Doktori (PhD) értekezés tézise

Fogászatban potenciálisan alkalmazható új szintetikus csontpótló anyagok vizsgálata

Dr. Hegedűs Viktória

Témavezető: Dr. Dezső Balázs PhD



DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2022.

Fogászatban potenciálisan alkalmazható új szintetikus csontpótló anyagok vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Fogorvostudomány tudományágban.

Írta: Dr. Hegedűs Viktória okleveles fogorvos

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi doktori iskolája keretében.

Témavezető: Dr. Dezső Balázs PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Nánási Péter Pál MTA doktora

tagok: Dr. Daróczi Lajos PhD

Dr. Marada Gyula PhD

A doktori szigorlat helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet tanterme, 2022. 12. 16., 10 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Dobó-Nagy Csaba PhD

A bírálóbizottság:

- elnök: Dr. Nánási Péter Pál MTA doktora
- tagok: Dr. Matesz Klára MTA doktora
 - Dr. Dobó-Nagy Csaba PhD
 - Dr. Daróczi Lajos PhD
 - Dr. Marada Gyula PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet tanterme, 2022. 12. 16., 12 óra

Tartalom

| | 1 |
|---|----|
| 1.Bevezetés | 5 |
| 2.Célkitűzés | 6 |
| 3. Anyag és módszer | 7 |
| 3.1.1. Aerogél előállítás | 7 |
| 3.1.2. In vitro vizsgálatok | 8 |
| 3.1.2.1. Életképesség és citotoxicitás | 8 |
| 3.1.2.2. Alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitásának vizsgálata | 8 |
| 3.1.2.3. Génexpresszió | 9 |
| 3.1.3. In vivo vizsgálatok | 9 |
| 3.1.4. Hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok | 9 |
| 3.2.1. Próbatestek és minták előkészítése | |
| 3.2.2. Alkalmazott adhezívek és gyanta mátrix bemutatása | |
| 3.2.3. Minták, próbatestek készítése | |
| 3.2.4. Zéta potenciál mérés | 11 |
| 3.2.5. XPS mérés | 11 |
| 3.2.6. Kontakt szög mérés | |
| 3.2.7. Nyírószilárdság meghatározása | |
| 3.2.8.Törési módok detektálása | |
| 4.Eredmények | 13 |
| 4.1.1. Szilika aerogél anyagtani jellemzői és porozitása | 13 |
| 4.1.2. Aerogélek citotoxicitása SAOS-2 sejtek életképességére | |
| 4.1.3. Alkalikus foszfatáz aktivitás | 13 |
| 4.1.4. Génexpresszió | 14 |
| 4.1.5. Hisztopatológiai analízis | 14 |
| 4.2.1. Az üvegfelszín optimális savazási ideje | 14 |
| 4.2.2. Zéta potenciál mérés eredményei | 14 |
| 4.2.3. XPS mérés eredményei | 15 |
| 4.2.4. Kontakt szög | 15 |
| 4.2.5. Nyírószilárdság | 15 |
| 4.2.6. Törési módok detektálása | 16 |
| 5. Megbeszélés, fontosabb eredmények és következtetések | 16 |

| 6.Összefoglalás | |
|---------------------|----|
| Irodalomjegyzék | |
| Tárgyszavak | 27 |
| Köszönetnyilvánítás | 27 |

1. Bevezetés

Az orvostudományban már Krisztus előtti időkből maradtak ránk olyan leletek, leírások, amelyekben a csont gyógyításával, illetve csontpótlással próbálkoztak. A tudományágak fejlődésével ezen próbálkozások egyre sikeresebbé váltak idővel, és az általános orvostudomány mellet a csontpótlásnak és csontgyógyulásnak ma már a fogászatban is fontos szerepe van. Törések, nagyméretű ciszták vagy tumorok esetében, implantációs munkák során vagy fogszabályozó kezelések alkalmával a jelenleg elérhető piaci termékek nagymértékben hozzájárulhatnak a sikeres kezeléshez, mihamarabbi regenerációhoz.

A csontpótló anyagoknak hat csoportját különböztethetjük meg. Autograft (azonos egyén), izograft (genetikailag megegyező), allograft (azonos faj), xenograft (más faj), alloplaszt (szintetikus). Ez utóbbi csoport területén a mai napig számos kutatás folyik, hogy egy ideális csontpótló anyag jöhessen létre. Ennek az anyagnak a szerkezeti (porozitás, pórus méret, pórusok közötti átjárhatóság, mechanikai tulajdonságok) és biológiai (osszeokonduktivitás, osszeoinduktivitás) jellemzői mellett a sejteknek (őssejtek, csontvelő sejtek, oszteoblasztok, fibroblasztok, kondrociták), és jelközvetítő molekuláknak (azaz citokineknek, növekedési faktoroknak és más molekuláknak) van kiemelt szerepe a csontpótlás sikerességében (1-4). Korábbi kutatásaink során kifejlesztett aerogélek ezen leírásnak megfelelően ideális vázat jelenthetnek.

1931-ben alkotta meg egy amerikai vegyészmérnök S.S. Kistler az első aerogélt, melynek specifikusságát az adta, hogy nedves gélt szárított ki (5). Ez a mezporózus szerkezetű, légiesen könnyed, nagyon jó hőszigetelő anyag eleinte nem volt túl népszerű, kedvezőtlen mechanikai adottsága, illetve nedvességre való érzékenysége miatt. További szerves funkcionális csoportokkal való kiegészítésük után sikerült ezen hátrányos tulajdonságain javítani az anyagnak, ezzel javítva felhasználhatóságuknak körképét (6-13).

Az aerogél vázat β -TCP szemcsékkel egészítettük ki. Mivel kalcium foszfát jelenlétét a csontban már 1769-ben felfedezték, így hamar a csontpótlás, csontgyógyulás fókuszába került, a szintetikus formáival már az 1900 évek óta találkozhatunk (14-17). A kalcium foszfát tartalmú anyagoknak három nagy csoportja a hidroxiapatit, trikalcium foszfát, és ezen anyagok kombinációja (3). A β -TCP egy fehér, törékeny, szilárd anyag, mely kalcium foszfát vagy hidroxiapaptit termikus kezelésének eredményeképpen jön létre. Három biológiai tulajdonsága teszi különlegessé. Osszeindukciós képessége, mely során pluripotens, éretlen sejtek preoszteoblasztokká differeciálódva oszteogenezist indukálnak. Osszeokondukciós képessége, mely alkalmassá teszi a csontnövekedést az anyag felszínén. A harmadik pedig az úgynevezett sejt-közvetített rezorpció, mely során a fiziológiás körülmények között oldhatatlan β -TCP felszívódik, vagyis rezorbeálódik egy makrofágokat és többmagvú óriássejteket (multinucleoted giant cells, MNGCs) tartalmazó sejt-közvetített folyamatban. Ezen biológiai tulajdonságok eredőjeként a graft képes lesz átalakulni trabekuláris struktúrává, mely végső folyamatában a "felesleges" β -TCP anyagot a sejtek végleg eliminálják és csak az átalakult struktúra marad (3, 18-34).

