

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Hegedűs Viktória

Fogászatban potenciálisan alkalmazható
új szintetikus csontpótló anyagok vizsgálata

DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	6
A csontpótlás története	6
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. A csontpótlás alapjai	9
2.2. Az aerogél	15
2.3. A keményszövet csiszolatok és készítésének sajátosságai.....	18
2.4. Célkitűzések	23
3. Anyagok és módszerek.....	24
3.1.1. Aerogél előállítás.....	24
3.1.2. Az aerogél jellemzői.....	24
3.1.3. In vitro vizsgálatok.....	25
3.1.4. In vivo vizsgálatok	26
3.1.5. Hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok	27
3.2.1. Próbatetek és minták előkészítése.....	28
3.2.2. Alkalmazott adhezívek és gyanta mátrix bemutatása.....	29
3.2.3. Minták, próbatetek készítése.....	29
3.2.4. Zéta potenciál mérés.....	30
3.2.5. XPS	30
3.2.6. Kontakt szög mérés	31
3.2.7. Nyírószilárdság meghatározása	31
3.2.8. Törési módok vizsgálata.....	34
4. Eredmények.....	35
4.1.1. Szilika aerogél anyagtani jellemzői és porozitása	35
4.1.2. SAOS-2 sejtek életképessége	38
4.1.3. Alkalikus foszfatáz aktivitás	38
4.1.4. Génexpresszió	39
4.1.5. In vivo kísérletek hisztopatológiai eredményei.....	40
4.2.1. Az üvegfelszín optimális savazási ideje.....	43
4.2.2. Zéta potenciál mérés eredményei.....	44
4.2.3 XPS	45
4.2.4. Kontakt szög.....	48
4.2.5. Nyírószilárdság mérés eredményei	50

4.2.6. Törési módok vizsgálata.....	51
5. Megbeszélés	54
5.1. PhD értekezés alapját szolgáló jelen kutatások új megállapításai.....	67
6. Összefoglalás.....	68
7. Irodalom	71
Tárgyszavak	93
Köszönetnyilvánítás	93

Rövidítések jegyzéke

A

AE: aerogél

ALP: alkaline phosphatase

ATCC: american type cell culture

B

BE: binding energy

BCP: biphasic alloplastic materials

BJH: Barrett-Joher-Halenda módszer

BMP- 2: bone morphogenic protein 2

BMP- 7: bone morphogenic protein 7

BSP: bone sialoprotein

C

CM: culture medium

D

DCPD: dicalcium phosphate dihydrate

DFBA: demineralised freeze-dried bone allograft

DGEBPA: diglicidil-éter-biszfoszfénol A

E

EDTA: etilén-diamin-tetraacetát

ERK1,2: extracellular signal regulated kinases

F

FDDBA: freeze-dried bone allograft

FFA: fresh-freezed allograft

G

GADPH: glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase

H

HA: hidroxy apatite

HE: hematoxinilin eosin

I

IGF-1: insulin-like growth factor 1

IH: immunhisztokémiai reakció

M

MDP, 10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl-dihidrogen-phosphate

MNGC: multinucleated giant cells

O

OCP: osteo calcium phosphate

OPN: ostopontin

OSX: osterix

P

PEM: pásztázó elektron mikroszkóp

PTH: parathyreoid hormon

R

RunX2: run-related transcription factor 2

S

SAOS-2: emberi oszteoszarkóma sejtvonal

T

TCP: tricalcium phosphate

TETRA: tetra- etilene-tetra-amin

TPA: termoplasztikus adhézió

X

XPS: X-ray photoelectron spectroscopy

1. Bevezetés

A csontpótlás története

Az orvostudomány számos területén találkozhatunk különböző csontpótló anyagokkal, melyek elősegítik a gyógyulás folyamatát, vagy helyreállítják az eltérő okokból kialakuló szövethiányokat. Fogászatban fogászati implantátum alkalmazásakor, periodontális kezelések vagy ortodonciai fogmozgatás során kiemelt szerepe van a megfelelő csont homeosztázisnak és csontpótló anyagok használatának. A csont homeosztázis az anabolikus és katabolikus folyamatok egyensúlyi rendszeréből áll, mely biztosítja a csontszövet átépülését és remodelálódását (1). Nagy kiterjedésű csontpótlásra lehet szükség bizonyos törések, ciszták vagy infiltráló tumor sebészi eltávolítását követő szövethiány, vagy fogászati implantáció esetén.

Csont pótlására vagy csont gyógyításra már egész korai időkből maradtak ránk leletek, leírások. Újkőkorszak idejéből feltárt minták alapján egy perui törzsfőnök csontdefektusát egy aranyból készült lemezzel próbálták meggyógyítani, de van leírás csonttörések gyógyítására is az aztékoktól, akik a sínezés sikertelensége esetén javasolták egy fa darab csontvelő üregbe való behelyezését (2). K.E. 2000 időkből származó koponyán A. Jagharian antropológus egy hét mm-es sérülés okozta defektus állati csonttal való helyettesítését írta le (3). Ezek mellett az egyiptomiaknál, görögöknél is találunk számos leírást, ahol különböző sebészeti beavatkozásokat írnak le, illetve kezdetleges ortopéd, illetve csontpótló megoldásokat, ahol a csontot vagy pótolni vagy gyógyítani szerették volna.

A csontpótlás területén újnak mondható első heterológ csontpótlást 1668-ban Job van Meerken sebész végezte (1. ábra). Egy kutya koponyacsontjának darabját ültette át egy sérült katona koponyájába. Bár a műtét sikeres volt, komoly visszhangja lett, mivel a keresztény katonába állati eredetű graftot alkalmaztak, így az egyház kitagadta őt. Ennek következtében a katona kérte a sebészt a csont eltávolítására, és ekkor derült fény annak sikerére, mivel addigra már beépült (4).



1.ábra

Az első heterológ csontpótlást végző orvos, Job Van Meerken holland sebész könyve (5)

Részben talán ezen vallási ok miatt is a heterológ csontpótlás háttérbe szorult, és a következő időben az autológ csontpótlás irányában történtek tanulmányok. Ez utóbbira példa Duhamel, aki 1743-ban állatkísérletei alapján számolt be arról, hogy a perioszteumnak döntő szerepe van az oszteogenezis folyamatában. 1861-ben Ollier fogalmazta meg először a “bone graft” terminológiáját. Elgondolása szerint csak a perioszteumot tartalmazó csont alkalmas autológ csontpótlásra, mely a beültetést követően indukálja a csontképződést. Ugyanebben az időben, bár egymástól függetlenül Barth más eredményre jutott kutatásai alapján, mely szerint a perioszteum, a csont és a graft csontveleje elhálnak a beültetést követően és helyükre újonnan képződött csont épül. A heterológ csontpótlással kapcsolatos kutatások következőleg az 1880-as években folytatódtak, amikor egy skót sebész William Macewen egy tibia darabot helyezett egy gyermekből egy másik gyermek humeruszába, mely játék közben sérült meg (4). Ebben a kísérleti időszakban a Curtis által megfogalmazott hipotézis mellett, mely szerint a sikeres csontpótlás feltétele, hogy a graft élő csontszövet legyen, mely tökéletesen illeszkedik a csont defektus arányaihoz, számos egyéb elképzelést is megvalósítottak. Erre példa 1891-ben Phelps, aki egy gyermeken történt tibia sérülést a hozzá két hétig kötött kutya donor által próbálta biztosítani a graft megfelelő vérellátását (6,7).

Az idő múlásával egyre több kísérlet mutatkozott meg a csontpótlás, gyógyítás területén, amit az elsődleges autograftok után a heterológ graftok követtek, majd a különböző tudományágak fejlődésével a különböző szintetikus csontpótló anyagok is egyre jobban teret hódítottak.

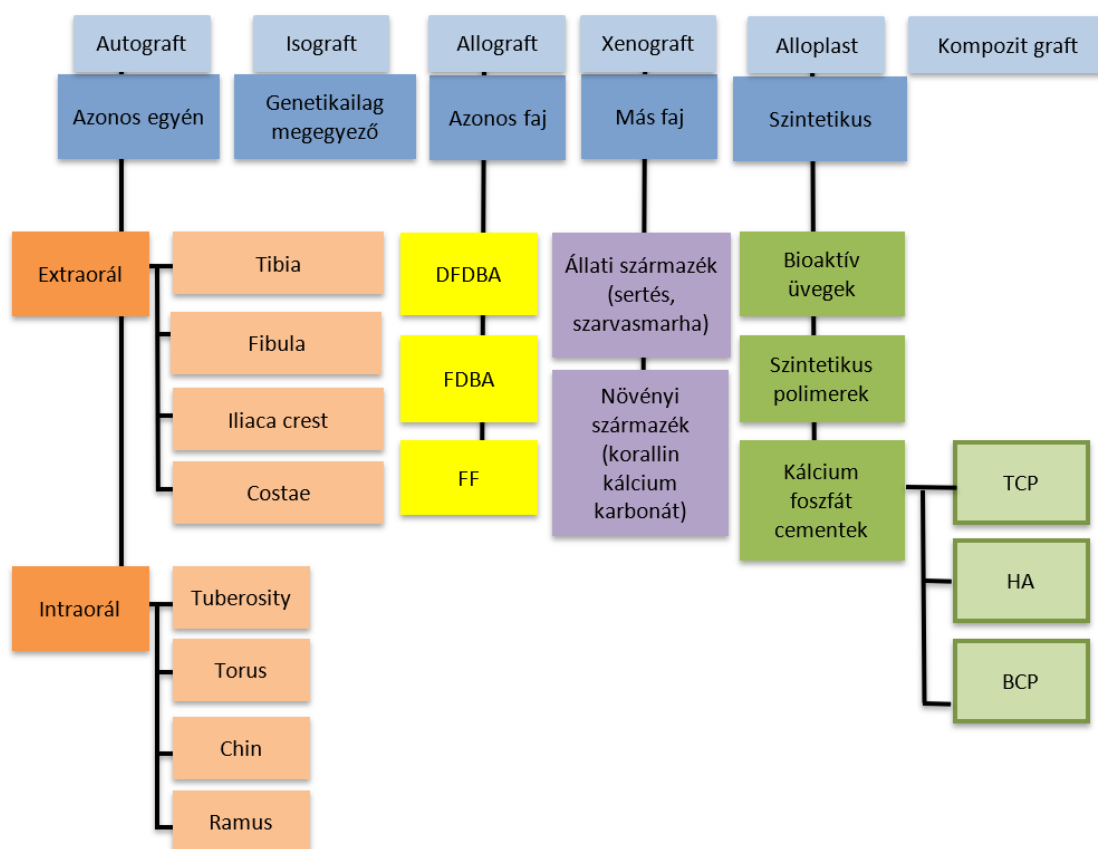
Jelen PhD tézisekben bemutatott munkánk során *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat végeztünk a laboratóriumunkban előállított mezoporózus szilika aerogélen (AE) és β -trikalcium foszfátot tartalmazó aerogélen (β -TCP-AE). Ezek *in vitro* és *in vivo* rendszerekben mutatott biológiai- és oszteoinduktív hatásait az un. patkány „calvaria kritikus csontdefektus” (calvaria critical size defect) modell használatával a csontszöveti reparációs folyamatok mikroszkópos kiértékelése alapján összehasonlítottuk.

Kutatásunk során technikai-metodológiai problémák is adódtak: esetünkben az AE és β -TCP-AE kezelt és kontroll állatok kemény csont mintáiból nem mindig sikerült reprodukív módon *natív* (*nem dekalcinált*) és mikroszkópos üveglemezre stabilan adheráló jó minőségű vékony (10 μ m alatti) csiszolat-metszeteket készíteni minden anyagból, hogy a konvencionálisan dekalcinált és paraffinba ágyazott szövettani metszetekkel minden esetben mikroszkóposan összevethető legyen. Emiatt, ezen adatokat az első cikkünkben kihagytuk és technikai „kitérőként”, kidolgoztunk egy olyan új módszert, melynek segítségével reprodukálható módon akár fémimplantátumot is tartalmazó natív kemény csontszövetből is lehetséges mikroszkópos vizsgálatokra alkalmas vékony csiszolat-metszet készítés. Ez a munka képezi a jelen bemutatásra kerülő PhD tézisek második részét.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A csontpótlás alapjai

Napjainkban a főbb csontpótló anyagok hat különböző csoportját különböztetjük meg (2.ábra).



2. ábra

Csontpótló anyagok csoportosítása (adaptálva, 8)

DFBA = demineralised freeze-dried bone allograft (demineralizált szárított, fagyasztott allograft)

FDBA = freeze-dried bone allograft (fagyasztva szárított allograft)

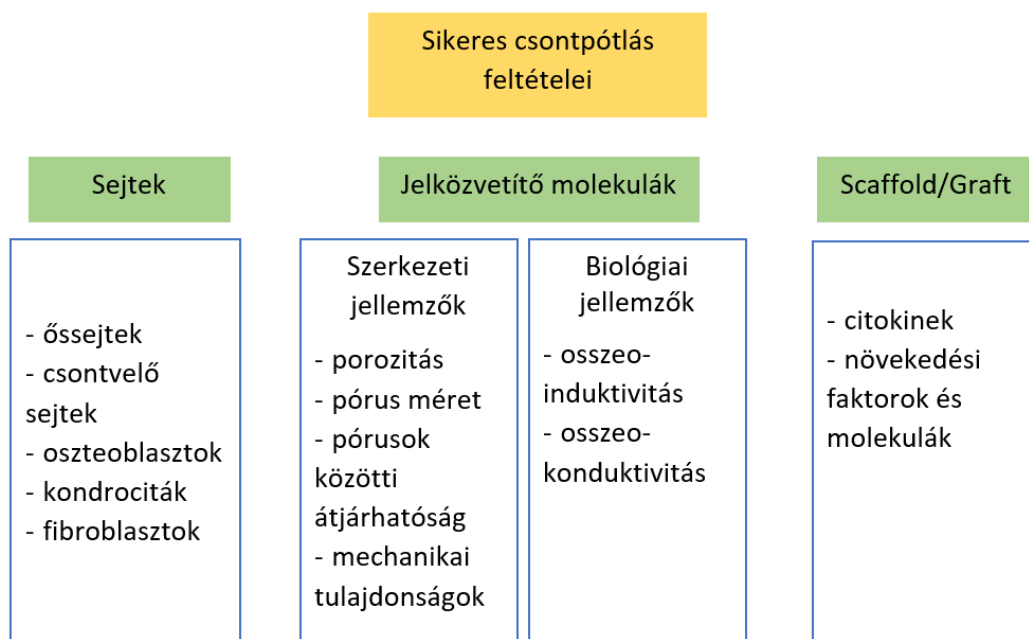
FFA = fresh-freezed allograft (frissen fagyasztott allograft)

TCP = tricalcium phosphate (trikalcium foszfát)

HA = hydroxy apatite (hidroxi apatit)

BCP = biphasicalloplastic materials (TCP és HA keverékéből származó anyagok)

Saját, azonos egyénből származó graft az autograft. Extraorális formái közül leggyakrabban a csípőcsont-, a sípcsont-, szárcapocscsontból, intraorális esetben a mandibula különböző területéről származnak a graftok. Nem azonos egyénből, de genetikailag azonos (például ikertestvér) megegyező graft az izograft. Azonos emberi csont, vagyis azonos faj az allograft. A csont-allograft friss fagyasztott, vagy fagyasztva szárított, vagy demineralizált formában kerülhet felhasználásra. Más fajból, úgynevezett xenograft-ként is származhatnak a csontpótló anyagok szarvasmarhából, sertésből vagy korallból (korallin kalcium foszfát). Szintetikus előállított csontpótló anyagok összefoglaló neve az alloplast (1, 8, 9).



