elteltével a defektusban feltöltött terület stabilnak minősült.

A „Gap OSSI” modell mikro-CT és szövettani eredményei 12 héttel az implantáció után az implantátum stabil pozícióját mutatták a csigolyában. Az implantátum speciális, keskenyedő alakja és a szélesebb implantátumágy-

kialakításnak köszönhetően ki tudunk képezni a csontfal és az implantátum apikális része között egy üreget, ahol a „távoli oszteogenezis” sikeresen végbement.

4.3 A posterior mandibula régiójában történő szájsebészeti és parodontális lebeny mobilitásának ex vivo értékelése a mylohyoid izom „nem leválasztó” és „leválasztó” technikák alkalmazása során

A mérési eredmények közül csak az egyik preparátumon mért értékeket nem tudtuk bevonni az elemzésbe, mivel abban az esetben (3. preparátum) a lebenyképzés során a linguális szövet megsérült az egyik oldalon. Ezért ennek a mintának az adatát kizártuk az elemzésekből, így végül 11 preparátumon (22 terület a két oldalon, azaz 11 teszt és 11 kontroll) mért adatot elemeztünk.

Minden mérési eredmény normalitási teszten (Shapiro-Wilk) esett át ($p > 0,05$). A két műtéttechnika alkalmazása során az I. zónában (retromoláris régió), II. zónában (középső terület) és a III. zónában (premoláris régió) mért értékek között következő különbségeket tudtunk kimutatni, $8,3 \pm 0,54$ mm, $10,1 \pm 0,89$ mm és $10,3 \pm 0,89$ mm, amelyek szignifikáns különbségeknek bizonyultak ($p < 0,0001$). A mylohyoideus izom „leválasztó” kontroll technikához viszonyítva a „nem leválasztó” teszt technika 8,2, 2,5 és 5,3-szor nagyobb lebenynyújtási eredményeket biztosított az I., II., illetve III. zónákban.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Jelen munkánkban *sikeresen adaptáltuk* az eredendően humán alkalmazásra kifejlesztett, *rezonancia frekvencia analízis* elven működő implantátum stabilitást vizsgáló módszert, *patkány farok modellünkre*. Ehhez egy speciális implantátum kapcsolatot terveztünk az implantátum fej kialakítása során, amely lehetővé tette a transzduktor elem (SmartPeg) becsavarását a rezonancia frekvencia analízis elvégzéséhez. A kialakított csatlakozáshoz terveztünk egy speciális horgot is a kitépési teszt elvégzéséhez.

2. Az újonnan létrehozott csatlakozással **három implantátum-típust** (teljes- és félmenetes, ill. menetnélküli) **fejlesztettünk ki**, amelyek alkalmasak az **osszeintegrációs vizsgálatokhoz patkány farokcsigolyákba** longitudinálisan beültetve. Az implantátum típusok tesztelése során a **menetnélküli kialakítású implantátumokat választottuk** a további vizsgálatokhoz, mert ez az alak-képzés bizonyult a legérzékenyebbnek a befogadó szövetek sűrűségbeli különbségeinek kimutatására in vitro. Így kiküszöböltük a csavarmentek befolyását a implantátumok csontkötődésére. A menetnélküli implantátum kialakítás volt a **legmegfelelőbb az implantátumok vertikális irányú biomechanikai stabilitásának értékelésére** kitépési teszttel.

3. Létrehoztuk a csigolyák csontállományának **standard fűrési protokollját**. Erre a célra egy speciálisan tervezett **sebészeti sablont alkalmaztunk**, amelynek segítségével az implantátum ágy kialakítása mindig a csigolya hosszirányú középvonala köré történt. Emellett sikeresen javítottuk a sebészeti beavatkozás technikáját és az implantációt követő gondozást.