Ahhoz, hogy az osszeointegrációt, osszeogenezist, a csontgyógyulás folyamatát vizsgálni lehessen az in vivo kutatásoknak kiemelt jelentősége van. Azonban a hagyományos úton készült szövettani metszeteknél a dekalcifikált mintákat a parafinnba ágyazást követően egy hagyományos mikrotommal metszik a megfelelő rétegvastagságra. Ezen eljárási módszer hátárnya, hogy az olyan esetekben, amikor implantátum, vagy keményebb csontpótló anyag vizsgálata lenne szükséges, mechanikai tulajdonságuk miatt ezeket a hagyományos mikrotóm nem képes szeletelni. Ezt a problémát előként K. Donath oldotta meg egy speciális keményszövet mikrotóm használatával, illetve a dekalcinálás nélküli vékonycsiszolatok metodikájának bevezetésével (35). A keményszövet mikrotóm által szeletelt minták további csiszolást igényelnek, hogy megfelelő rétegvastagságúak legyenek. Ám a csiszolás folyamata közben a mechanikai erők miatt gyakran a minta egy darabjának vagy teljes egészének leválása figyelhető meg. Ezen probléma kiküszöbölésére a fogászatban alkalmazott 10metakriloil-oxidecil-dihidrogén foszfát (10- MDP, vagy röviden MDP) tartalmú adhezív anyagot használtuk. Ez a monomer képes az apatit és a dentin mellett képes a fémhez vagy cirkóniumhoz is kötődni, vagyis az általunk használt szeletelt minták minden eleméhez (36-38). A keményszövet csiszolat készítés egy több lépcsős folyamat, mely során a megfelelő rétegvastagság elérésében a megfelelő rögzítésnek kiemelt jelentősége van.

2. Célkitűzés

Bevezetés fejezetben leírt csontpótló anyagokra vonatkozó irodalmi adatok alapján jelen PhD tézisben bemutatott kísérleteinkkel az alábbi célkitűzéseket kívántuk megvalósítani:

1. Csontpótlásra alkalmas mezoporózus szilika aerogel (AE) és béta-trikalciumfoszfát tartalmú szilika aerogél (β-TCP-AE) laboratóriumi körülmények között történő előállítása és azok fiziko-kémiai karakterizálása, *in vitro* biológiai rendszerben történő viselkedése, különös tekintettel az éretlen oszteogén eredetű (SAOS-2) sejtvonalon mutatott oszteoblasztos differenciációra és citotoxicitásra.

2. Az előállított AE és β-TCP-AE anyagok csont-lézióban mutatott *in vivo* reparatív hatásainak összehasonlító vizsgálata patkány koponyacsont-defektus ("calvaria critical size") modell alkalmazásával, különös tekintettel a mikroszkópos vizsgálattal követhető re-osszifikáció folyamatára.

A fenti (2. pontban leírt) *in vivo* csontdefektus vizsgálatok szövettani kiértékeléséhez eredetileg nemcsak formalin-fixált és paraffinba ágyazott dekalcinált (a rutin diagnosztikus hisztopatológiai gyakorlatban megszokott) szövetmintákat, hanem (ezzel párhuzamosan) natív (nem dekalcinált) specimenek hagyományos mikrotómmal nem metszhető kemény csontszövetből készült csiszolatait is használni kívántuk, hogy a csontpótló anyagok által indukált intralézionális mésztartalom valós mennyiségét is megítélni tudjuk, a csontpótló anyagok hatására. Ez a módszer csak részben hozott sikert számunkra (nem volt reprodukálható): több esetben a felragasztott csiszolat-metszet levált az üveglemezről, így minden mintából nem készült ilyen preparátum (emiatt ennek eredményét nem is közöltük a PhD tézis alapjául szolgáló első közleményben). E technikai probléma megoldása inspirálta a következő célkitűzésünket (ami a PhD tézis alapjául szolgáló második közleményben olvasható), mely az alábbiakban foglalható össze:

3. Titan implantátumot és hagyományos mikrotómmal nem metszhető kemény anyagokat tartalmazó minták csiszolat készítése új módszerének kidolgozása, különös tekintettel a metszet rögzítését segítő felület kialakítására és kemo-mechanikai kötődését segítő adhezív rendszer optimalizálására vonatkozólag.

6

3. Anyag és módszer

3.1.1. Aerogél előállítás

Az aerogél előállítása során elsőként metanolt, desztillált vizet, higított ammónia és urea oldatot tartalmazó folyadék lett előállítva, melynek neve "A" minta. A "B" nevű minta tetrametoxi-szilánt, β-TCP -t és cellulózt tartalmazott az "A" minta összetevői mellett. Minden komponens aktív keverés mellett lett elegyítve, míg egy viszkózus, de még nem gél halmazállapotot ért el. Ekkor egy cilindrikus műanyag formába öntve (66 x 28 mm), szobahőmérsékleten állva hagyva alakult át gél halmazállapotú anyaggá, alkogéllé egy éjszaka után. Ezután a metanolt több lépésben az acetonra váltva végül az alkogél egy bőséges tiszta acetonban volt 3 napig, amit a szuperkritikus szárítás követett. Az aerogél kompozit monolitok kályhában lettek kalcifikálva, hogy megőrizzék mechanikai egy ellenállóképességüket. Kiégetést követően a minták súlyának, formájának és denzitásának adatai rögzítésre kerültek.

3.1.2. In vitro vizsgálatok

A SAOS-2 differenciálatlan oszteoszarkoma sejteket (ATCC, USA) szarvasmarha szérumot, antibiotikum-gombaellenes oldatot és Glutamatot tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ban (DMEM, Sigma, USA.) tenyésztettük 37 0 C fokon. A konfluencia elérése után a sejteket tripszineztük, majd sejttenyésztő lemezekre szélesztettük (Nunc, Dánia). A sejtek letapadása után a sejttenyésztő folyadékot (CM) friss tápfolyadékra cseréltük, amely őrölt aerogélt (AE) vagy β -TCP tartalmú aerogélt (β -TCP-AE) tartalmazott. Az AE és β -TCP-AE részecskék lesüllyedve közvetlen kapcsolatot alakítottak ki a sejtekkel. A továbbiakban a tápfolyadékot két naponta frissre cseréltük, a mintavételt a vizsgálat hetedik napján végeztük.