3.ábra

A sikeres csontpótlás feltételei (adaptálva, 8, 10)

A sikeres csontpótlás érdekében a jó oxigén és tápanyag támogatottságnak kulcsfontosságú szerepe van, melynek köszönhetően tud a graft hosszú távon integrálódni a recipiens szöveti környezetéhez. Ennek fényében központi szerepe lesz egyrészt a scaffold (vázképző) vagy szöveti-graft szerkezeti megjelenésének -úgy mint a pórusok mérete, az anyag porozitása és mechanikai tulajdonsága- másrészt biológiai

tulajdonságának, különösen oszeoinduktív és oszeokonduktív hatásának. Emellett a sikeres csontpótlás feltétele olyan sejtek, mint őssejtek, oszteoblasztok, fibroblasztok és egyéb mezenhimális celluláris elemek, valamint a különböző jelátvivő molekulák, mint citokinek, növekedési faktorok, plazma komponensek, stb. jelenléte is (3. ábra) (8, 10).

A szintetikusan előállított csontpótló anyagokat a fent leírt hármas feltétel tükrében állítják elő a sikeres csontpótlás reményében. Csontpótló anyagként számos variációja van a szintetikus anyagoknak, de ezek közül is a kalcium foszfát tartalmúakat vizsgálták leggyakrabban. Ennek oka elsősorban, hogy magának a csontnak is a fő extracelluláris alkotó eleme az apatit kalcium foszfát (9).

A kalcium foszfátok olyan ásványi anyagok, melyek kalcium kationokból és foszfát anionokból állnak. Az emberi szervezetben található csontban közel 60%-ban van, így abban a legnagyobb százalékkal előforduló szervetlen anyag. A kalcium foszfát jelenlétét a csontban 1769-ben fedezték fel, és az 1900-as évektől indultak meg a szintetikus előállítással készült formáiknak klinikai alkalmazhatósági vizsgálatai (11-14). Ezek után csont regeneráló használatként való alkalmazhatósága (mint például bevonó anyag, csont cement, vagy scaffold) hamar a figyelem középpontjába került, és bizonyos típusai már kereskedelmi forgalomban is elérhetővé váltak (15-17). Mivel képes feloldódni, és nagy mennyiségben megtalálható szilárd állapotban, így biokompatibilis anyagnak minősül (18), ami azt jelenti, hogy bármilyen formában kerül az emberi szervezetbe, rendszerint nem vált ki gyulladásos- ill. immun reakciót. A kalcium foszfát olyan bioaktív folyamatokat tud befolyásolni, mint a sejt adhézió, proliferáció, vagy oszteoblaszt indukált csontképződés. Ehhez a kalcium foszfát degradációjára és az intra- és extracelluláris ionok felszabadulására van szükség (18). Ez fogja okozni ugyanis a foszfát és kalcium ionok lokális koncentrációjának növekedését, ami stimulálja a csontképződést a kalcium foszfát kristályok felszínén. Emellett befolyásolják az olyan oszteoblaszt differenciálódást jelző markerek kifejeződését, mint a BMP (bone morphogenic protein), OPN (ostepontin), BSP (bone sialoprotein), RunX2 (run-related transcription factor) (19-23), amelyek az extracelluláris mátrix fehérjék adszorpciójának befolyásolásával irányítják a sejt adhéziót és szövet képződést.

A kalcium ionok számos úton befolyásolják a sejteket az emberi szervezetben. A csont mátrix alapját képezik, és nagyrészt a csontban található kalcium foszfát (hidroxiapatit) formában vannak jelen (24). Ezek a kalcium ionok teszik lehetővé a csont mátrix

képződését és érését kalcifikáció útján, valamint a csont regenerációját jelközvetítő molekulaként. A kalcium ion az az ion, mely szabályozza az oszteoklasztok képződését és rezorptív funkcióját is (25,26).

A kalcium ion mellett a foszfát ionok több mint 80%-a a csontban található kalcium foszfát (hidroxiapatit) formában. Foszfát ion szabályozza az IGF-1 (insulin-like growth factor 1) és ERK1,2 (extracellular signal-regulated kinases) útvonalakon az oszteoblaszt differenciációt és az növekedést, és serkenti a BMP2 kifejeződését (27,28). Emellett részt vesz a visszacsatolási útvonalban, mely az oszteoklaszt differenciációt és csont rezorpciót befolyásolja (29,30).

A kalcium foszfát felhasználható bevonó anyagként, ilyen esetben elsősorban sol-gél vagy elektrodepozíció útján implantátumok felszínén, ezzel növelve annak bioaktivitását és gátolva korrózióját (31-34). Másik felhasználási területe a csont defektusok esetén használható kalcium foszfát cementek. Ebben az esetben szintetikus vagy olyan nem szintetikus polimerekben beépítve fordulnak elő, mint az alginát, cellulóz, kollagén. Hasonló anyagokkal scaffoldként is alkalmazható.

A kalcium-foszfát tartalmú anyagok három nagy csoportját különböztethetjük meg: a hidroxiapatit (HA), trikalcium foszfát (β -TCP), és ezen anyagok kombinációja, összefoglaló nevükön: bifázikus alloplast anyagok (biphasic alloplastic materials, BCP).

Bár már 1980-ban megtörténtek az első tanulmányok és klinikai alkalmazások, csak jóval később került a figyelem középpontjába a β -TCP (35-44). Böhner 2020-as cikkében a β -TCP-t az egyik, ha nem a legnagyobb potenciállal bíró csontpótló anyagnak nevezi, melynek népszerűségét a több mint évi 200 tudományos cikk megjelenése is mutatja (9). A β -TCP biológiai tulajdonságainak köszönhetően fő alkalmazási területeként csont regenerációt serkentő anyagként szerepel fogászati és ortopédiai kezeléseknél, illetve olyan gyógyszerek, mint az antibiotikum vagy különböző fehérjék hordozó egységeként lokális felhasználásban (9, 45-51). Fogászati alkalmazását tekintve a csontpótlás mellett találkozhatunk vele gyökércsatorna tömésekor alkalmazott "sealer" összetevőjeként (52), implantátumok bevonó anyagaként (53), pulpotómiához vagy remineralizációhoz (például fogkrémek) használt anyagként (54-63), pulpasapkázó anyagként (64-69), perforáció kezelésekor (70,71), valamint fogszabályozásban alkalmazott ragasztó cementként, aminek bizonyított szerepe van a gyűrűk és bracketek körüli terület védelmében a szuvaszággal szemben (72). Szintén fogszabályozásban megjelent

különlegességét mutatja a kalcium foszfátból készült bracket (Hialyne, Tomy International Inc., Tokyo, Japán), melynek keménysége megegyezik a zománccal, így megszünteti a hagyományos zafír bracketeknél fellépő abrázíós hatást az antagonista fogakon (73-75). A leggyakrabban azonban a β -TCP csontpótló graftként való elterjedése figyelhető meg (4.ábra, 76), melynek háttérében az anyag összeokonduktív, osseointuktív tulajdonságai mellett a sejt-mediált rezorpció áll (9).



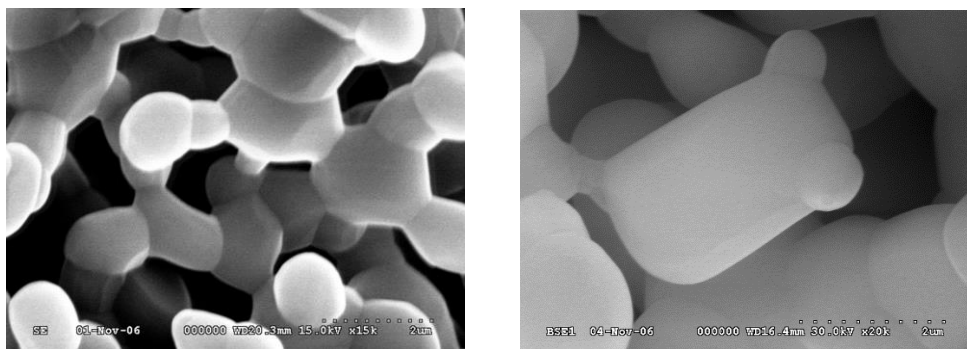
4.ábra

Kortikotómia csontpótlással és fogszabályozással

Az alveoláris csonton végzett kortikotómia első leírója Köle volt (77) 1959-ben, és ennek módosított változatát a PAOO-t (Periodontal Accelerated Osteogenic Orthodontics) vagy AOO-t (Accelerated Osteogenic Orthodontics) Wilco nevéhez köthetjük (78,79). Ennek az eljárásnak az alapja, hogy a kortikotómia csontpótlással és azt követő azonnali fogszabályozással, vagyis fogmozgatással van kiegészítve. A kortikotómiának köszönhető könnyített fogmozgatás nagyobb mértékben hozzájárul a csontátépülés stimulálásához, mintha csak önmagában kortikotómiát alkalmaznánk (80-84). Ennek eredménye a szélesebb alveoláris csont átmérő, stabil fogmozgatási végeredmény rövidebb kezelési idővel, periodontális komplikációk minimalizálásával (76, 80, 85-89).

Alberkston 2001-es közleményének leírása alapján az osseointukció az a folyamat, mely során oszteogenezis indukálódik. Pluripotens, éretlen sejtek valamilyen úton pre-

oszteoblasztokká differenciálódnak. Minden csont gyógyulási folyamatnál megfigyelhető jelenség, például töréseknél (90). Mivel a fiziológias folyadékok túltelítettek 7,4-es pH-n a hidroxiapatitra nézve (91,92), ezért bármilyen idegen anyag beültetése, mint akár a β -TCP, képes triggerelni az apatit kristályok magképződését (pl. a fém felszínén), így csökkentve a kalcium és foszfát ionok lokális koncentrációját. Amennyiben ez a reakció nagy térfogatra nézve történik, úgy Bohnen és Miron (93) kutatásai szerint a kalcium és foszfát koncentráció olyan mértékű csökkenést eredményez, mely elég nagy ahhoz, hogy ezen területen befolyásolja a sejtek jelenlétét.



5.ábra
 β -TCP pásztázó elektron mikroszkópos képen

Az összeokondukció Alberkston megfogalmazása szerint az, amikor csont nő a felszínen. Tipikus példája az implantátumok felületén keletkező csontok esetén (90). Bár a β -TCP összeokonduktív, de mivel egyes kutatások leírása szerint nem volt hidroxiapatit réteg a csont és a β -TCP felszíne között (94-96), így nem nevezhető a hagyományos értelemben vett bioaktív anyagnak. Bioaktív anyagnak nevezzük az anyag azon tulajdonságát, mely szerint az képes spontán mineralizációra fiziológias körülmények között (9). A β -TCP összeokonduktív tulajdonságát és annak leírását 1993-ban Kitsugi és munkatársai közzölték, ahol szignifikánsan nagyobb csontosodást mutattak β -TCP esetén 10 héttel az implantációt követően, mint a hidroxiapatit esetén (96).

Az összeintegráció jelenségét Brånemark (97) és munkatársai írták le elsőként, hivatalos definícióját azonban Alberkston és munkatársai közzölték, mely szerint az összeintegráció egy direkt, közvetlen kontakt az élő csont és az implantátum között (98). Másik hisztológiai megfogalmazásában a “Dorland’s Illustrated Medical Dictionary” (99)

alapján az implantátum egy direkt lehorgonyzása az implantátum felszínén keletkező csont segítségével, fibrózus szövet nélkül.

A β -TCP oszeoinduktív és oszeokunduktív tulajdonságai mellett a harmadik biológiai jellemzője az úgynevezett sejt-közvetített rezorpció. Az emberi szervezetben úgy vannak jelen a fiziológiás folyadékok, hogy azok egyensúlyban vannak az OCP-vel (osteocalcium phosphate) vagy DCPD-vel (dicalcium phosphate dihydrate). Mivel a β -TCP kevésbé oldékony, mint ez utóbbi kettő, így a β -TCP oldhatalan, fiziológiás körülmények között (pH 7,4). Bár a β -TCP nem oldódik fel az implantáció esetében, de felszívódik egy makrofágokat és többmagvú óriássejteket (MNGC, multinucleated giant cells,) tartalmazó sejt-közvetített folyamatban. Az MNGC sejtek a β -TCP kristály felszínéhez tapadva megnyitják membránjaikat és savakat szekretálva csökkentik a pH értékét 3-4-re. Mivel a β -TCP oldékonysága növekszik a pH érték csökkenésével, így lokálisan kioldódik. Ezek a MNGC sejtek nemcsak a β -TCP felszínét támadják meg, de fagocitálják a folyamat során kiszorult β -TCP szemcséket. Ennek a sejt-közvetített rezorpciónak és az oszeokonduktivitás kombinációjának eredménye lesz egy feltűnően gyors oszeotranszdukció a β -TCP scaffoldból trabekuláris struktúrává, mely során a “felesleges” β -TCP anyagot MNGC sejtek távolítják el gyors ütemben (9).

Általános jellemzőit tekintve a tiszta β -TCP egy törékeny, fehér szilárd anyag. Mangán (Mn) tartalom esetén színe rózsaszínre, króm (Cr) esetén zöldre, réz esetén kékre változik. Kalcium foszfát vagy kalcium hiányos hidroxipatit 650-750 °C fokos termikus átalakítása után “high-temperature phase”, azaz magas termikus fázisú anyag keletkezik (42,100-110). Kristályszerkezetében egy β -TCP egység 63 Ca atomot és 42 PO₄ csoportot tartalmaz (9). Szintézise a termikus átalakítás mellett történhet “solid state reaction” vagy olyan szerves közegben kicsapódva, mint például etilén glikol, vagy metanol (5.ábra) (111-116).

2.2. Az aerogél

A β -TCP nem csak önállóan, hanem más anyagokkal, anyagcsoportokkal együtt is alkalmazásra kerülhet csontpótlás esetén, melyek egyike az aerogél.

Az aerogélek elnevezés a gélekben található folyadék helyét gázzal kitöltött üres térfogatokra utal (117). Az első aerogélt egy amerikai vegyészmérnök, S.S. Kistler (6. ábra) állította elő 1931-ben (118). Az aerogélek felfedezésének alapját azon specialitás adta, hogy szuperkritikus körülmények között szárította ki a nedves géleket. Fémoxidokból, cellulózból, zselatinból, agarózból és nátrium-szilikátból megalkotott aerogélek előállításáról több publikációt is közölt (118, 119). Kutatásai során használt szilika aerogél 2013-ig a világ legkisebb sűrűségű szilárd anyagaként szerepelt a Guinness Rekordok könyvében (120).