4. Egy **komplex biomechanikai értékelési rendszert dolgoztunk ki** a patkány farokcsigolyákba **beültetett implantátumok stabilitásainak értékelésére** a rezonancia frekvencia analízis és a kitépési technika kombinációjával. Titán implantátumokkal ellátott patkány farokcsigolyákon sikeresen **nem dekalcifikált szövet-preparátumokat készítettünk**. Ezen kívül megterveztünk és optimalizáltunk egy protokollt az implantált farokcsigolya mikro-CT szkenneléshez és a képrekonstrukcióhoz, amellyel kiküszöbölhetjük a röntgensugarak fémfelületen történő szóródásból adódó problémákat. Ezt az implantátum geometriai összetettségének minimalizálásával tudtuk elérni, amit a menetek eltávolítása eredményezett.

5. Módszertani fejlesztéseink a biomechanikai értékelések és a strukturális vizsgálatok eredményes kombinációjához vezettek, amelyekkel **megbízhatóan és multidiszciplinárisan követhetjük az osszeintegrációs folyamatot patkány farokcsigolyában in vivo**. Ezt a kísérleti protokollt „Direct OSSI” modellnek neveztük el. Ez a modell alkalmas különböző intraosszeális implantátumok

összeintegrációjának kvantitatív preklinikai értékelésére különböző felületkezelések után, továbbá különböző lokális és szisztémás körülmények között is.

6. Új fűrési protokollt hoztunk létre **többszörös csontdefektusok kialakítására** és **többszörös implantátum-elhelyezésre patkány farokcsigolyákban** transzverzálisan.

7. A patkány farokban transzverzálisan létrehozott **csontdefektusok nem mutattak öngyógyulást** az általunk választott kísérleti körülmények között, kivéve ha csontpótló anyagot alkalmaztunk. Ezt a kísérleti elrendezést „BD OSSI” modellnek neveztük el. Emellett az eredeti „OSSI” modell sikeres módosításával, **egyszerre több implantátum behelyezését** értük el a patkány farokban merőlegesen irányban. Ezt a modellt „Gap OSSI”-nak neveztük el.

8. Elsőként sikerült meghatároznunk standardizált preklinikai körülmények között, **két linguális lebeny preparálási technikának** a nem leválasztó” és „leválasztó” technikáknak a **hatékonyságát**, amelyeket orális és parodontális műtétek során alkalmaznak a mandibula hátulsó régiójában a linguális lebeny mobilitásának növelésére. Megfigyeltük, hogy a posterior mandibulában **a mylohyoideus izom „nem leválasztó” preparálási eredménye felülmúlja az mylohyoideus izom „leválasztó” technikát**. Így a mylohyoideus izom „nem leválasztó” technika szignifikánsan megnövelte a linguális lebeny mobilitását.

**6. A PHD DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ SAJÁT
PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA**

1. **Farkasdi S**, Pammer D, Rácz R, Hriczó-Koperdák G, Szabó BT, Dobó-Nagy Cs, Kerémi B, Blazsek J, Cuisinier F, Wu G, Varga G „*Development of a quantitative preclinical screening model for implant osseointegration in rat tail vertebra*”, Clin Oral Investig. 2018 Oct 29. doi: 10.1007/s00784-018-2661-1. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30374828.

IF=2.386

2. Urban I, Traxler H, Romero-Bustillos M, **Farkasdi S**, Bartee B, Baksa G, Avila-Ortiz G. „*Effectiveness of Two Different Lingual Flap Advancing Techniques for Vertical Bone Augmentation in the Posterior Mandible: A Comparative, Split-Mouth Cadaver Study.*” Int J Periodontics Restorative Dent. 2018 Jan/Feb;38(1):35-40. doi: 10.11607/prd.3227. PubMed PMID: 29240202.

IF=1.249

3. Renaud M, **Farkasdi S**, Pons C, Panayotov I, Collart-Dutilleul PY, Taillades H, Desoutter A, Bousquet P, Varga G, Cuisinier F, Yachouh J. “*New Rat Model for Translational Research in Bone Regeneration.*” Tissue Eng Part C Methods. 2015 Dec 31. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26472155.

IF=3.485