3.1.2.1. Életképesség és citotoxicitás

A sejtek életképességének és az anyag citotoxicitásának vizsgálatát alamarBlue Cell Viability Reagent-tel (Invitrogen, USA) végeztük. Röviden leírva, a tenyésztő médiumban tízszeresére higított alamarBlue reagenst mértünk a sejtekre, majd 2 órán át 37 ⁰C fokon inkubáltuk. Az inkubálás után 200-200 µl minta fluoreszcenciáját mértük Hidex Sense microplate olvasó segítségével (Hidex, Finnország).

3.1.2.2. Alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitásának vizsgálata

A sejteket PBS-el mostuk, majd lízis pufferben lizáltuk. A lizátumokról tíz percen át tartó centrifugálással távolítottuk el a sejttörmeléket (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Németország). A felülúszót egy másik mikrocentrifuga csőbe mértük át, majd ezt a sejtlizátumot P-nitrofenil foszfát (Sigma-Aldrich, USA) enzim szubsztráttal összekeverve határoztuk meg az alkalikus foszfatáz aktivitását. Az abszorbanciát Hidex Sense microplate olvasón (Hidex, Finnország) használatával 405 nm-en határoztuk meg. Az ALP aktivitás BCA Protein Assay (Pierce, USA) kit segítségével megmért fehérje koncentrációval normalizáltuk.

3.1.2.3. Génexpresszió

A sejtek teljes RNS tartalmát Quick RNA MiniPrep (Zymo Research, USA) kit segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően. A mintákból 1000 ng RNS felhasználásával végeztük el a reverz transzkripciót High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) alkalmazásával. A qPCR reakciókat HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis Biodyne, Észtország) enzimmel és gén specifikus TaqMan próbák (Applied Biosystems, USA) használatával végeztük el LightCycler 480 készülékben (Roche, Svájc). Belső referenciaként a GAPDH gén expresszióját használtuk az összes mérés alapjául. A génexpressziós szinteket a Δ Cp módszerrel számítottuk ki.

3.1.3. In vivo vizsgálatok

Az in vivo kísérlet során a csontdefektusban észlelt osszeointegráció a patkányokba helyezett AE és β -TCP-AE minták, a "calvaria critical size defect model" alapján lettek vizsgálva. Az állatkísérletek a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság jóváhagyása alatt történtek (7-M/15/DE MÁB). A kísérlet során felnőtt hím Wistar patkányokon a koponyabőrt és a vetületébe eső izomzatot, valamint a perioszteumot érintő medián-szagitális metszést és parietális irányba laterálisan történő lap-szerinti preparálást követően egy trepán fúró segítségével 8 mm-es cilindrikus csontot távolítottunk el a koponyacsont teljes vastagságában, úgy, hogy a vetületébe eső dura mater intakt maradjon. Az így létrehozott csontdefektusok harmadát üresen hagytuk (kontroll csoport), másik harmadát AE granulátummal, a maradékot pedig β -TCP-AE anyaggal töltöttük. Egy-, három- és hat hónap után mindhárom csoportból (kontroll; AE; β -TCP-AE) 3-3 állat érintett koponyacsontját dolgoztuk fel, szövettani vizsgálat céljából.

3.1.4. Hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

Egy-, három (és hat-) hónappal később a csontdefektust tartalmazó kontroll vagy AE-vel, ill. β -TCP-AE-vel kezelt szövetmintákat formalinban fixáltuk, melyekből csoportokként 3-3 speciment 4%-os EDTA (etilén-diamin-tetra acetát) oldatban dekalcináltuk. Paraffinba ágyazás után mikrotóm segítségével 5-6 μm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteken hematoxilin-eosin (HE) és van Gieson festést végeztünk. Emellett peroxidáz-bázisú immunhisztokémiai reakciókat (IH) is végeztünk citrát pufferben, primer antitestként nyúl monoklonális Ki-67 nukleáris fehérje ellenes antitestettel (Abcam, Egyesült Királyság). A metszeteket "Panoramic MIDI" digitális metszet-szkennerben (3D-Histech-Zeiss, Budapest) digitalizáltuk, Hitachi 3CCD progresszív színes kamerával. Az összehasonlító képanalízishez a HistoQuant nevű "Panoramic Viewer software 1.15.2" (3D-Histech) volt használva. A fotódokumentáció rögzítése Mirax Viewer számítógépes applikációval a digitalizált metszetekből, esetenként Leica DM2500 mikroszkópon keresztül történt.

3.2.1. Próbatestek és minták előkészítése

Munkánkban a dekalcinálás nélkül készülő szövettani minták három anyagának megfelelően készültek epoxi (EpoFix gyanta és Epofix térhálósító (EpoFix Kit, Struers, Ballerup, Dánia) összekeveréséből származó keverék), csont (marha combcsont kortikális része) és titán korongok (átmérő: 5,3 mm, magasság: 2 mm). A tárgylemezként használt üvegből (Thermo Scientific Menzel Gläser LOT#8501777) 13 x 25 mm-es nagyságú darabok lettek vágva. A vágás előtt a kémiai-mikromechanikai adhézió növelésének céljából az üveg felületét homokfújással kezeltük 50 µm nagyságú Al₂O₃ részecskékkel.

3.2.2. Alkalmazott adhezívek és gyanta mátrix bemutatása

Az epoxigyanta, csont és titán korongok üveg felszínhez való rögzítésére két különböző adhezív anyag volt alkalmazva. Az egyik, egy termoplasztikus adhezív (Crystalbond 509 Mounting Adhesive, SPI Supplies, USA LOT#1180228), mely körülbeül 160°C fokon megolvad és szobahőmérsékleten visszahűlve ismét megszilárdul, így ragasztva a mintát mechanikai úton az üveg felszínéhez. A második adhezív valójában 2 lépéses adhezív, az első réteg egy 10-MDP tartalmú adhezív keverék. A második adhezív egy gyantát és fotoiniciátort tartalmazó ragasztó. Mindezt szendvics szerkezetben használva a metszet alkotók és az

üveglap között. Az üveglap felszínétől haladva 10-MDP tartalmú bond +gyanta+gyanta ismét+10-MDP tartalmú bond aztán a csont/titán/epoxi.)