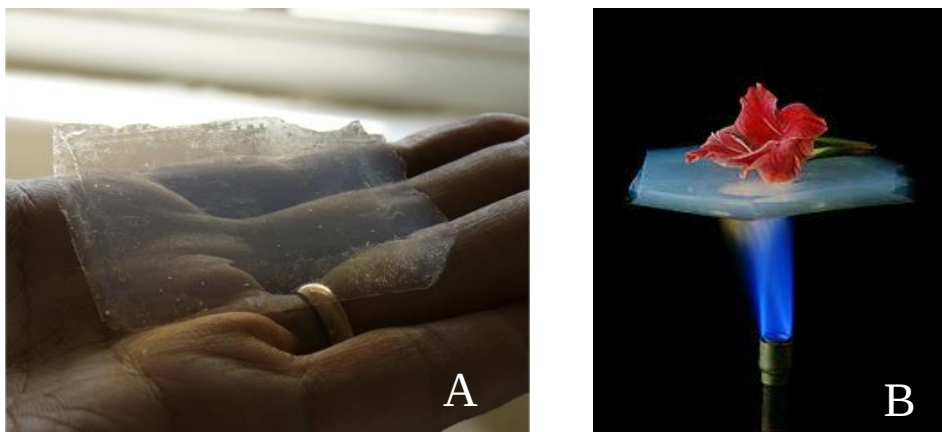
6. ábra

S.S. Kistler, az aerogél feltalálója (<https://hu.wikipedia.org/wiki/Aerogél>)

Nedvességre érzékeny, kis sűrűségű, nagyon jó hőszigetelő (7. ábra), légiesen könnyed anyag, de legkülönlegesebb tulajdonságát mezoporózus szerkezete adja, mely speciális felszíni tulajdonságot (600-1200 m²/g fajlagos felület) ad a törékeny anyagnak (121-123). Az aerogél előállítása során egy metanolt, tetra-metoxi-szilánt, ammónia oldatot és cellulóz összetevőket tartalmazó oldat készül, mely körülbelül 30 perc alatt alkogéllé szilárdul szobahőmérsékleten. Egy autoklávozás során úgynevezett “supercritical drying” típusú szárítást követően aerogél keletkezik, mely végső formáját az ezután kemencében történő 500-1000⁰C fokon végzett kiégetés adja meg (124).

Így készülhetnek por vagy tömb formában (monolitikus) is aerogélek, melyek bár önmagukhoz viszonyítva nagy nyomószilárdsággal bírnak, de szilikát alapjuknak köszönhetően rigidek, így könnyen szétmorzsolódnak. Ezen hátrányos mechanikai tulajdonságuk és nedvesség érzékenységük miatt az aerogélek felhasználhatósága nem

volt népszerű. Az 1970-1980-as években először hőszigetelő anyagként kezdett teret hódítani az aerogél (125-128), de a legnagyobb áttörést az üveglapokból álló vákuumpanelekben elhelyezett aerogélek jelentették (129).



7.ábra

(A) Laborunkban készült alkogél (B) Aerogél hőszigetelő képességét mutató ábra Bunsen-égő felett aerogélen elhelyezett virággal (<https://hu.wikipedia.org/wiki/Aerogél>)

Szintén ezen előnyös tulajdonságának köszönhetően később az úrkutatásban is megjelentek az aerogélek, és további szerves funkcionális csoportokkal való funkcionálásuknak eredményeképp sikerült az anyag hidrofóbicitását és mechanikai tulajdonságát is megváltoztatni, így még nagyobb felhasználhatóságot és teret adva az aerogéleknek: enzim hordozók (pl. lipáz rögzítése), adszorbensek (szennyvíztisztítás, CO₂ megkötés) (130-136), az anyag sokoldalúságának köszönhetően az orvostudományban való felhasználhatóságuk is egyre több irodalomban megtalálható (137,138), mint például gyógyszer hordozó és felszabadító közeg, szövetregeneráló vagy szövethelyettesítő (graft, implant) anyag (139-143).

Köztudott, hogy a csontképződéshez körülbelül 300 mikrométer nagyságú pórusok ideálisak (144-149). A szol-gél technológia (templated moulding) megfelelő formázással vagy maratással (milling process) kombinálva, lehetővé teszi megfelelően nagy méretű pórusok kialakítását, illetve az aerogél minta alakjának meghatározását. A szilika aerogél

bázisú β -TCP végső denzitását és mechanikai keménységét elérvén egy igazán sokoldalú, univerzálisan felhasználható anyag állítható elő.

A pórusméret nagysága kiemelkedően fontos a csontgyógyulás szempontjából, mivel az ezáltal megnövekedett felszín nagysága hozzájárul a csontgyógyulás folyamatához, átjárhatóságok biztosítva a fehérjék és más ionok számára, ezzel segítve az apatit képződést (150-154). Kalcium foszfátok esetében a megfelelő pórus méret eléréséhez egy speciális eljárási módszert használnak, mely során az anyagot egy megfelelő porozitású porózus sablonba abszorbeálják, majd szilárd halmazállapotú anyaggá szárítják, ezt követően a sablon szinterezés következik, amíg az el nem ég, meghagyva a kívánt pórusméretet (150). Woodard és mtsai. eredményei alapján mikro pórusokkal rendelkező CaP anyagok esetén jobb összeokonduktivitást mértek makropórusok, vagy vegyes pórusméretekhez képest.

Egy másik sajátos előnyös tulajdonsága a β -TCP aerogelnek más szintetikus csontpótló anyagokkal szemben, az aerogel nyitott, átjárható pórus rendszere. Permeábilis kisebb molekulák, mint az oxigén vagy mint egyéb tápanyagok számára, ezáltal biztosítva eleven, élő környezetet a sejtek növekedésének, osztódásának. Habár a β -TCP-AE aktív komponense a β -TCP, a szilika mátrixnak a bázis funkciója mellett egyéb fontos szerepe van, a vízőldékony szilikátok I. típusú kollagén szintézisében betöltött funkciója révén (155-157). A szilika aerogel vízőldékonyága sokkal magasabb, mint a kristályos szilika formájában lenne. Élő szervezetben használva ezt az új anyagot, talán ezen tulajdonságának köszönhetően hozzájárulhatunk a megfelelő szilikát koncentrációhoz, ezzel segítve az I. típusú kollagén szintézisét, így gyorsítva az új csont képződését.

2.3. A keményszövet csiszolatok és készítésének sajátosságai

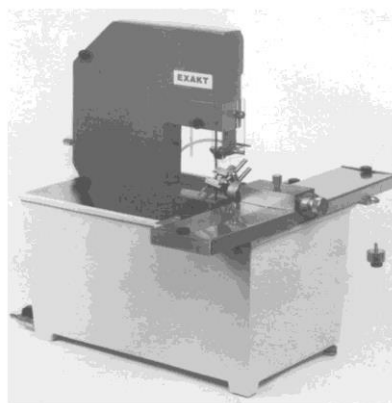
Az új csontpótló anyagrendszerek, vagy például a titán implantátumok összeintegrációjának követésénél nagy jelentősége van az in vivo vizsgálatoknak. Ezen munkák kiértékelését sok esetben csak sajátos technikákkal lehetséges elvégezni, melyek egyike a keményszövet csiszolatok készítése.

Mind az orvostudományban, mind a fogászatban fontos szerepe lehet a dekalcifikálás nélküli keményszövet csiszolat készítésének, vizsgálatának. Olyan speciális célokra

használhatók ezen metszetek hisztopatológiai kiértékelése, mint a különböző csontpótló anyagok átalakulásának időbeli nyomonkövetése, vagy a fogászatban használatos fogászati implantátumok osseointegrációjának kísérése.

A hagyományos szövettani csont-metszet készítés során formalin-fixálást követően a dekalcifikált minta paraffinba ágyazás után egy hagyományos mikrotómmal kerül szeletelésre. A mikrotóm precíziós beállításának köszönhetően 5-6 μm vastagságú metszetek készülnek a mintából, melyek rétegvastagságukat tekintve további redukálás nélkül, festéssel lesznek alkalmasak a szövettani mikroszkópos kiértékelésre. Bizonyos csontpótló anyagok mechanikai tulajdonsága miatt, illetve fogászati implantátumok esetében ezen hagyományos módszer útján nem kivitelezhető a metszetkészítés, mivel a hagyományos mikrotóm ezen anyagokat nem képes szeletelni.

A fémeket tartalmazó dekalcinálás nélküli keményszövetből készülő metszetek feldolgozhatósági problémájának megoldását elsőként 1977-ben Strunz és Gross végezték. Ők írták le elsőként, hogy az amalgám tömést tartalmazó, vagy koronázott fogak vagy fémeket tartalmazó csont szövetek esetén a hagyományos szövettani metszetkészítési eljárás nem kivitelezhető. Kifejlesztettek egy olyan módszert, amivel dekalcinálás nélküli keményszövetet tudtak vágni 50-200 mikron vastagságban, felszíni festést alkalmazva rajta- vagyis a mélyebb rétegek nem voltak festve (158). A módszerrel 1985-ben K. Donath foglalkozott részletesen, amikor elsőként említette a keményszövet mikrotóm

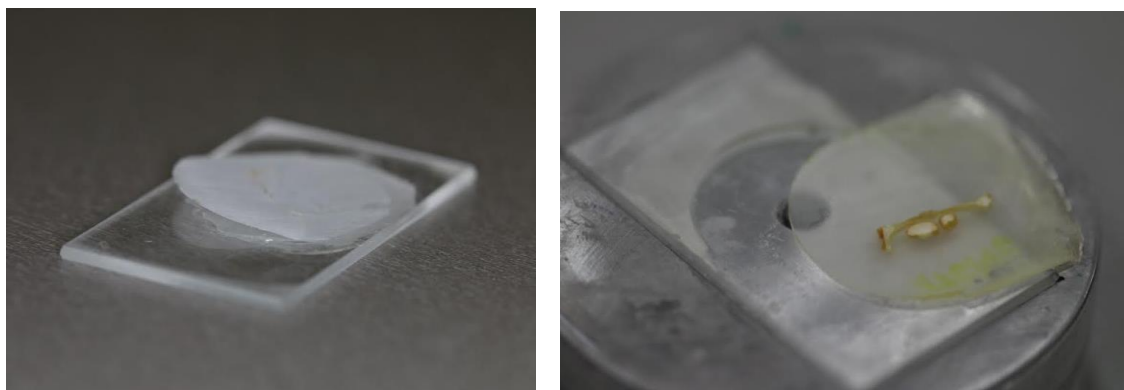


8.ábra
Keményszövet mikrotóm (K. Donath)

használatát, mely a fém, vagyis az implantátum vagy más kemény anyag szeletelésére is képes (8. ábra) (159). Az ilyen kemény anyagokból, melyek hagyományos mikrotómmal nem szeletelhetők, csak ezen speciális módszerrel készíthető szövettanilag értékelhető metszet. Mégis, technikailag ezzel a módszerrel nehéz 10 μm -nél nem vastagabb töredezés-mentes metszeteket készíteni különösen az implantátum-csont határról, mely szükséges ahhoz, hogy egy-sejt szinten tanulmányozzuk fénymikroszkóp alatt a celluláris csontstruktúra és implantátum viszonyát (egy sejt átlagos mérete ugyanis kb. 10 μm). Implantátumot, kemény csontpótló anyagokat tartalmazó minták esetében azonban ez a régió in situ módon nem vizsgálható hagyományos mikrotómmal, mivel a mintát az nem képes metszeni. Amennyiben keményszövet mikrotóm nem áll rendelkezésre, dekalcinálás nélküli csiszolat is készíthető a mintából, melynek során a mésztartalom megmarad, így a kemény szövetek teljes extracelluláris anyaga, struktúrája is, ezért egy szövettanilag jobban értékelhető metszet, vagyis csiszolat lesz az eredmény, melyben a mésztartalom a valóságos viszonyokat fogja tükrözni. A fogászati implantátumok hisztomorfológiai analitikai technikáit WL Chai foglalta össze 2009-ben (160), mely szerint a beültetett implantátumok vizsgálata történhet a csontszövetből eltávolítva, vagy azzal együtt is. Ez utóbbi eljárás során mind az implantátumot, mind a környező csontot illetve kötőszövetet tartalmazó szövettani metszetek készíthetők mikroszkópos vizsgálatra, amennyiben vékony csiszolatok készülnek.

A vékony csiszolat megnevezés a módszer eljárásából ered. A keményszövet mikrotóm vágása során 1 mm vastagságú szeletek keletkeznek, melyeket tárgylemezre rögzítve majd egymást követően mindkét felszínét csiszolva készülnek a minták, míg megfelelő rétegvastagságú és polírozott felszíne lesz, vagyis a szövettanilag értékelhető 10 mikron vastagság alá kerül a csiszolat. Jelen PhD tézis alapjául szolgáló állatkísérletes munkánkban magunk is próbálkoztunk csiszolat-metszetek készítésével a szövettani munkák során, azonban a lentebb említett technikai problémák miatt az időnként nehézségekbe ütközött.

A csiszolás közben fellépő erők hatására a minta egésze vagy egy darabja könnyen leszakadhat a tárgylemezről (9. ábra). Ennek kiküszöbölésére különböző adhezív anyagok használata szükséges, hogy megfelelő rögzítést biztosítson a csiszolás közben, de ne befolyásolja a patológiai kiértékelést.



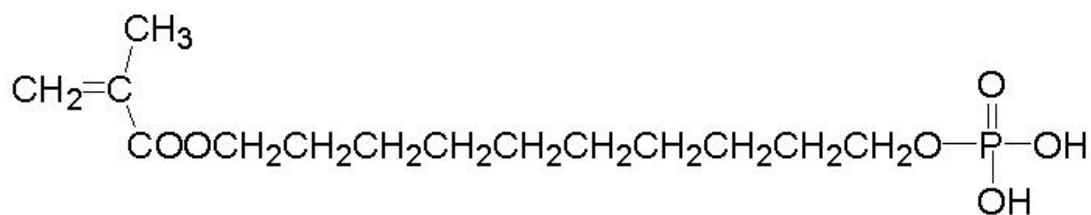
9.ábra

Keményszövet készítés közben tárgylemezepről levált minta

A fogászati adhezívek 2011 óta vannak a klinikai gyakorlatban. Ezek a több komponensből álló rendszerek olyan monomereket tartalmaznak, melyek segítik a kémiai és mikromechanikai kötődést a fogszövethez. Ezen monomerek egyik leggyakrabban alkalmazott formája karboxilát és/ vagy foszfát csoportot tartalmaz, mely a hidroxiapatitban található kalcium ionhoz ionos kötéssel kapcsolódva növeli a kötődés hatékonyságának mértékét (161).

Az adhezívekben másik gyakran alkalmazott komponense a 10-metakril-oxidecildihidrogén foszfát (10-MDP, vagy röviden MDP). Ez a nem-hidrolitikus, polár funkcionális monomer képes az apatithez vagy dentinhez, kollagénhez, fémhez vagy cirkóniumhoz kötődni. Több kutatás is vizsgálta a 10-MDP kémiai kötődését titán felszínhez, kerámiákhoz és fog szövetekhez. Ezen kutatások leírták, hogy a 10-MDP monomer egy erős és stabil kémiai kötést tud létesíteni a csontban, dentinbenben vagy zománcban található apatittal (162,163). A 10- MDP egy bifunkcionális monomer: egyik végén hidrofil foszfát csoportot, míg másik végén egy telítetlen szén kettős kötésből álló csoportot tartalmaz, amely egy hidrofób CH- lánchoz kötődik (10.ábra).

A foszfát csoport a hidroxiapatit kalcium ionjával egy stabil kalcium foszfát sóhoz hoz létre (164). A másik fotopolimerizálható oldala a gyanta-alapú cement vagy gyanta-alapú kompozit komponenseivel képes reakcióba lépni az anyag megvilágítása közben.



10.ábra

10-MDP képlete

(<https://en.wikipedia.org/wiki/10-Methacryloyloxydecyl-dihydrogen-phosphate>)

A keményszövet csiszolatok tartalmazhatnak fémet (implantátum), csontot, különböző csontpótló anyagokat és a beágyazó anyagot, rendszerint epoxi gyantát. Ezen anyagok mindegyikének olyan erős kötással kell rögzülnie a tárgylemezehez, hogy ellenáljon a csiszolás közben fellépő erőknek és végül egy hisztopatológiai értékelhető metszetet eredményezzen.

Az anyagtannal foglalkozó kutatók folyamatos kihívás elé néznek, hogy olyan újabb és újabb biokompatibilis szintetikus csont-graftként használható oszeoinduktív vagy oszteokonduktív anyagokat állítsanak elő más-más fizikokémiai és biológiai tulajdonságokkal, melyek a testre szabott precíziós rekonstruktív csontreparációhoz a leginkább alkalmas. Ezek mindegyike fiziko-kémiai karakterizálás után *in vitro* sejtbiológiai és toxikológiai tesztelésen esik át, majd ezt követően a legalkalmasabb anyagok *in vivo* állatkísérletes modellekben vizsgálhatók, hogy megállapítsuk: milyen biológiai tulajdonsággal bír, eléri-e a kívánt csontpótló, ill. oszeoinduktív hatást egy élő szervezeten belül is.

Saját munkákban új csontpótló anyagként alkalmazható rendszerekben vizsgáltunk (165), illetve ezen rendszerek szövettani vizsgálatához készülő vékony csiszolatok készítési módszerét végeztül el (166).

2.4. Célkitűzések

A 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-trikálcium-foszfát 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) minták 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. Titán 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.

3. Anyagok és módszerek

3.1.1. Aerogél előállítás

Az aerogél előállítása során elsőként egy 45.0 mL (1.112 mol) metanolt, 8.00 mL (0.444 mol) desztillált vizet, 15.00 mL (0.113 mol) hígított ammónia oldatot (10.0 mL 25%-os ammónia oldat 10.0 mL vízzel való hígítása 1:1 arányban) és 30.0 mL (0.1 mol) hígított urea oldatot (10.0 g urea 50.0 mL metanolban oldva) tartalmazó oldatot készítettünk, melynek neve "A" minta. A "B" nevű minta 35.0 mL (0.865 mol) metanolt, 15.0 mL (0.102 mol) tetra-metoxi-szilánt, és 55.00 g cellulózt tartalmazott az "A" minta összetevői mellett. A β -TCP tartalmú aerogél előállításához emellett még 5.00 g (0.0161 mol) β -TCP-t adtunk az oldathoz. Minden komponenst aktív keverés mellett elegyítettünk.

Az így keletkezett folyadék addig kevertük, míg egy viszkozus, de még nem gél halmazállapotot ért el. Ekkor egy cilindrikus műanyag formába öntve (66 x 28 mm), a tetejét parafilmmel lezárva, szobahőmérsékleten hagyva alakult át gél halmazállapotú anyaggá, alkogéllé egy éjszaka után.

Ezután a metanolt több lépésben acetonnal váltva végül az alkogél egy bőséges (2 L) tiszta acetonnal volt 3 napig, amit a szuperkritikus szárítás követett (124, 167, 168).

Az aerogél kompozit monolitokat egy programozható hőmérsékletű kályhában kalcifikáltuk (Wise Therm FHP 12, Korea), hogy megőrizze mechanikai ellenállóképességüket. Első lépésben nyolc óra alatt kiégetésre kerültek a porogén cellulóz és organikus molekulák 500°C fokon. Ezután 600°C fokra emelve a hőmérsékletet folytatódott a kiégetés, és ezt további 100°C fokos hőmérséklet emelkedések követték 3 óránként, hatvan percig tartva az elért hőfokot, köztük spontán szobahőmérsékletű lehülési fázisokkal. Kiégetést követően a minták súlyának, formájának és denzitásának adatai rögzítésre kerültek.

3.1.2. Az aerogél jellemzői

A kalcifikálódott mintákat mozsárban történő aprítás után vákum nitrogén gáz adszorpció/deszorpció poroziméter vizsgálatokat végeztünk (Quantachrome Nova 2200, Quantachrome Instrument, Boynton Beach, FL, U.S.A.).

A pásztázó elektron mikroszkópos (PEM) mérések Hitachi S-4300 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japán) készülékkel kerültek rögzítésre Bruker energia diszperz spektrométerrel (Bruker Corporation, Billerica, Ma, U.S.A.).

3.1.3. In vitro vizsgálatok

A SAOS-2 sejteket (ATCC, USA) 10% főtális szarvasmarha szérummal, 1% antibiotikus-gombaellenes oldattal és 1% Glutamax-szal (Gibco, USA.) kiegészített Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ban (DMEM, Sigma, USA.) tenyésztettük 37 °C fokon 5% CO₂ tartalmú inkubátorban. A konfluencia elérése után a sejteket tripszinezttük, majd 2x10⁴/cm² sejtet tettünk ki 24-lyukú sejtenyésztő lemezekre (Nunc, Dánia). A sejtek letapadása után a sejtenyésztő folyadékot (culture medium, CM) friss tápfolyadékra cseréltük, amely 0,2 mg/ml örölt 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.

3.1.3.1. Életképesség (viabilitás) és citotoxicitás mérések

A sejtek életképességének és az anyag citotoxicitásának vizsgálatát alamarBlue Cell Viability Reagenssel (Invitrogen, USA) végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. Röviden leírva, a DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, USA) tenyésztő médiumban tízszeresére hígított alamarBlue (Invitrogen, USA) reagenst mértünk a sejtekre, majd 2 órán át 37 °C fokon inkubáltuk. Az inkubálás után 200-200 µl minta fluoreszcenciáját mértük (gerjesztés 544 nm, elnyelés 595 nm) Hidex Sense microplate olvasó segítségével (Hidex, Finnország).

3.1.3.2. Alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitásának vizsgálata

A sejteket PBS-el mostuk, majd lízis pufferben (10 mM Tris-HCl pH7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% PIC, 1% PMSF) lizáltuk. A lizátumokból 10000 g-n 4°C fokon tíz percen át tartó centrifugálással távolítottuk el a sejttörmeléket (Centrifuge

5810 R, Eppendorf, Németország). A felülúszót egy másik mikrocentrifuga csőbe mértük át, majd a sejtlizátumnak megfelelő felülúszót 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.

3.1.3.3. 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 ΔC_p módszerrel számítottuk ki.

3.1.4. In vivo vizsgálatok

Az in vivo kísérlet során az összeintegrációt patkányokba helyezett AE és β -TCP-AE minták, a “calvaria critical size defect model” alapján vizsgáltuk. Az állatkísérletek a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság jóváhagyása alatt történtek (7-M/15/DE MÁB). A kísérletek során huszonkilenc felnőtt, 250-300 g súlyú hím Wistar patkányt használtunk, melyeket standard tápon tartottunk. Érzéstelenítésük intraperitoneális ketamin (CP-Ketamin 10%, Produlab Pharma B.V., Raamsdonksveer, Hollandia) és xylazine (Xylazine 2%, CP-Pharma, Burgdorf, Németország) 2:1 arányú dózisban adott injekcióval történt (0,5-0,55 ml/patkány). A „calvaria critical size defect” műtét Spicer és mtsai által a Nature Protocolban közöltek alapján történt (169). Röviden: a koponyabőrt és a vetületébe eső izomzatot, valamint a perioszteumot érintő mediánszigitális 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, folyamatos fiziológiás sóoldattal történő öblítés mellett, 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 fel. Ezt követően réteges sebzés történt. Egy-, három- és hat hónap után mindhárom csoportból (kontroll; AE; β -TCP-AE) 3-3 állat érintett koponyacsontját dolgoztuk fel, szövettani vizsgálat céljából. Miután a 6 hónapos csoport eredményei jelen PhD tézis alapjául szolgáló első közleménybe még nem kerültek be, ennek adatai csupán a Megbeszélés fejezetben kerülnek röviden leírásra, mint közlés előtt álló prospektív munka előzetes eredményei.

3.1.5. Hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

Egy-, három (és hat) hónappal később a csontdefektust tartalmazó kontroll vagy aerogéllal, ill. β -TCP-aerogéllal kezelt szövet mintákat 10%-os pufferezett formalinban fixáltuk (pH 7,4), melyekből csoportokként 3-3 mintát 4%-os EDTA (etilén-diamin-tetraacetát) oldatban dekalcináltuk. Paraffinba ágyazás után a megfelelően orientált mészcsoökkentett (hagyományos módszerrel metszhetően puha) csontszövetekből mikrotóm segítségével 5-6 μ m vastag sorozat metszeteket készítettünk. Deparaffinálás és rehidráció után a metszetek egy részén hematoxin-eosin (HE) és van Gieson festéseket végeztünk a rutin patológiában megszokott módon és ahogy korábban az leírásra került (170). Lépcsőzetes metszésekkel előállított van Gieson festett metszeteken a defektusban talált kalcifikáció illetve újdonszövet mennyiségét szemikvantitatív módon becsültük meg.

Emellett peroxidáz-bázisú immunhisztokémiai reakciókat (IH) is végeztünk citrát pufferben (pH 6,0) magas hőfokon történt antigén-feltárt metszeteken. Itt elsősorban a csontdefektusokban várható újdonszövet kialakulásában fontos szerepet játszó aktív oszteoblasztok szöveti jelenlétének detekciója volt a cél, melyhez a Ki-67 nevű proliferációs márkert használtuk, ami a proliferáló, aktív sejtciklusban lévő celluláris elemek sejtmagjait képes jelölni. Ennek megfelelően primer antitestként nyúl monoklonális Ki-67 nukleáris fehérje ellenes antitestet használtunk (Abcam, Egyesült Királyság) a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Röviden, a fenti primer antitesttel történt inkubáció majd háromszori TRIS pufferben (pH 7,3) történt öblítés után a metszeteket peroxidáz-jelölt anti-nyúl immunglobulinnal kezeltük és VIP kromogénnel

hívtuk elő (Vector Labs, Egyesült Királyság), hogy a pozitíven jelölt sejtek fénymikroszkóp alatt láthatóvá váljanak. A csontdefektusokból készült különböző módon megfestett hisztológiai és immunhisztokémiai metszeteket digitalizáltuk „Panoramic MIDI” digitális metszet-szkennerben (3D-Histech-Zeiss, Budapest), melyben computer-vezérelt Hitachi 3CCD progresszív színes kamera végezte a virtuális (digitalizált) metszet készítést. Az összehasonlító képanalízis a HistoQuant nevű „Panoramic Viewer software 1.15.2” (3D-Histech) applikációval történt, ahogy korábbi publikációnkban az leírásra került (171). A fotó-dokumentáció rögzítése Mirax Viewer számítógépes applikációval a virtuális (digitalizált) metszetekből, esetenként Leica DM2500 mikroszkópon keresztül történt.

3.2.1. Próbatetek és minták előkészítése

Munkánkban a dekalcinálás nélkül készülő szövettani minták három anyagának megfelelően készültek epoxi, csont és titán korongok (átmérő: 5,3 mm, magasság: 2 mm).

Az epoxygyanta korongok az EpoFix gyanta és Epofix térhálósító (EpoFix Kit, Struers, Ballerup, Dánia) összekeveréséből származó keverék, melynek polimerizációja cilindrikus öntőformákba öntve történt CitoVac vákum gépben (Struers, Dánia).

A csont korongok a fent leírt módon előállított epoxigyantába ágyazott marha combcsont kortikális részéből lettek előkészítve.

A titán korongok előkészítése során, az argon atmoszféra alatt történő előállításukat követően, a korongok Struers LaboPol 35 (Dánia) csiszológépen políroztuk, vízhűtés mellett, különböző finomságú szilícium szemcsés csiszoló papírokkal (#500, #1000, #1200, #2400, #4000). A polírozás utolsó lépése egy 3 µm gyémánt szemcsés bevonatú textil polírkorong. A polírozás során keletkezett abrazív részecskék eltávolításához egy ultrahangos fürdőt használtunk.

A megfelelő méretű korongok előállításához a cilindrikus (hengeres) öntőcsészében vákumban polimerizált epoxigyanta és epoxigyantába ágyazott csont mintákból 5,3 mm-es átmérőjű furatokat alakítottunk ki trepán fúróval vízhűtés mellett fogászati kezelőegység mellett. Ezt követően 2 mm-es vastagságú szeleteket vágunk a keményszövet mikrotómmal (Leitz 1600, Nussloch, Germany), vízhűtés mellett.

A tárgylemezként használt üvegből (Thermo Scientific Menzel Gläser LOT#8501777) 13 x 25 mm-es nagyságú darabokat vágtunk. A vágás előtt a kémiai-mikromechanikai adhézió növelésének céljából az üveg felületét homokfújással kezeltük 50 µm nagyságú Al_2O_3 részecskékkel, 7 bar nyomáson, 30 másodpercen keresztül, 1 cm távolságból. Homokfújást követően az üvegek tisztítása ultrahangos fürdőben történt vízben és acetonban 3 x 10 percig tartó szonikálással, majd olajmentes levegővel szárítva.

3.2.2. Alkalmazott adhezívek és gyanta mátrix bemutatása

Az epoxigyanta, csont és titán korongok üveg felszínhez való rögzítésére két különböző adhezív anyagot alkalmaztunk. Az egyik, a hétköznapi gyakorlatban használt 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 10-MDP tartalmú adhezív etanolban és BisGMA: UDMA: TEGDMA keverékében. A második adhezív egy gyantát és fotoiniciátort tartalmazó ragasztó. Mindezt szendvics szerkezetben használva a metszetalkotók 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 üvegfelszín ideális savas maratási idejét egy előkísérlet során határoztuk meg. 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, sötétben. Az áztatást követően desztillált vizes mosás és szárítás következett. A matt üvegfelszínre és az epoxigyanta korongra is az MDP tartalmú bond került első réteggént, majd mind az epoxigyanta, mind az üveg felszínén második réteggént fotopolimerizálható gyanta került felvitelre. Az epoxigyanta korongot az üveg felszínére ráfordítva egy szorító berendezésbe helyeztük,

az adhezív rétegvastagságának egységes eloszlata céljából. A minták rögzítése a befogás alatt 20 másodpercig tartó fogászati kézi polimerizációs lámpa (Bluephase 20i, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein, Ausztria) megvilágításával történt. Ezután a már rögzített epoxigyanta-üveg mintákat egy fény kályhába (Scheu LC-6 Light Oven, Iserlohn, Németország) helyeztük további 5 percig tartó fotopolimerizációra. Az így elkészült mintákon ezután egyből 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 üvegporszuszpenziót 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 őrleményt ultra-tiszta vízzel öblítettük át (3 x 8 ml).