3.2.3. Minták, próbatestek készítése

Az ideális savas áztatás ideje az üvegfelszínnek egy előkísérlet során lett meghatározva. Ezen kísérlet során a 13 x 25 mm-es nagyságú darabokra vágott üvegek (n= 42, 7 db/csoport) 68%-os töménységű salétrom savban (VWR, Debrecen, Magyarország) 0-tól (1. csoport, kontroll csoport) maximum 5 órán (6.csoport) át áztak a sötétben. Az áztatást követően desztillált vizes mosás és szárítás következett. A homokfújt üvegfelszínre és az epoxigyanta korongra is az MDP taralmú bond került első rétegként, majd mind az epoxigyanta, mind az üveg felszínén második rétegként fotopolimerizálható gyanta került fel, és végül az epoxigyanta-üveg mintákat egy fény kályhába (Scheu LC-6 Light Oven, Iserlohn, Németország) helyeztük fotopolimerizációra. Az így elkészült mintákon ezután azonnal nyírószilárdságot vizsgáló méréseket végeztünk.

3.2.4. Zéta potenciál mérés

Zéta potenciál méréshez az üveglapokat megőröltük Analysette 3 Vibratory Sieve Shaker (Fritsch, Weimar, Németország) géppel hat percen át 1,5 mm amplitúdóval. Az így megőrölt üvegpor háromszoros desztillált vízzel történő mosása és 90 °C fokon végzett szárítása, majd 0,1 g őrlemény három órán át tartó salétromsavas áztatása következett. A felülúszó salétromsav eltávolítása után az őrlemény ultra-tiszta vízzel lett átöblítve. A nem protonált üveg őrlemény szuszpenzió 0,1 g üveg őrlemény diszperziója 0,001 M NaCl tartalmú elektrolitjából készült. A szuszpenziók és a háttér elektrolitok pH értékének mérése Orion 2 Star (Thermo Scientific, Szingapúr) készülékkel, míg a zétapotenciál értékének mérése Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Grovewood, Worcestershire, UK) készülékkel történt. Minden minta öt alkalommal lett lemérve, zéta potenciál számítása Smoluchowski közelítéssel került meghatározásra.

3.2.5. XPS mérés

Az elemek kémiai állapotának meghatározására végrehajtott röntgen gerjesztésű fotoelektron spektroszkópia mérésekre egy Al/Mg iker anódos, nem monokromatizált sugárforrással ellátott Phoibos100 MCD-5 típusú (Specs, Berlin) berendezés használatával került sor. Mind a savval maratott, mind pedig a kezeletlen minták vizsgálata Al K_a (E = 1486 eV) anóddal

történt. A mérésekhez 1×1 cm-es mintadarabokat vágtunk ki, a minták felületeit nitrogén gáz ráfújásával tisztították, a tisztított mintákat vagy közvetlenül az XPS mintatartóra (kezeletlen minta) rögzítettük, vagy 3 órán át szobahőmérsékleten salétromsavban áztattuk. A savas kezelés után a mintákat desztillált vízzel lemostuk, nitrogénnel szárítottuk és a mintatartón való rögzítés után az XPS mérések megkezdése előtt 20 órán keresztül vákuumban (10^{-7}) mbar) hagytuk száradni és kigázosodni. A mérések során a Ca, Na, O, C és Si elemek energia spektrumait rögzítettük, kiértékeléshez a CasaXPS (http: //www.casaxps.com) programcsomagot alkalmaztuk. Az energia tengely kalibrálása az általánosan elfogadott szén (284,5 eV) csúcshelyzethez történt. A csúcsalakok illesztéséhez Gauss/Lorentz függvényeket használtunk, Shirley-típusú háttér levonással.

3.2.6. Kontakt szög mérés

A víz és az adhezív kontakt szög értékének vizsgálata DSA 30 Drop Shape Analyzer (Krüss GmbH, Hamburg, Németország) készülékkel történt szobahőmérsékleten (25 °C) sima üveg, protonált üveg, epoxi és titán felszíneken. Egy 0,5 mm átmérőjű tű használatával, automata adagoló fecskendő rendszerből 3 μ l egységnyi vízcsepp került adagolásra a fent említett különböző felszínekre. Az adhezív anyag esetében a 3 μ l egység egy 0,3 mm átmérőjű tűből került kézi adagolással ugyanezen felszínekre. A kontakt szög értéke a cseppformájához igazított Young-Laplace egyenlet alapján számolt szögértékből lett meghatározva. Az átlagos kontakt szög érték kezeletlen üveg felszín és protonált üveg felszín esetében mért 10 csepp átlagából történt.

3.2.7. Nyírószilárdság meghatározása

A nyíró szilárdság méréshez különböző csoportok lettek kialakítva, a felhasznált adhezív anyag típusa (termoplasztikus, vagy MDP tartalmú) és az üveg felszínének (sima, homokfújt, protonált) függvényében. Az első csoportban a sima üvegfelszín és termoplasztikus adhezív (1.csoport=TPA), második csoportban homokfújt üveg felszínen és MDP tartalmú bond gyantával (2.csoport=MDP), harmadik csoportban MDP tartalmú bond gyantával, protonált, homokfújt üvegfelszínen (3.csoport= PRO-MDP) került alkalmazásra. Minden csoportban 15 darab csont, 15 darab epoxi és 15 darab titán korong került ragasztásra. A nyíró szilárdság egy mechanikus vizsgálatot végző eszköz (INSTRON 5544, Norwood, USA) segítségével és a mintákhoz egyedileg tervezett apparátus segítségével kerültek mérésre.

3.2.8. Törési módok detektálása

A mintákat alkotó anyagok közötti törési felületek fénymikroszkópos (Olympos SZ61) vizsgálata 45x nagyítás mellett történt a szakítószilárdság mérését követően. Csoportosításuk az alábbiak szerint lett nevezve:

- Adhezív törés 1 : az üveg és az adhezív anyag közötti elválás
- Adhezív törés 2 : az adhezív anyag és a minta (epoxi gyanta, csont, titán) közötti elválás
- Kohezív törés 1 : adhezív anyagban, anyagból történő leválás
- Kohezív törés 2 : üvegről történő leválás

4. Eredmények

4.1.1. Szilika aerogél anyagtani jellemzői és porozitása

A szilika aerogél mátrix porozitása nitrogén adszorpciós-deszorpciós poroziméterrel lett meghatározva. Makropórusok és mezopórusok jelenléte volt megfigyelhető, de a leggyakrabban előforduló pórus méret 25 nm volt. Mivel a 200 nm-nél nagyobb pórusok kimutatására a nitrogén adszorpciós-deszorpciós porozimetria nem alkalmas, így mikroszkóp és pásztázó elektron mikroszkóppal (PEM) további mérések történtek 700x és 15x nagyításon. β-TCP szemcséket tartalmazó területeken 1-20 mikron nagyságú pórusméretek voltak jellemzőek.