A nem protonált üveg őrlemény szuszpenzió 0.1 g üveg őrlemény diszperziója 0.001 M NaCl tartalmú elektrolitjából készült. A szuszpenziók és az “background” 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 mintát öt alkalommal mértünk le, zéta potenciál számítása Smoluchowski közelítéssel került meghatározásra.

3.2.5. XPS

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 α (E = 1486 eV) anóddal történt. A mérésekhez 1×1 cm-es mintadarabokat vágunk ki, a minták felületeit nitrogén gáz ráfújásával tisztítottuk, 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 vákumban (10^{-7} mbar) hagytuk száradni és kigázosodni.

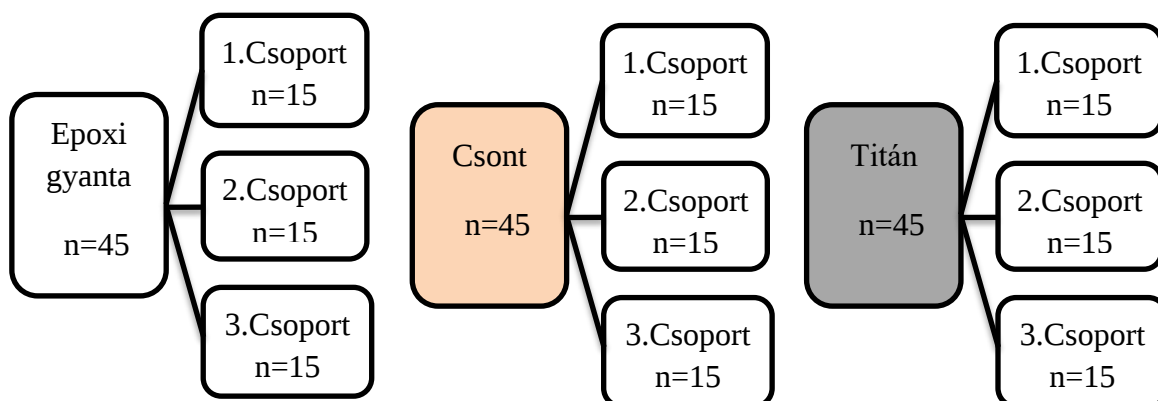
A mérések során a Ca, Na, O, C és Si elemek energia spektrumait rögzítettük, kiértékeléshez a CasaXPS (<http://www.casaxps.com>) programcsomagot alkalmaztuk. Az energia tengely kalibrálása az általánosan elfogadott szén (284,5 eV) csúcshelyzethez történt. A csúcsalakok illesztéséhez Gauss/Lorentz függvényeket 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) tiszta üveg, protonált üveg, epoxi, csont és titán felszíneken. Egy 0,5 mm átmérőjű tű használatával, automata adagoló fecskendő rendszerből 3 µl egységnyi vízcsepp került adagolásra a fent említett különböző felszínre. Az adhezív anyag esetében a 3 µl egység egy 0,3 mm átmérőjű tűből került kézi adagolással ugyanezen felszínre. A kontakt szög értéke a cseppformájához igazított Young-Laplace egyenlet alapján számolt szögértékből határoztuk meg. Az átlagos kontakt szög érték kezeletlen üveg felszín és protonált üveg felszín esetében mért 10 csepp átlagából történt.

3.2.7. Nyírószilárdság meghatározása

A nyírószilárdság méréshez különböző csoportokat alakítottunk ki, a felhasznált adhezív anyag típusa (termoplasztikus, vagy MDP tartalmú) és az üveg felszínének (sima, homokfűjt, protonált) függvényében (11. ábra). Az első csoportban a sima üvegfelszín és termoplasztikus adhezív (1.csoport= TPA), második csoportban homokfűjt üveg felszínen és MDP tartalmú bond gyantával (2.csoport= MDP), harmadik csoportban MDP tartalmú bond gyantával, protonált, homokfűjt üvegfelszínen (3.csoport= PRO-MDP) került alkalmazásra (1. táblázat). Minden csoportban 15 darab csont, 15 darab epoxi és 15 darab titán korong került ragasztásra.



11. ábra

Kutatásunk során alkalmazott különböző anyagból készült korongok felhasználása

Az első csoport esetében a kezeletlen üveg felszínére (n=45) 120 °C fokon felmelegített termoplasztikus adhezívvel került rögzítésre 15 darab csont, 15 darab epoxi és 15 darab titán korong. A minták üvegfelszínre való helyezését követően azokat egyből egy préselő berendezésbe helyeztük, biztosítva az egyenletes ragasztó anyag eloszlását a minta és az üveg között, amíg a termoplasztikus adhezív visszahűlve megszilárdult.

A második csoport esetén a homokfújással felérdesített üveg felszínre (n=45) MDP tartalmú bonddal előkezelt gyantával került ragasztásra 15 darab csont, 15 darab epoxi és 15 darab titán korong. Elsőként az MDP tartalmú bond felvitele és óvatos, levegővel történő szárítása után, második réteggént mind a minta, mind az üveg felszínére gyanta került. Az így ragasztott mintákat a szorító berendezésbe helyezve, kézi fogászati polimerizációs lámpa (Bluephase 20i, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein, Ausztria) használatával 20 másodpercig fotopolimerizáltuk. Ezt követően további 5 percre egy fény kályhába (Scheu LC-6 Light Oven, Iserlohn, Németország) helyezve a mintákat folytatódott a fotopolimerizáció.

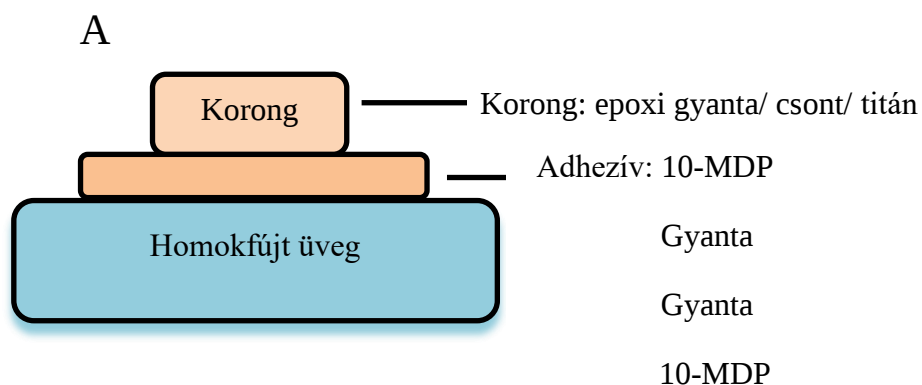
Csoport		Adhezív	Üveg felszín
1. Csoport	TPA	Termoplasztikus adhezív	Kezeletlen
2. Csoport	MDP	MDP + gyanta	Homokfújt
3. Csoport	PRO-MDP	MDP + gyanta	Homokfújt + protonált

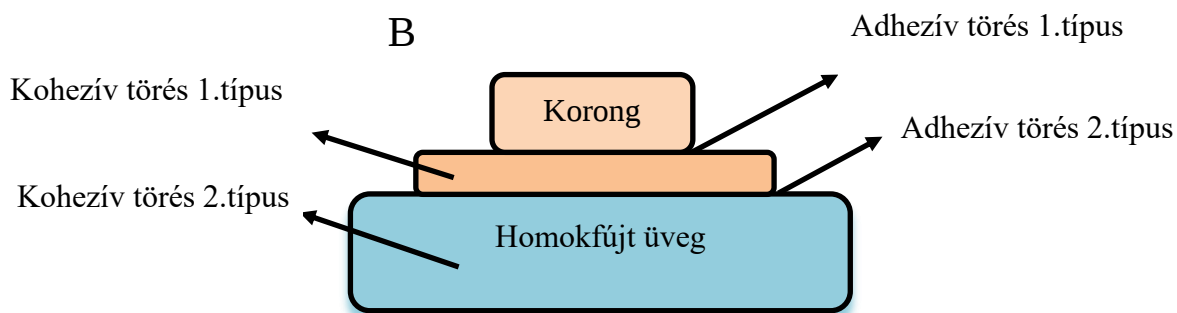
1. táblázat

Nyírószilárdsági méréshez kialakított csoportok. TPA: termoplasztikus adhezív, MDP: 10-metakril-oxidecil-dihidrogén foszfát (10-MDP) tartalmú bond, PRO-MDP: protonált üveg felszín MDP tartalmú bond anyag használatával.

A harmadik csoportban használt előkezelt üveg felszínekre (homokfújás, 3 órán át tartó salétromsavas kezelés, desztillált vizes mosás, levegő szárítás) kerültek a csont (n=15), epoxi (n=15) és titán (n=15) korongok MDP tartalmú bonddal és gyantával ragasztásra, a második csoport esetében ismertetett eljárási módon.

A nyírószilárdság egy mechanikus vizsgálatot végző eszköz (INSTRON 5544, Norwood, USA) segítségével és a mintákhoz egyedileg tervezett apparátus segítségével kerültek mérésre.





12. ábra

(A) Sematikus ábra az alkalmazott adhezív rétegek bemutatására (B) A különböző törési típusok bemutatása

3.2.8. Törési módok vizsgálata

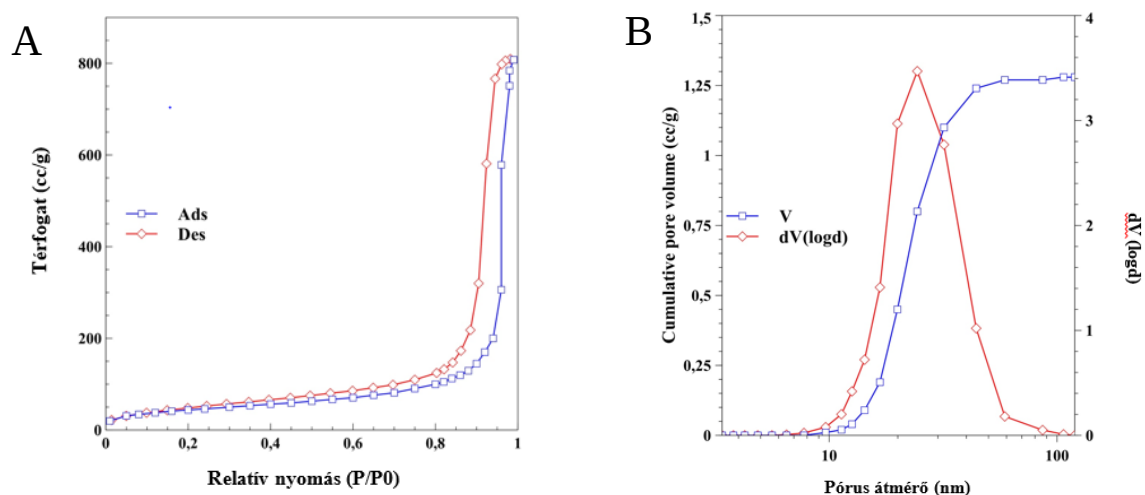
A mintákat alkotó anyagok közötti törési felületek (12. ábra) fénymikroszkópos (Olympus SZ61) vizsgálata 45x nagyítás mellett történt a nyírószilárdság mérését követően. Csoportosításuk az alábbiak szerint történt:

- 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
- Koherens törés 1: adhezív anyagban, anyagból történő leválás
- Koherens törés 2: üvegből történő leválás

4. Eredmények

4.1.1. Szilika aerogél anyagtani jellemzői és porozitása

A szilika aerogél mátrix porozitását nitrogén adszorpciós-deszorpciós poroziméterrel határoztuk meg (13.ábra A). Az eredményként kapott izoterma IV. típusa jellemzően egy mezoporózus szilika anyag jellemzője. A mintákon méretük szerint mind makropórusok, mind mezopórusok jelenléte megfigyelhető volt. A pórusok méretének eloszlását mutató görbe (13.ábra B) Barrett-Joyner-Halenda (BJH) módszerrel került meghatározásra. Az görbe legfőbb vonása, hogy a pórusméretek eloszlása unimodális, és a legtöbbször előforduló pórus méret 25nm. A vizsgált Brunauer-Emmett-Teller felszín nagysága 160.4 m²/g volt, amely magasnak számít más csontpótló anyagokhoz képest.

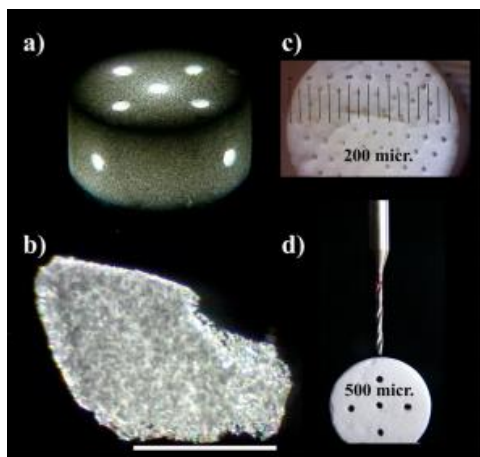


13. ábra

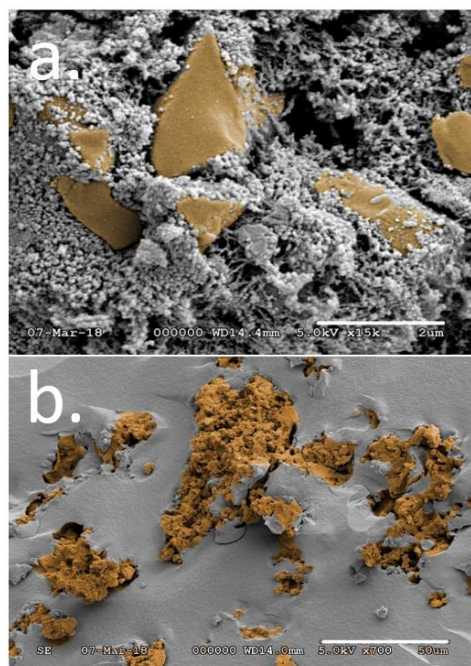
(A) Az aerogél adszorpciós (Ads) és deszorpciós (Des) izotermái. Ezek formája jelzi a makro- és mezopórusok jelenlétét (B) Pórus eloszlások görbéje . A V (□) a mintában lévő, folyékony nitrogén (vagy más folyadék) számára hozzáférhető pórusok összes térfogatát adja meg cm³-ben, 1 g anyagra vonatkoztatva. A dV(log d) (◇) a V kumulatív térfogati görbe pórusátmérő szerinti első deriváltját mutatja, a szemléletesebb ábrázolás kedvéért az átmérőt logaritmikus skálán feltüntetve.

A 200 nm-nél nagyobb pórusok kimutatására a nitrogén adszorpciós-deszorpciós porozimetria nem alkalmas, így mikroszkóp és pásztázó elektron mikroszkóp (PEM)

használatával egészítettük ki a méréseket, ezzel feltérképezve a β -TCP szemcséket és mikrométeres nagyságú pórusokat (14.,15. ábra).



14. ábra



15. ábra

14. ábra

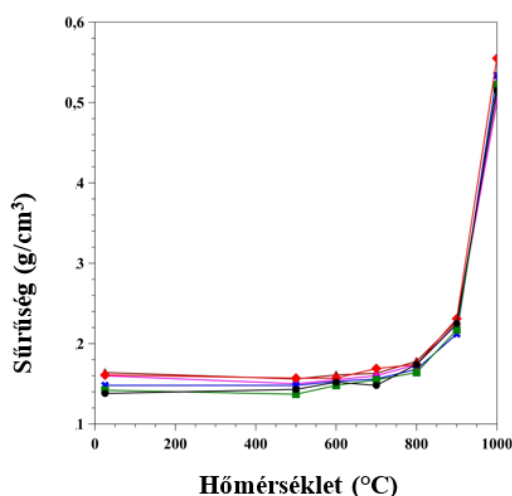
Fénymikroszkóppal készült felvételek szinterezett β -TCP-aerogélről (a) monolitikus minta 500 mikron átmérőjű csatornákkal (b) transzparens szilika aerogél mátrix, opaleszensz trikálcium foszfát szemcsékkel. Léptékskála 1mm (c) kör alakú minta 200 mikronos furatokkal (d) fúrási folyamat

15. ábra

Pasztázó elektron mikroszkóppal készült felvételek 700x és 15x nagyításon egy frissen eltört β -TCP-AE felszínéről (a) az egyenetlen felszín nagy porozitásra utal, TCP régiókkal kiegészítve. A pórusok mérete körülbelül 20 mikron nagyságig terjednek. A simább felszín a szilika aerogél mátrix (szürke), 25 nm átmérőjű pórusokkal (b) Nagyítás a szilika aerogél mátrixba ágyazott β -TCP kristályokról (sárga)

A minták denzitását a szuperkritikus szárítás, illetve minden melegítési fázist követően mértük le. A kapott értékek a 16. ábrán láthatóak. Szobahőmérsékleten a denzitás értéke $0.15 \pm 0.01 \text{ g/cm}^3$, amely érték nem változott 500°C -ra történő melegítés során sem.

Ennek magyarázata, hogy a cellulóz kiégetésének következtében fellépő súlyvesztesség az anyag zsugorodásával kompenzálódik, így eredményezve egy látszólagosan azonos denzitás értéket. A minták súlyvesztésének mértéke kevésbé kifejezett 500°C-900°C között, ami az adszorbeálódott víz és a struktúrában lévő víz elvesztésével hozható összefüggésbe. Ez utóbbi eredményezi a szomszédos szilanol csoportok között fellépő növekvő kondenzációt. A denzitás értékek jelentős növekedést mutatnak 900°C-1000°C között, az endotermikus víz elvesztésének, valamint a szilika mátrix viszkózus folyékonyságának következtében, amely felszíni kiterjedtségében szintén csökkenést mutat. A denzitás végső értéke így $0.52 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$.



16. ábra

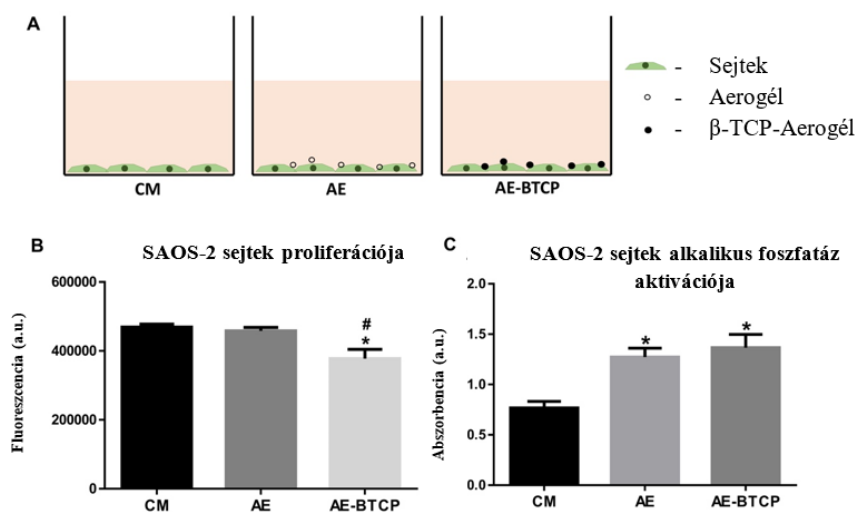
Hőmérséklet változásra bekövetkező sűrűség változás. A kezdeti sűrűség 0.15 g/cm^3 megemelkedett 0.52 g/cm^3 -ra a végső melegítést követően, ezzel növelve az anyag fizikai erősségét, ellenálló képességét

Fénymikroszkópos felvételek alapján a megmunkált monolit és azok chipjei (14. ábra c) 5x-ös és 50x-es nagyítás mellett a β -TCP granuláris megjelenését teszik láthatóvá a transzparens szilika aerogél mátrixban.

PEM vizsgálatok láthatóvá tették a porogén cellulóz kiégetését követően a β -TCP-AE szivacs- vagy korall-szerű régióit (15. ábra a), ahol a pórusok mérete 1-20 μm . Ezen pórus méret az, ami megfelelő átjárhatóságok biztosít mind a β -TCP, mind a különböző oldatban lévő ionok számára (15. ábra b).

4.1.2. SAOS-2 sejtek életképessége

Az aerogél citotoxicitásának vizsgálata SAOS-2 sejteket alkalmazva, alamarBlue Reagent méréssel történt. A tenyésztő médiumban (culture medium, CM) kontroll csoportként használt SAOS-2 sejtek és az aerogélt tartalmazó csoport között egy hét után nem mutatkozott szignifikáns különbség az alamarBlue értékek szerint. Azonban a β -TCP-aerogélt tartalmazó csoport esetében enyhe, de szignifikáns csökkenés mutatkozott a proliferációban, mind a kontroll, mind az aerogélt tartalmazó csoportokhoz képest (17. ábra A, B).



17. ábra

SAOS-2 sejtek tenyésztő médiumban (CM), vagy aerogéllal (AE) vagy β -TCP-aerogél szemcsékkel dúsított tenyésztő médiumban (β -TCP-AE) (A) alamarBlue vizsgálat a SAOS-2 sejtek proliferációjáról a hetedik nap után (B) SAOS-2 sejtek hetedik nap után mért alkalikus foszfatáz aktivitása (C) szignifikáns különbség a CM-hez képest ($p \leq 0.05$); * – szignifikáns különbség AE és β -TCP-AE között ($p \leq 0.05$)

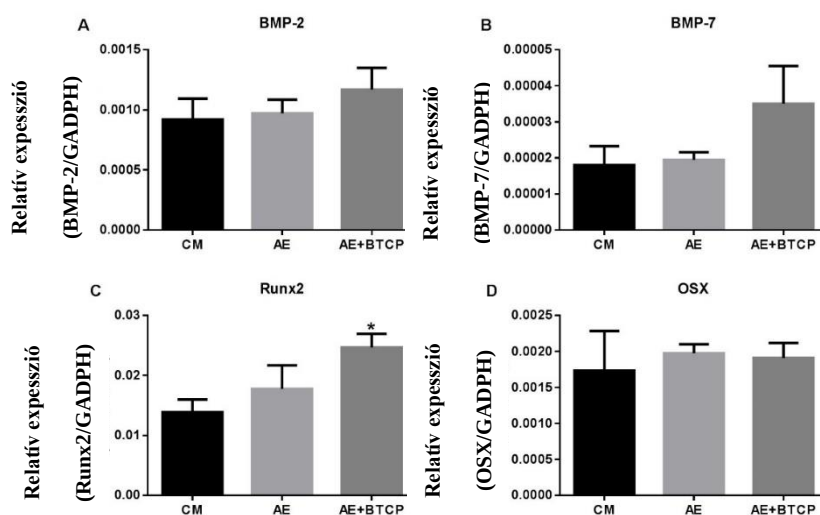
4.1.3. Alkalikus foszfatáz aktivitás

Mivel sem az AE, sem a β -TCP-AE nem toxikus a sejtekre nézve, így ezen anyagok SAOS-2 sejtekre gyakorolt oszteoblaszt differenciálódás indukciós képességét vizsgáltuk alkalikus foszfatáz aktivitás (ALP) teszt segítségével. Ezen teszt eredményei

alapján mind az AE- és mind a β -TCP-AE-ben használt SAOS-2 sejtek esetében enyhe és szignifikáns növekedés volt mérhető. Mivel az alkalikus foszfatáz aktivitásának növekedése az oszteoblaszt differenciáció markere, így ez az eredmény alátámasztja a SAOS-2 sejtek differenciációjának lehetőségét (17. ábra A, C).

4.1.4. Génexpresszió

Számos gén, köztük az oszteoblaszt differenciálódásért felelős BMP-2, Runx2, BMP-7, OSX kifejeződését vizsgáltuk. Ezen génekre nézve egy hét után nem volt szignifikáns különbség a kontroll csoport és az aerogélt tartalmazó csoport értékei között (18. ábra).



18. ábra

SAOS-2 sejtek génexpressziós vizsgálata a hetedik nap után. A grafikonok relatív expressziót mutatnak. Minden gén referencia értéke a GAPDH. A β -TCP-AE tartalmú médium esetén a BMP-2 (A) és BMP-7 (B) gének kismértékű, nem szignifikáns növekedést mutatnak a kontroll- (CM), vagy az aerogél tartalmú (AE) csoporthoz képest. Hasonlóan a Runx2 gén is emelkedést mutat, kismértékű, nem szignifikáns mértékben AE minta esetén, és szignifikáns mértékben β -TCP-AE minta esetén a CM-hez képest (C). OSX gén kifejeződésében nincs szignifikáns különbség β -TCP-AE és AE között a kontrollhoz (CM) viszonyítva. —* szignifikáns különbség CM-hez viszonyítva ($p \leq 0.05$)

BMP-7 és BMP-2 gének kifejeződése esetében az előzőnél nagyobb, de nem szignifikáns különbség mutatkozott a β -TCP-AE csoport esetében a kontroll vagy aerogélt tartalmazó

csoportokhoz képest (18. ábra A B). Runx2 kifejeződés esetén szignifikáns különbség volt látható a β -TCP-AE csoport esetében de csak a kontroll csoporthoz képest (18. ábra C). OSX génkifejeződés semmilyen változást nem mutatott a vizsgált 7 nap folyamán (18. ábra D). Az oszteoblaszt differenciáció során az egyik legfontosabb faktor a Runx2, amely direkt vagy indirekt úton hatva hangolja össze az oszteoblaszt differenciálódáshoz szükséges egyéb gének kifejeződését. A másik szintén kulcsszerepet játszó gén az oszterix (OSX), melynek kifejeződésének mértéke szintén a Runx2 gén befolyása alatt áll. A BMP szintje nem szignifikáns mértékben, de emelkedést mutatott a hetedik napon. Ezek tükrében feltételezhetjük, hogy az OSX és BMP gének kifejeződésének szignifikáns emelkedése ezen háttér folyamatok eredményeként következett be méréseink során, habár a Runx2 gén expressziójának emelkedése mellett egyértelműen kimutatható a SAOS-2 sejtek fokozott oszteoblaszt differenciációja.

Összességében elmondhatjuk, hogy az in vitro kutatásaink során a scaffold anyag szabályzása mellett, a SAOS-2 sejtek már a hetedik napon elkezdtek differenciációjukat oszteoblasztokká.

4.1.5. In vivo kísérletek hisztopatológiai eredményei

A digitálisan beszkenelt metszetek képanalízise alapján megállapítható, hogy a kezeletlen kontroll állatcsoportból származó üresen hagyott csontdefektusok 1 hónappal a műtét után gyulladásos fibrózis sarjszövettel voltak kitöltve számos granulocitával és makrofágokban dús mononukleáris sejttel. Ebben az állományban, tehát a defektus csontos szélétől függetlenül a lézió belsejében, meszesedés vagy kezdődő csontosodás nem volt látható az 1 hónapos defektusokban. A sarjszövettel kitöltött cilindrikus csonthiány csontszéleinek megfelelően a belső felszínen azonban kezdődő irreguláris meszesedés és incipiens csontképződés megfigyelhető volt (19. ábra, bal felső kép). Három hónapos korban az üresen hagyott kontroll csontdefektus mintákban a csontszélek felől tovább folytatódott a csontosodás a lézió belseje felé nyúló reparatív osszifikáció formájában, melynek frontvonalában a megszorodó oszteoblasztok jelezték a növekedés irányát. A 3 hónapos minták defektusainak belsejében (a laterális csontosodástól függetlenül) a gyulladásos fibrózis szövetben csupán kevés meszesedés

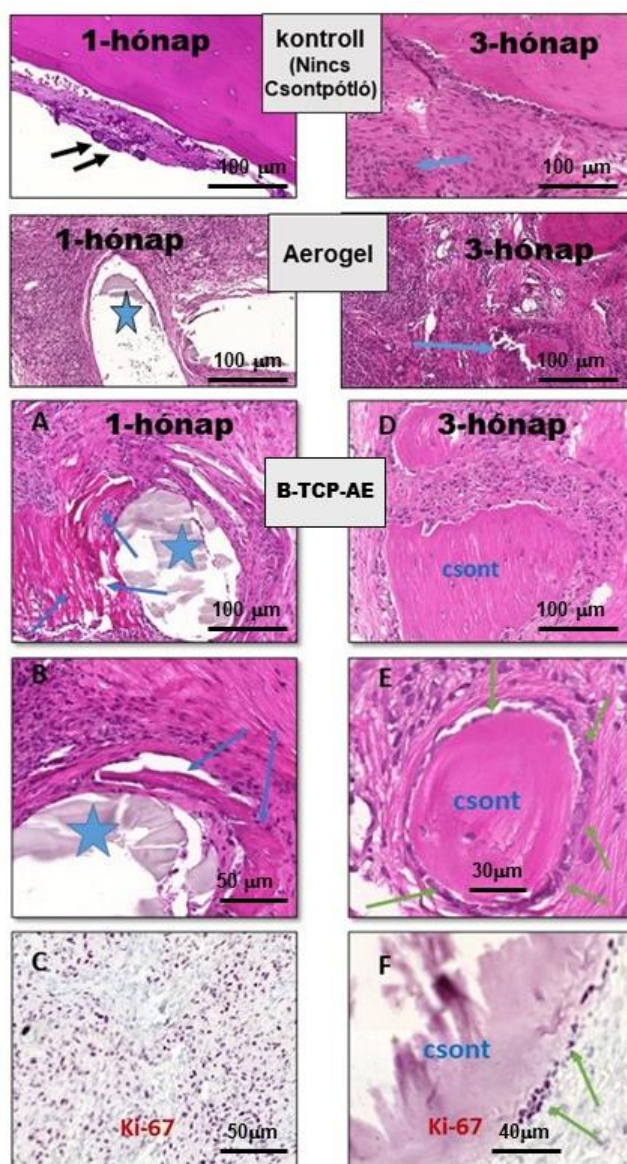
és kis szigetekben detektálható kezdődő csontosodás volt látható, melynek mennyisége azonban nem volt szignifikáns (19. ábra, jobb felső kép).