4.1.2. Aerogélek citotoxicitása SAOS-2 sejtek életképességére

Az aerogél citotoxicitásának vizsgálatához SAOS-2 sejteket alkalmaztunk. A kontroll csoportban használt sejtek tenyésztő médiumban (culture medium, CM) maradtak, míg a második csoportban aerogéllel, harmadik csoportban β-TCP tartalmú aerogéllel kiegészítve. AlamarBlue Reagenssel történt méréseink alapján az egyedüli szignifikáns különbség a β-TCP-aerogélt tartalmazó csoport esetében volt, ahol enyhe csökkenés mutatkozott a proliferációban, mind a kontroll, mind az aerogélt tartalmazó csoportokhoz képest.

4.1.3. Alkalikus foszfatáz aktivitás

Az aerogél és β -TCP-AE anyagok SAOS-2 sejtekre gyakorolt oszteoblaszt-differenciálódás indukciós képessége volt vizsgálva alkalikus foszfatáz aktivitás (ALP) teszttel. Eredményeink alapján az aerogél és β -TCP-aerogél mintáinknál enyhe, de szignifikáns növekedés volt mérhető. Mivel az alkalikus foszfatáz aktivitásának növekedése az oszteoblaszt differenciáció markere, így ez az eredmény alátámasztja a SAOS-2 sejtek differenciációjának feltételezhetőségét.

4.1.4. Génexpresszió

Génexpressziós méréseink során az oszteoblaszt differenciálódásért felelős BMP-2, BMP-7, Runx2 és OSX kifejeződése volt vizsgálva hét nap után. Minden gén referencia értéke a GAPDH. Szignifikáns eltérés csak a β-TCP-AE minta esetén mutatkozott a CM-hez képest a Runx2 gén esetében.

4.1.5. Hisztopatológiai analízis

A lépcsőzetes metszésekkel végzett metszetek szemikvantitatív értékelése alapján az alábbiak állapíthatóak meg: egy hónappal a csontdefektus β-TCP-AE-vel való pótlását követően, a gyulladásos granulációs szövetben már incipiens multifokális kalcifikáció és korai osszifikáció figyelhető meg a defektus belsejében, intralézionálisan. Ezzel ellentétben a kontroll (csontpótlót nem tartalmazó, üresen hagyott) csontdefektusban, csupán gyulladásos fibrózus sarjszövetképződés volt látható 1 hónap után. Mégis, emellett az 1 hónapos mintákban a csontszélek belfelszínéről kiinduló un. laterális reparatív csontosodás mind a kontroll, mind AE ill. β-TCP-AE csontpótlókkal kezelt defektusokban is megfigyelhető, mely különösen a β-TCP-AE-vel kezelt defektusokban volt a legkifejezettebb. Ez a csontpótlók osszeokonduktív hatására utal. Figyelemreméltó, hogy a 3 hónapos csontdefektus mintákban, melyek AE-vel, de kifejezetteben amik β-TCP-AE-vel lettek pótolva, a kontrollhoz képest szignifikáns progresszív intralézionális (csontszélektől független) osszifikáció figyelhető meg nagy összefolyó újdonképződött csontszigetek képződése formájában, ami a csontpótló anyagok osszeoinduktív hatására utal. Fontos megjegyezni azonban, hogy a 3 hónapos csontpótlóval kezelt mintákban teljes osszifikáció még nem alakul ki, csupán szubtotálisan; más területekben fibrotikus alapállományban alacsony aktivitású sejt mediált idegentest típusú óriássejtes gyulladás látható, a nem metabolozált szilika kristályok körül, ami kevés AE ill. β-TCP-AE nem rezorbeált csontpótló anyagnak felel meg.

4.2.1. Az üvegfelszín optimális savazási ideje

Az üvegfelszín optimális savazási idejének meghatározása az üvegfelszínhez rögzített epoxi gyanta nyírószilárdsági mérésein alapszik. Az üvegfelszín az MDP tartalmú bonddal és gyantával rögzített epoxi gyanta előtt 1-5 órán át volt savazva. A nyírószilárdásgi mérések a 3 órán át savazott csoportban lettek a legmagasabbak, így ez a legkedvezőbb az üvegfelszín protonálásának szempontjkából.

4.2.2. Zéta potenciál mérés eredményei

A zéta potenciál mérést leginkább befolyásoló faktorok a pH és az ionerősség. Esetünkben ez utóbbi konstans volt. Az őrölt szilika por (d = 1183 ± 230 nm) pH értéke 10,14 volt a háttér elektrolitban. A lúgos pH hátterében az üveg részecskék külső rétegében található protonok, hidroxónium ionok és az üvegben lévő nátrium és kalcium ionok cseréjé áll (39, 40). -57,22 mV zéta potenciál érték mellett, lúgos közegben az üveg felszín erőteljes negatív töltöttséggel rendelkezik. A protonált üveg részecskék szuszpenziójának pH értéke 1,82 volt. A protonált őrölt üveg részecskék zéta potenciál értéke +4,42 mV csökkenést mutatott a nem protonált üveg szuszpenzióhoz képest. A salétromsavas protonálás következtében az üveg felszínnek pozitív töltöttsége lesz, amely befolyásolhatja a szilika adszorbcióját az MDP-hez.

4.2.3. XPS mérés eredményei

A kalcium és nátrium koncentrációja csökkenést mutat, míg a Na 1s és Si 2p csúcsa egy magasabb kötésű energia pályára (binding energy = BE) tolódik. Ezt nagyrészt az üveg egyfajta korróziója által okozott pH érték savasodása okozza, amikoris a lúgos ionok kioldódnak az üveg felszínéről és helyükre olyan kationok, mint a H^+ vagy H_3O^+ ionok kerülnek. A nagy számban jelenlévő H^+ vagy H_3O^+ ionoknak köszönhetően létrejött erőteljesen savas közegek segítik felgyorsítani ezt az ioncserét, mely egy kedvezőbb energetikai állapotot eredményez. A kötött oxigén számának megfelelően az energia pályák általában növekednek, így a BE eltolódás mutatja a kioldódott lúgos ionok kicserélődését valamilyen oxigén tartalmú elemre, mint jelen esetünkben a H_3O^+ ionra.

4.2.4. Kontakt szög

A megfelelő adhézió kialakításához a hidrofil (jelen esetben az üvegfelszín) és a hidrofób (epoxi gyanta, csont és titán) felszínek között kulcsfontosságú az adhéziós anyag nedvesítő képessége. A kontakt szög értékeink alapján az MDP kiválóan nedvesíti mind az üveg, mind

az epoxi gyanta, csont és titán anyagokat, így segítve a rétegek közötti megfelelő adhézió kialakítását.

4.2.5. Nyírószilárdság

A legkiemelkedőbb eltérést a titán és csont minták esetében mértünk, ahol MDP tartalmú bond mellett protonált üvegfelszínt használtunk. Ezen értékek szignifikánsan magasabbak voltak azokhoz a csoportokhoz képest, ahol nem protonált üvegfelszínt alkalmaztunk.

4.2.6. Törési módok detektálása

Első csoportban mért eredményeink szerint epoxi mintán az első típusú adhezív törés 92%, csont minta esetén 81%, titán mintánál 83%. Első típusú kohezív törés 8%, 19% és 17%. Második csoportban epoxi, csont és titán mintáknál az első típusú adhezív törés 75%, 60%, 55%, első típusú kohezív törés 25%, 27%, 33%, kettes típusú kohezív törés csont minta esetén 13%. Harmadik csoport esetén első típusú törés 83%, 54%, 61% epoxi, csont és titán mintákon. 12% adhezív második típusú törés titán felszínen, kohezív törés volt detektálható a legmagasabb számban, ami az üvegfelszín és termoplasztikus ragasztó közötti törést mutatja. Ezzel szemben a harmadik csoport esetén az adhezív és kohezív típusú törések arány körülbelül 50-50 %-ra esett. Az első csoporthoz képest a második csoportban megemelkedett az első típusú kohezív törésk száma, ami az MDP tartalmú bond termoplasztikus ragasztóhoz viszonyított magasabb kötődését mutatja a felszínek között. Az MDP tartalmú bond mellett az üvegfelszín protonáltságával az adhézió tovább nőtt.

5. Megbeszélés, fontosabb eredmények és következtetések

1. Munkánkban sikerült fogászati felhasználásra potenciálisan alkalmas szilika aerogél (AE) és β-trikalcium foszfát aerogél (β-TCP-AE) kompozit csontpótló anyagok módosított formáját kialakítani, melyek mezoporózus fiziko-kémiai tulajdonságuk révén alkalmasak lehetnek csontdefektus rekonstrukciójának ellátására.

2. In vitro vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a fenti anyagok vizes közegben részlegesen szolubilizálódnak és nem mutatnak citotoxicitást, ugyanakkor képesek SAOS-2 differenciálatlan oszteoszarkóma sejtvonalban oszteoblasztos differenciációt indukálni, melyre az alkalikus foszfatáz és az oszteogenezisben résztvevő gének egy részének mérsékelt emelkedése utalt.

3. In vivo vizsgálatokat követően hisztopatológiailag bizonyítottuk, hogy mindkét csontpótló, de különösen a β -TCP-AE kompozit képes egy prominens csontosodási folyamatot beindítani patkányok koponyacsont defektusában mind oszteokonduktív módon a csontszélek mentén, mind oszteoinduktív módon a csontos környezettől függetlenül intralézionálisan, *de novo* csontújdonképződött szigetek formájában, mely 3 hónap alatt közel 70%-os osszifikációt eredményez a csontdefektusban, mialatt nagyobbrészt degradálódnak és metabolikus folyamatok révén eliminálódnak.

4. A szövettani-morfológiai eredmények arra utalnak, hogy mindkét mezoporózus csontpótló optimális "scaffolding"-gel, azaz vázképző tulajdonsággal rendelkezik, és hatására a recipiensben idegentest típusú sejt-mediált gyulladásos reakciót indukál, ami összefüggésbe hozható a rapid csontújdonképződéssel.

5. Vékony-csiszolat metszet készítéssel kapcsolatos kutatási eredmények azt mutatják, hogy az érdesített protonált üvegfelszín MDP tartalmú adhezív anyaggal biztosíthatja az eredményes keményszövetből vékony csiszolat készítését, akkor is, ha titanium implantátumot tartalmaz.

6. Összefoglalás

Csontpótláshoz biokerámia-alloplasztokat is használhatnak, amik facilitálhatják a csontreparációt oszteoindukció révén, így rekonstruktív ortopédiai vagy állcsont sebészetben, illetve fogászati implantológiában, parodontológiában is alkalmazhatók.

Jelen munkánk során laboratóriumunkban előállított mezoporózus szilika aerogél (AE) és β-TCP-AE (β-trikalcium-fosztát aerogél) kompozit anyagok fiziko-kémiai karakterizálását és *in vitro* sejtbiológiai hatásait vizsgáltuk, melyek non-toxikusnak és SAOS-2 sejtvonalon oszteoblasztos differenciációt elősegítőknek bizonyultak, ami alkalmassá teszi csontpótlóként való használatukat. A fenti anyagokkal történt *in vivo* vizsgálataink patkány koponyacsonton azt mutatták, hogy a 8 mm-es csontdefektusban mindkét anyaggal, de különösen a β-TCP-AE-nél való rekonstruktív pótlást követően, intenzív (csontszélből kiinduló) laterális oszteokonduktív jellegű reparatív osszifikáció indukálódott már az első hónapban, valamint intralézionális (csontszélektől független) meszesedést követő *de novo* képződőtt csontosodási szigetek kialakulása oszteoid mátrix-szal és aktív sejtciklusban lévő oszteoblasztos szegéllyel, mely utóbbi korai oszteoindukciónak felel meg. A szövettani eredmények arra utalnak, hogy a folyamatot érdús sarszövetképződéssel kombinálódott szilika AE jelenléte által kiváltott idegentest típusú óriássejtes granulomatozus gyulladás mediálja, az aktivált makrofágok és egyéb sejtes elemek révén, melyek (vélhetően autokrín és parakrín regulációval) oszteogén sejtes differenciációt, majd csontképzést eredményeznek. Figyelemreméltó azonban, hogy 3 hónap elteltével a folyamat még nem végződik teljes (100%-os) csontos defektus-zárással, a lobos kötőszövetben a csekély mennyiségű nem metabolizált szilika-maradványokkal asszociáltan alacsony intenzitású granulomatózus gyulladás még jelen van, további újdonképződött csontszigetekkel.

A csontpótlók által indukált új osszifikált szövet-mátrix mineralizációs fokát, eredeti terveink ellenére, nem sikerült hisztológiai vizsgálattal megbízhatóan megítélni, mivel a natív (nem dekalcinált) csontdefektus mintákból vékony csiszolatot reprodukálható módon nem tudtunk előállítani. Emiatt, munkánk második részében, kidolgoztunk egy olyan új metodikát, melynek segítségével vékony-csiszolat metszet is készíthető. Ilyen vonatkozásban az eredmények azt mutatták, hogy a megfelelő módon történt üveg-felszín érdesítés, annak protonálása, majd a 10-MDP tartalmú adhezív anyag együttes alkalmazása kellően biztosítja még a titánium implantátumot is tartalmazó kemény natív csontszövetminták vékony-csiszolattal történő metszet készítését.