Ezzel ellentétben a natív aerogélt és β -TCP-AE kompozitot tartalmazó 1 hónapos csontdefektusokban az anyagok által indukált intenzív, részben idegentest-típusú gyulladásos reakció volt látható, helyenként dúsan vaszkularizált granulációs szövetképződéssel és extenzív fibrózissal. Ebben az állományban korai multifokális meszesedés és kezdődő csontosodás alakult ki a csontpótló anyagok körül a lézió belsejében, már a műtét utáni első 1 hónapban (19. ábra, bal oldali képek), ami nem mutatott összefüggést a széli reparatív csontosodással. Ez a csontpótló anyagok oszeoinduktív hatására utal. Lépcsőzetes metszésekkel végzett metszetek szemikvantitatív értékelése alapján az alábbiak állapíthatók meg: a kalcifikációs folyamat jelentősen intenzívebbnek és kiterjedtebbnek bizonyult a β -TCP-AE kompozit anyagot tartalmazó csontdefektusokban (19. ábra, A-B kép, kék nyilak), mint az AE-t hordozókban, vagy akár a 3 hónapos kontroll (üresen hagyott) csontdefektusokban, már a műtét után 1 hónappal.

A defektusban lévő gyulladásos sejtek és mezenhimális elemek Ki-67 pozitivitást mutattak (19. ábra, C), ami a celluláris komponensek aktivált állapotát tükrözi. A 3 hónapos mintákban, bár kisebb mértékben az AE-vel kezeltékben is, a β -TCP-AE kompozit csontpótló anyagot tartalmazó csontdefektusokban intenzív, kiterjedt multifokális intra-lézionális csont újdonszövetképződést detektáltunk oszteoblaszt szaporulattal (19. ábra, D-E, zöld nyilak). Ki-67 immunhisztokémiával meg is erősítettük, hogy ezek az oszteoblasztok aktív sejtciklusban vannak, azaz csontképző proliferatív fázisban (19. ábra, F kép, zöld nyilak). Miután a csontpótló anyagokkal kezelt csontdefektusokban a laterális csontszélekből származó és a lézió belső terébe benövő reparatív osszifikáció lényegesen intenzívebbnek bizonyult a kontrollhoz képest, különösen a β -TCP-AE kompozit jelenléte esetén.

Összességében, 3 hónappal a műtét után megállapítható, hogy az arteficiális csonthiány nagyrészt *de novo* képződött új csontállománnyal, kisebbrészt mérsékelten krónikusan lobos fibrózus heges szövetrel remodelálódott a csontpótló anyag defektusban való integráló „állványképző” (scaffolding) és a β -TCP oszeoinduktív hatása nyomán. Fontos megjegyezni, hogy a teljes csontos reparáció még nem következett be a vizsgált 3 hónap alatt, és a defektust kitöltő szolidifikált szövetben a csontpótlásra használt szilika aerogél kristályos szemcsék formájában még kimutathatók (amik a 6.

hónapban is detektálhatók – lásd Megbeszélés fejezetet is). A fenti eredmények lényegében összhangba hozhatók mások által publikált adatokkal (172,150).



19.ábra

β -trikalcium foszfát aerogél (β -TCP-AE) *in vivo* hatása, hisztopatológiai követéssel, patkány koponyacsont 8 mm-es defektusának reparatív osszifikációjára 1 hónappal (bal oldali panel) és 3 hónappal β -TCP-AE csontpótlóval való szubsztitúciót követően (jobb oldali képsor). Reprezentatív szövetminták formalin-fixált és paraffinba ágyazott dekalcinált metszetekből származnak. Referenciaként a felső szövettani képsor kontroll, kezeletlen (üresen hagyott) csontdefektusból származik, melyben látható, hogy 1 hónap után a csontszélen kalcifikáció (fekete nyilak) kezdődő reparatív laterális osszifikációval, valamint gyulladásos sarjszövetképződéssel (a képen nem látható); három hónappal később a laterális csontosodás mellett (jobb oldalt, felül) csupán gyér mennyiségű apró

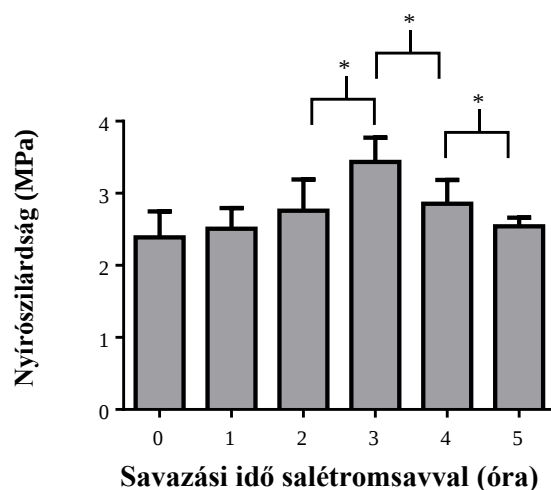
újdonszövet képzett csontsziget látható (kék nyíl). Második képsor AE-lel feltöltött csontdefektus mintákból való szövettani képek láthatók: 1 hónapos mintában sarjszövetben gazdag aerogél töcsák (kék csillag), 3 hónaposban a kontrollhoz képes nagyobb újdonszövet képzett csontsziget látható (kék nyíl). A fentiekkel ellentétben a β -TCP-aerogéllal kezelt csontdefektus minták már 1 hónap után (A-B) intenzív multifokális kalcifikációt és korai csontosodást mutatnak (kék nyilak), különösen a helyenként granulomatózus fibrotizáló gyulladásos sarjszövetben lévő idegen anyag jelenlétével összefüggésben (kék csillagok); 3 hónap elteltével (D-E) már nagy újdonszövet képzett csontszigetek láthatók oszteoblaszt szaporulattal övezve (E kép, zöld nyilak), gyulladásos fibrózis kötőszövetes állományban. Ki-67 immunhisztokémiával (F) látható, hogy a csontsziget mentén az oszteoblasztok aktív sejtciklusban vannak (zöld nyilak, püspöklila nukleáris pozitivitás), ugyanakkor az 1 hónapos mintában (C) az aktivált gyulladásos sejtek mutatnak Ki-67 pozitivitást. A felső négy képsor HE festett, az alsó pedig Ki-67 márkerral végzett immunhisztokémiai reakciónak felel meg. Eredeti nagyítások: felső három képsor: 100x; B, C, F: 200x; E: 400x.

4.2.1. Az üvegfelszín optimális savazási ideje

Az üvegfelszín tisztításának vagy aktiválásának hétköznapi gyakorlatban elterjedt módszere az üvegfelszín protonálása. Az optimális savazási idő meghatározása a savazott üvegfelszín és epoxigyanta között meghatározott nyírószilárdsági méréseken alapszik, melyek MDP tartalmú bonddal és fotopolimerizációs gyantával lettek egymáshoz rögzítve.

A csontot vagy titánt tartalmazó csoportokhoz képest az epoxigyantának volt a legkisebb affinitása/nyírószilárdsági értéke az üvegfelszínhez, így a protonálás önmagában gyakorolt hatása az üvegfelszínre, az adhezív és üvegfelszín közötti további vizsgálatokat tett indokoltá. A nyírószilárdsági mérések eredményei a 20. ábrán láthatók.

A mérések alapján kiderült, hogy három óra az az időtartam, ami a leginkább optimális savazási idő szempontjából. A nyírószilárdsági mérések azon epoxi minták csoportjánál mutatták a legmagasabb értékeket, amikor azok a három órás (3.45 ± 0.34 MPA) savazási időszámban voltak.



20. ábra

Különböző salétromsavas savazási időszavakat követő szakító szilárdság mérés értékei epoxi minta esetén $p = 0.05$

A három órás savazási időszavban kezelt csoport esetén megfigyelhető MPa növekedés szignifikánsan eltér a két órás (2.760 ± 0.43 MPa) ($p = 0.0068$) és négy órás (2.856 ± 0.33 MPa) ($p = 0.0068$) csoportokétól. Ezen kívül az öt órás csoport esetében jól látható a nyírószilárdsági értékek szignifikáns csökkenése a négy órás csoporthoz képest. A későbbiekben alkalmazott zéta potenciál, röntgen fotoelektron spektroszkópia (XPS), kontaktszög mérés és nyírószilárdsági értékek meghatározása ezért ezen optimális savazási idővel előkezelt üvegfelületekkel történtek.

4.2.2. Zéta potenciál mérés eredményei

A protonálás okozta üvegfelület töltöttségének meghatározására a zéta potenciál mérés alkalmazható, Smoluchowsky közelítéssel. A mért pH- és számolt zéta potenciál értékek a 2. táblázatban láthatóak.

Csoport	pH	Zéta potenciál mV	Mozgékonyság $\mu\text{mcm/Vs}$
Alap elektrolit	6.73	-9.72 $\pm$ 1.13	-0.76 $\pm$ 0.09
Nem protonált üveg szuszpenzió	10.14	-57.22 $\pm$ 0.45	-4.49 $\pm$ 0.03
Protonált üveg szuszpenzió	1.82	4.42 $\pm$ 0.67	0.35 $\pm$ 0.05

2. táblázat

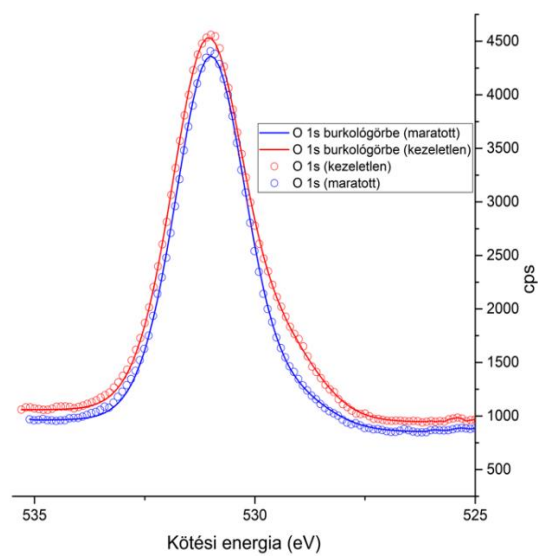
Zéta potenciál és pH értékek az alap elektrolit (ultra-tiszta víz és 0.001 M NaCl), kezeletlen és protonált üveg szuszpenziók esetén (n = 5)

A zéta potenciál mérést leginkább befolyásoló faktorok a pH és az ionos erősség. Esetünkben ez utóbbi konstans volt. Az őrlött szilika por ($d = 1183 \pm 230$ nm) pH értéke 10.14 volt a „background” elektrolitban. A lúgos pH háttérben az üveg részecskék külső rétegében található protonok/hidronium ionok és az üvegben lévő nátrium és kalcium ionok cseréjé áll (173,174). -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 őrlött üveg részecskék zéta potenciál értéke +4.42 mV csökkenést mutatott a nem protonált üveg szuszpenzióhoz képest. A salétromsavas maratás következtében az üveg felszínnek pozitív töltöttsége lesz, amely befolyásolhatja a szilika adszorpcióját az MDP-hez.

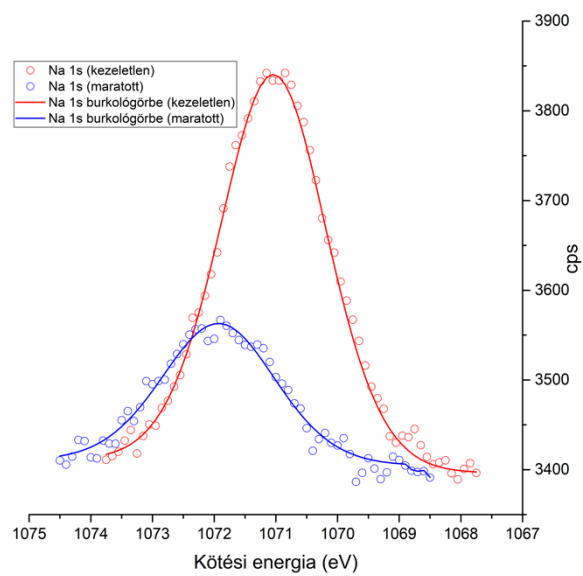
4.2.3 XPS

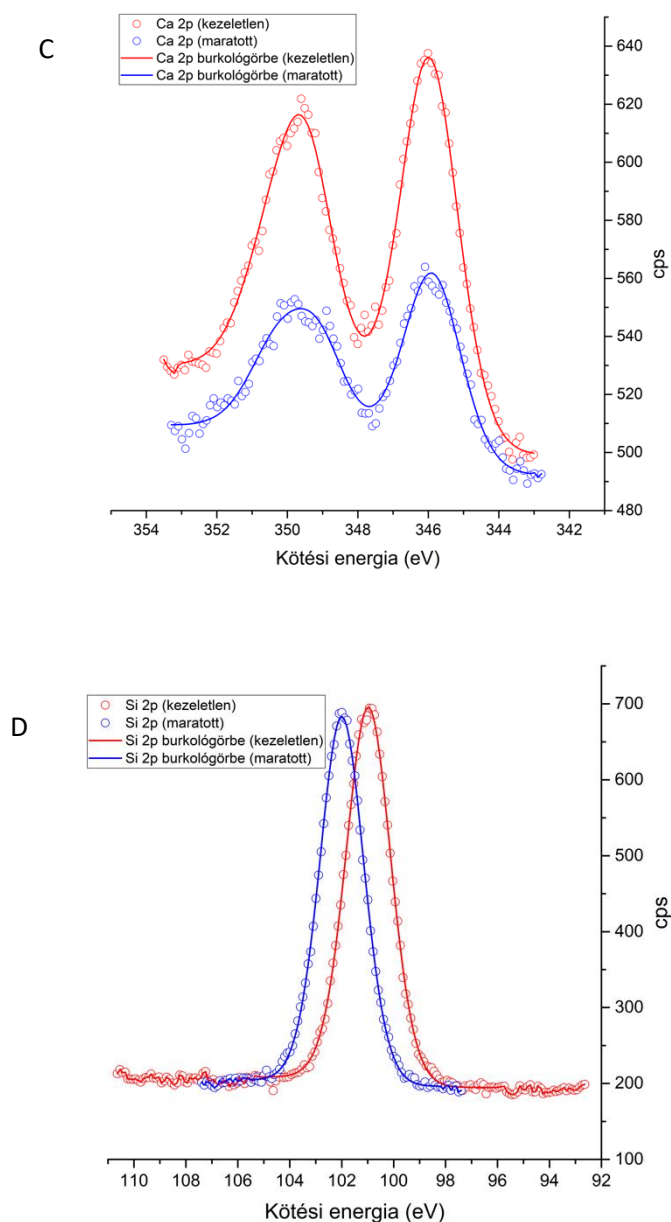
A kalcium és nátrium koncentrációja csökkenést mutat (21. ábra, 3. táblázat), míg a Na 1s és Si 2p csúcsa egy magasabb kötési energia pályára (binding energy= BE) tolódik. Ezt nagyrészt az üveg egyfajta korróziója által okozott pH érték savasodása okozza, amikor is a lúgos ionok kioldódnak az üveg felszínéről és helyükre olyan kationok, mint a H^+ vagy H_3O^+ ionok kerülnek.

A



B





21. ábra

Kezeletlen (piros) és savval maratott (kék) üvegminták Röntgen-fotoelektron spektrumai: O 1s (A), Na 1s (B), Ca 2p (C) és Si 2p (D)

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.