Irodalomjegyzék

1. Yehuda K, Natthapong K, Omer F, Nardi C, Polak D, Chaushu S. The impact of alloplast and allograft on bone homeostasis: Orthodontic tooth movement into regenerated bone. J Period. 2019, 91(8). DOI: 10.1002/JPER.19-0145

2. Saroch N. Periobasics. A textbook of periodontitics and implantology. 2017, ISBN: 8193473000, 9788193473009

3. Bohner M, Bastien Le Gars Santoni B, Döbelin N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. Acta Biomaterialia. 2020, 113, 23–41

Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation.
J Oral Maxillofac Surg. 2004, 62, 6: 724–729

5. Kistler S.S. Coherent expanded aerogels and jellies. Nature. 1931, 127, 741

6. Frickie J, Emmerling A. Aerogels-preparation, properties, applications. Structure and Bonding.1992, 77, 37-87

7. A. Du, B. Zhou, Z. Zhang, J. Shen, A special material or a new state of matter: a review and reconsideration of the aerogel. Materials 2013, 6, 941-968.

8. A. Zaman, F. Huang, M. Jiang, W. Wei, Z. Zhou, Preparation, properties, and applications of natural cellulosic aerogels: a review. EBE 2020, 1, 60–76.

9. Rubin M, Lampert CM. Transparent silica aerogels for window insulation. Solar Energy Materials. 1983, 7, 393-400

10. Fricke J, Caps R, Büttner D, Heinemann U, Hümmer E. Silica aerogel: A light transmitting thermal superinsulator. Journal of Non-Crystalline Solids. 1987, 95-96, 1167-1174

11. Lien AG, Hestnes AG, Aschehoug O. The use of transparent insulation in low energy dwellings in cold climate. Solar Energy. 1997, 59, 3: 27-35

 Wittwer V. Development of aerogel windows. Journal of Non-Crystalline Solids. 1992, 145, 233-236

13. Jensen KI. Passive solar component based on evacuated monolithic silica aerogel. Journal of Non-Crystalline Solids. 1992, 145, 237-239

14. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CJ. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration Biomaterials Research. 2019, 23:4

15. Wells HG. Pathological calcification. The Journal of medical research. 1906, 14:491

16. Albee FH. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis.Ann Surg. 1920, 71:32

17. Schram W, Fosdick L. Stimulation of healing in long bones by use of artificial material. J Oral Surg. 1948, 6: 209

18. Ishikawa K, Ducheyne P, Radin S. Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray-diffraction analysis. J Mater Sci Med. 1993, 4, 165–168

19. Brazete D, Torres PMC, Abrantes JCC, Ferreira JMF. Influence of the Ca/P ratio and cooling rate on the allotropic $\alpha < -> \beta$ -tricalcium phosphate phase transformations. Ceram Int. 2018, 44, 8249–8256

20. Akao M, Aoki H, Kato K, Sato A. Dense polycrystalline b-tricalcium phosphate for prosthetic applications. J Mater Sci. 1982, 17, 343–346

21. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. Biomaterials. 2002, 23, 1065–1072

22. Gibson IR, Rehman I, Best SM, Bonfield W. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to beta-tricalcium phosphate. J Mater Sci Med. 2000, 11, 533–539

23. Enderle R, Gotz-Neunhoeffer F, Gobbels M, Muller FA, Greil P. Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of beta-TCP ceramics examined by Rietveld refinement. Biomaterials. 2005, 26, 3379–3384

24. Kannan S, Goetz-Neunhoeffer F, Neubauer J, Ferreira JMF. Synthesis and structure refinement of zinc-doped b-tricalcium phosphate powders. J Am Ceram Soc. 2009, 92, 1592–1595

25. Destainville A, Champion E, Bernache-Assollant D, Laborde E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. Mater Chem Phys. 2003, 80, 269–277

26. Torres PMC, Abrantes JCC, Kaushal A, Pina S, Döbelin N, Bohner M, Ferreira JMF. Influence of Mg-doping, calcium pyrophosphate impurities and cooling rate on the allotropic α < - > β -tricalcium phosphate phase transformations, J Eur Ceram Soc. 2016, 36, 817–827

27. Chaair H, Labjar H, Britel O. Synthesis of β -tricalcium phosphate. Morphologie. 2017, 101, 120–124

28. Grigoraviciute-Puroniene I, Tsuru K, Garskaite E, Stankeviciute Z, Beganskiene A, Ishikawa K, Kareiva A. A novel wet polymeric precipitation synthesis method for monophasic β -TCP. Adv Powder Technol. 2017,28, 2325–2331

29. Stahli C, Thuring J, Galea L, Tadier S, Bohner M, Dobelin N. Hydrogen-substituted [beta]-tricalcium phosphate synthesized in organic media. Acta Crystallogr Sect B. 2016, 72: 875–884

30. Tao J, Jiang W, Zhai H, Pan H, Xu R, Tang R. Structural components and anisotropic dissolution behaviors in one hexagonal single crystal of b-tricalcium phosphate. Cryst Growth Des. 2008, 8: 2227–2234

31. Tao J, Pan H, Zhai H, Wang J, Li L, Wu J, Jiang W, Xu X, Tang R. Controls of tricalcium phosphate single-crystal formation from its amorphous precursor by interfacial energy. Cryst Growth Des. 2009, 9: 3154–3160

32. Erhart S, Kammerlander C, El-Attal R, Schmoelz W. Is augmentation a possible salvage procedure after lateral migration of the proximal femur nail antirotation? Arch Orthop Trauma Surg. 2012, 132: 1577–1581

33. Galea L, Bohner M, Thuering J, Doebelin N, Aneziris CG, Graule T. Control of the size, shape and composition of highly uniform, non-agglomerated, submicrometer β -tricalcium phosphate and dicalcium phosphate platelets. Biomaterials.2013, 34: 6388–6401

34. Bow JS, Liou SC, Chen SY. Structural characterization of room-temperature synthesized nano-sized beta-tricalcium phosphate. Biomaterials. 2004, 25: 3155–3161

35. Donath K. The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. Path Res Pract. 1985, 179, 631-633

36. Carrilho E, Cardoso M, Marques FM, Marto C, Paula A, Coelho A. 10-MDP based dental adhesives: adhesive interface characterization and adhesive stability. A systematic review. Materials. 2019, 12, 790

37. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, Inoue S, Tagawa Y, Suzuki K, De Munck J, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. J Dent Res. 2004, 83, 454-458

38. Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, Yoshida Y, Inoue S, Suzuki K. Technique-sensitivity of contemporary Adhesives Dent Mater J. 2005, 24, 1–13

39. Schaut RA, Pantano CG. Acid interleave coatings inhibit float-glass weathering, corrosion. Am Ceram Soc Bull. 2005, 84, 44–49

40. Hasanuzzaman M, Rafferty A, Sajjia M, Olabi AG. Properties of glass materials. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, 1st ed.; Saleem, H., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 1–12



Tárgy:

Nyilvántartási szám: DEENK/485/2021.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hegedűs Viktória Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szalóki, M., Hegedűs, V., Fodor, T., Martos, R., Radics, T., Hegedűs, C., Dezső, B.: Evaluation of the Effect of the Microscopic Glass Surface Protonation on the Hard Tissue Thin Section Preparation. Appl. Sci.-Basel. 10 (21), 1-21, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/app10217742

IF: 2.679

2. Hegedűs, V., Kerényi, F., Boda, R., Horváth, D., Lázár, I., Győri, E., Dezső, B., Hegedűs, C.: β-Tricalcium phosphate silica aerogel as an alternative bioactive ceramic for the potential use in dentistry.

Adv. Appl. Ceram. 117 (8), 476-484, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.1080/17436753.2018.1498145 IF: 1.429

További közlemények

3. Hajdú, P., Lampé, I., Rácz, R., Biri, S., Csik, A., Tóth, F., Szalóki, M., Hegedűs, V., Dombrádi, Z. R., Varga, I., Csarnovics, I., Kökényesi, S., Beke, D. L., Hegedűs, C.: Optimized Size and Distribution of Silver Nanoparticles on the Surface of Titanium Implant Regarding Cell Viability. DEBRECENI

Appl. Sci.-Basel. 10 (20), 1-13, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/app10207063 IF: 2.679

4. Martos, R., Hegedűs, V., Szalóki, M., Blum, I. R., Lynch, C. D., Hegedűs, C.: A randomised controlled study on the effects of different surface treatments and adhesive self-etch functional monomers on the immediate repair bond strength and integrity of the repaired resin composite interface. J. Dent. 85, 57-63, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2019.04.012

IF: 3.242



- Lampé, I., Beke, D. L., Biri, S., Csarnovics, I., Csik, A., Dombrádi, Z. R., Hajdú, P., Hegedűs, V., Rácz, R., Varga, I., Hegedűs, C.: Investigation of silver nanoparticles on titanium surface created by ion implantation technology. *Int. J. Nanomed. 2019* (14), 4709-4721, 2019. DOI: https://doi.org/10.2147/IJN.S197782 IF: 5.115
- Bakó, J., Varga, I., Bágyi, K., Lampé, I., Hegedűs, V., Blum, I. R., Hegedűs, C.: PerioChip klórhexidin-glükonát felszabadulásának vizsgálata különböző pH-k esetén. *Fogorv. Szle. 112.* (2.), 34-40, 2019.
- Anatoliy, P., Vitaliy, R., Myroslav, G. K., Hegedűs, V.: Prognosis of possible implant loss after immediate placement by the laboratorial blood analysis and evaluation of intraoperatively derived bone samples. *JIDMR 12* (1), 143-150, 2019. IF: 1.364
- Watted, N., Muhamad, A. H., Proff, P., Watted, A., Hegedűs, V., Borbély, P.: Chirurgische Freilegung palatinal verlagerter Zähne. Oralchirurgie Journal 4, 2-12, 2018.
- Borbély, P., Hegedűs, V., Veiszenbacher, É.: Practical notes in orthodontics: for dental students : exercise. Hansa-Dont Orthodontic Studio Ltd., Budapest, 128 p., 2018.
- Watted, N., Abu-Hussein, M., Awadi, O., Proff, P., Borbély, P., Hegedűs, V.: Stripping eine Behandlungsmethode für Platzbeschaffung in der KFO? Zahnmedizin 34 (7-8), 2-14, 2018.
- Kerényi, F., Tarapcsák, S., Hrubi, E., Baráthné Szabó, Á., Hegedűs, V., Balogh, S., Bágyi, K., Varga, G., Hegedűs, C.: Fogbél eredetű őssejtek fluoreszcens és mágneses válogatásának összehasonlító vizsgálata. Fogorv. Szle. 109 (1), 29-33, 2016.
- Abu-Hussein, M., Watted, N., Hegedűs, V., Borbély, P.: Corticotomy in the Modern Orthodontics. J. Dent. Med. Sci. 14 (11), 68-80, 2015.





 Abu-Hussein, M., Watted, N., Hegedűs, V., Borbély, P., Azzaldeen, A.: Human genetic factors in non-syndromic cleft lip and palate: an update. *Int. J. Oral Max. Surg.* 1 (3), 1-17, 2015. IF: 1.563

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,071 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,108

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.11.05.



Tárgyszavak

- aerogél, β-TCP-aerogel, csontpótlás, 10-MDP, keményszövet csiszolat készítés
- aerogel, β -TCP-aerogel, bone grafting, 10- MDP, hard tissue histology

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Dezső Balázsnak mind a munka, mind a magánélet során nyújtott biztatásáért és támogatásáért, türelméért és szakmai iránymutatásáért. Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem Bioanyagtani és Fogpótlástani Tanszék vezetőjének, Prof. Dr. Hegedűs Csabának, aki egyetemi munkavégzésem elején bevezetett a "laboréletbe" és megismerhettem általa a kutatói munkásságot. Számos közös munka, kongresszusok és cikkek során nyújtott emberi és szakmai tanácsadásáért. Köszönettel tartozom még Dr. Szalóki Melindának, aki barátsága mellett folyamatos jelenlétével, szakmai hozzáértésével segített végig a munkám során. Köszönöm továbbá Dr. Bakó József segítségét, aki mindig higgadt és pozitív hozzáállásával könnyítette meg a nehezebb napokat is. Köszönöm továbbá a közös munkát és segítséget Dr. Tóth Ferencnek, Bessenyi Máriának, Dr. Csik Attilának és Dr. Lázár Istvánnak és mindazon kollegáimnak, akik segítették munkámat. Köszönöm a családomnak és a barátaimnak, hogy mellettem vannak és támogatnak!

A tanulmány alapjául szolgáló kutatást a GINOP-2.3.2-15-2016-00011, GINOP-2.2.1-15-2017-00068, GINOP-2.3.2-15-2016-00041 és GINOP-2.3.2-15-2016-00022 pályázatok támogatásával készült.