	Si %	O %	Ca %	Na%
Kezeletlen üveg	40.27	57.01	2.48	0.25
Savazott üveg	42.28	56.51	1.21	0.09

3.táblázat

Röntgen fotoelektron spektroszkópiával (XPS) meghatározott felszíni elemek üveg esetén

4.2.4. Kontakt szög

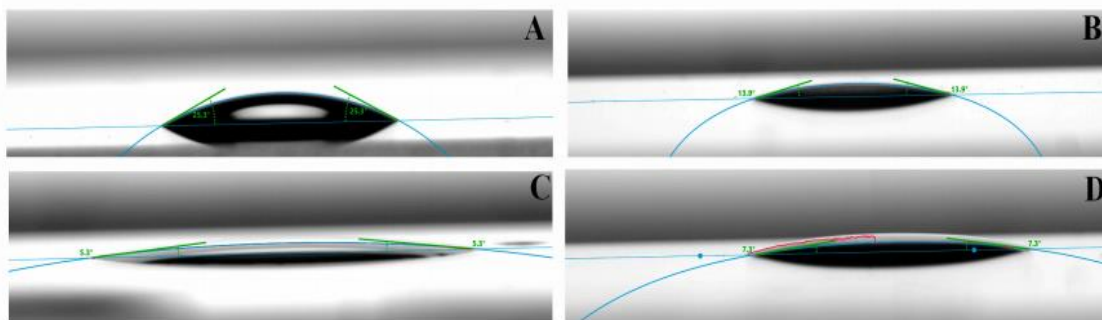
Az adhézióban az anyag nedvesítő képességének fontos szerepe van. Egy folyékony halmazállapotú anyag ezen nedvesítő képességét egy szilárd felszínen a kontakt szög mérés írja le. A kapott kontakt szög értékeket a 4. táblázat foglalja össze.

	Kezeletlen üveg	Protonált üveg	Epoxi gyanta	Csont	Titán
Víz	25.220°±0.74	5.12°±0.36 ★	81.60°±0.68	95.51°±0.87	91.04 °±0.56
MDP-tart. bond	13.38°±0.43	7.21°±0.41★	14.73°±0.94	16.40°±0.99★	14.88°±0.85

4. táblázat

A víz és MDP tartalmú bond kontaktszög értékei kezeletlen és protonált üveg felszíneken, epoxi gyanta, csont és titán minták során (n=10)

A víz kontakt szög értéke 25.20° volt a nem protonált üveg felszínén, mely a mikroszkópos tárgylemez hidrofil tulajdonságát mutatja (22. ábra A). Ezzel szemben a protonált felszínen mért érték ($\text{CA} = 5.12^\circ$) szignifikánsan alacsonyabb (★ 4. táblázat, $p < 0.05$, 22. ábra C). Ezt a szignifikánsan csökkenő kontakt szög értéket az MDP tartalmú bond esetében is megfigyelhetjük, mind a kezeletlen, mind a protonált üveg felszín esetén (★4. táblázat, 22. ábra B,D) ($p < 0.05$).



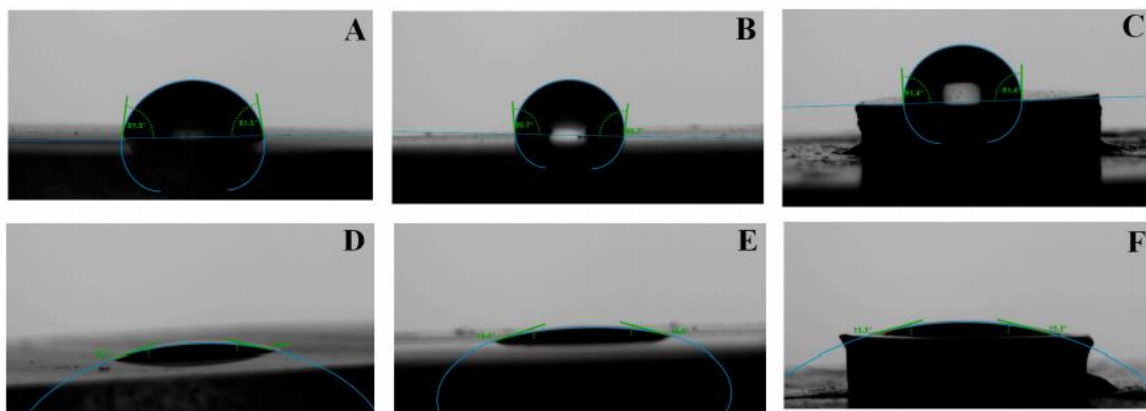
22. ábra

Felvételek a víz kontaktszögéről (A, C) és MDP tartalmú bondról (B, D), kezeletlen üvegfelszín esetén (A, B), és protonált üvegfelszínen (C, D)

A víz kontakt szög értéke epoxi gyanta, csont és titán felszínek során 81.60° , 95.51° , 91.04° volt, mely jól szemlélteti ezen anyagok közti különbséget a víz eltérő nedvesítő képességének ($p < 0.05$) függvényében (23. ábra A-C). Az adhéziót az üveg hidrofíli és az epoxi gyanta, csont és titán anyagok hidrofób tulajdonságának egymáshoz viszonyított kapcsolata határozza meg. Így a megfelelő adhézió érdekében kulcsfontosságú a hidrofíli és hidrofób felszínek rögzítéséhez alkalmazott adhéziós anyag nedvesítő képessége. Az MDP tartalmú bond kontaktszög értéke 14.73° , 16.40° , és 14.88° , az epoxi, csont és titán anyagok esetében (23. ábra D-F). Ebből adódóan megállapítható, hogy az MDP tartalmú bond a keményszövet csiszoláskor használatos különböző anyagok mindegyikét egyaránt kiválóan képes nedvesíteni/hidrofilizálni. Az MDP tartalmú bond nedvesítő képességének vizsgálatok szignifikáns különbség volt mérhető a epoxi gyanta és csont (★ 4. táblázat, $p < 0.05$) minták között, míg az epoxi gyanta és titán minták között ez a különbség nem volt szignifikáns. Az MDP tartalmú bond nedvesítő képességének vizsgálatok, szemben az epoxi gyanta és titán minták esetén, az epoxi gyanta és csont ($p < 0.05$) minták között szignifikáns különbség mutatkozik. A kapott kontakt szög értékek eredményeként megállapítható, hogy az MDP mind az üveg, mind az epoxi gyanta, csont és titán felszíneket hasonlóképpen képes jól nedvesíteni, ezáltal segítve a rétegek közötti megfelelően erős adhézió kialakítását, hozzájárulva a vékony csiszolat metszetek készítésének sikerességéhez.

Számos kutatási eredmény található olyan adhéziót meghatározó, befolyásoló tényezőkről, mint a felszín szabad energiája, kontakt szöge, érdessége vagy nedvesítő

képessége. Az érdesebb felszín bár nagyobb felületet biztosít a ragasztáshoz, de közben az érdesség következtében kialakult irreguláris rajzolatba gyakran beszorulhat a levegő, ezzel csökkentve az anyag nedvesítő képességét (175). Ezért bizonyos kutatások nem találtak összefüggést a felszín érdessége és nedvesítő képessége között. Az előbb említett faktorkizárása miatt kutatásaink során a kontakt szög mérések sima üveg felszínén történtek.

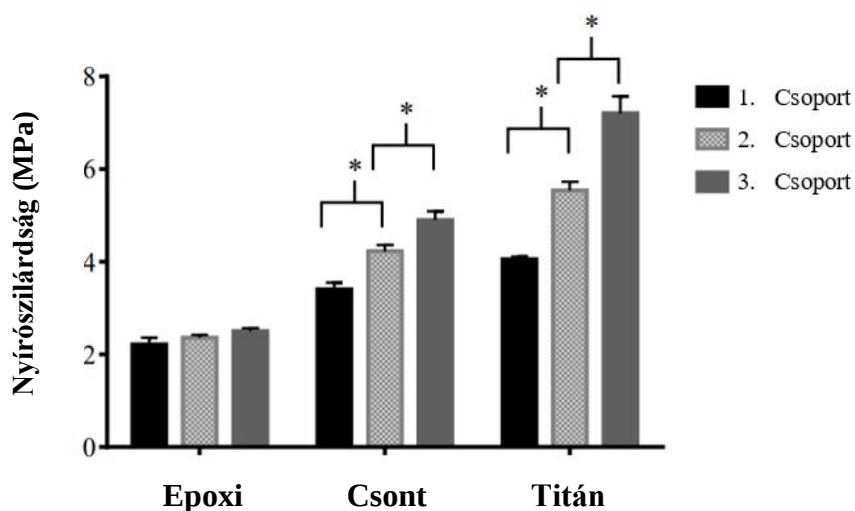


23. ábra

Felvételek a víz kontaktszögéről (A, C) és MDP tartalmú bondról (D-F), epoxi gyanta (A, D), csont (B, E), és titán felszíneken (C, F)

4.2.5. Nyírószilárdság mérés eredményei

A nyírószilárdság mérés eredményei a 24. ábrán láthatóak. Epoxi gyanta esetén a nyírószilárdság 2.217 ± 0.656 MPa az első csoport, 2.361 ± 0.235 MPa a második csoport, 2.505 ± 0.247 MPa a harmadik csoport felhasználásában. A különbség nem volt szignifikáns a csoportok között ($p < 0.05$). Csont minták esetén a második (4.228 ± 0.522 MPa) és harmadik csoport (4.899 ± 0.740 MPa) esetén magasabb értékek voltak mérhetőek a termoplasztikus adhezívvel ragasztott mintákhoz képest (1. Csoport: 3.406 ± 0.565 MPa). A p -érték 0.0003 és 0.008. Titán minták esetén szignifikáns növekedés látható a csoportok között (1. Csoport: 4.051 ± 0.239 MPa, 2. Csoport: 5.541 ± 0.709 MPa, 3. Csoport: 7.204 ± 0.781 MPa). Az MDP bondot tartalmazó titán és csont minták esetében alkalmazott üvegfelszín protonálása szignifikánsan növelte a nyírószilárdság értékeit a nem protonált üvegfelszínt alkalmazott csoportokhoz képest.



24. ábra

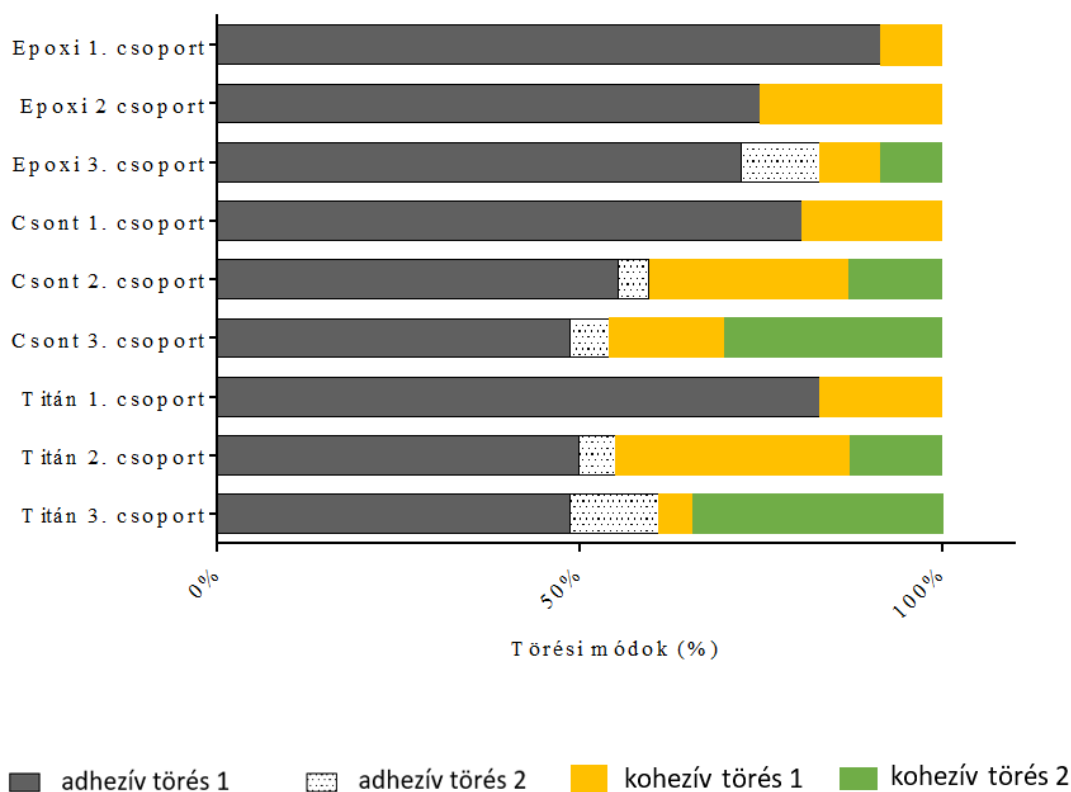
Nyírószilárdság értékek és SD értékük epoxi, csont és titán minták esetén: termoplasztikus ragasztó anyag (1. csoport), MDP tartalmú bond és gyanta (2. csoport), protonált üvegfelület, MDP tartalmú bond és gyanta (3. csoport) használatkor ($n = 15$) $p < 0.05$

4.2.6. Törési módok vizsgálata

A törési módok vizsgálat értékeinek eredményei a 25. ábrán láthatóak. Az adhezív törés epoxi gyanta minta esetén 92%, 75% és 83%, csont minta esetén 81%, 60% és 54%, titán minta esetén 83%, 55% és 61% volt az első, második és harmadik csoport méréseként. Első csoportban alkalmazott termoplasztikus adhezív esetén két fajta törés volt jellemző. Az esetek nagy részében a törés a termoplasztikus adhezív és az üveg felszíne között történt. Csak ritkább esetben volt megfigyelhető a termoplasztikus anyagban magában történő törés, vagyis az első típusú kohezív törés (12. ábra).

A második és harmadik csoportban alkalmazott epoxi gyanta minták esetén különösen magas volt az 1. típusú adhezív törés, az epoxi gyanta nem-reaktív molekuláris mintázata jellege miatt. Egyes típusú kohezív törés nagyobb mértékben fordult elő az kettes csoportban az egyes csoportokhoz képest, ami az MDP tartalmú bond magasabb kötődési képességét mutatja az üveg felszínhez, illetve a mintákhoz (epoxi gyanta, csont, titán) a termoplasztikus adhezívhez képest. A kettes típusú adhezív törés epoxi gyanta minta

esetén a 2. csoportban egyáltalán nem volt megfigyelhető a 3.csoporttal (11%) szemben. Az epoxi gyanta mintáknál az MDP tartalmú bond alkalmazásakor jobb adhézio volt megfigyelhető a termoplasztikus adhezívhez viszonyítva. Ráadásul ez az adhézio az üveg protonáltságával tovább nőtt.



25. ábra

Törési módok (%) a vizsgált mintákon nyírószilárdsági méréseket követően

Csont mintáknál az 1.típusú adhézios törés az 1.csoportnál 81%, míg 2.csoportnál 55%. az 1.típusú kohezív törés 19%-ról 27%-ra emelkedett az 1.csoporthoz képest a 2.csoport esetében, míg a 2.típusú kohezív törés szintén emelkedést mutatott a 2. (13%) és 3. (30%) csoport között. A 3.csoport csont mintái esetén az adhezív és kohezív törések összességében nézve 50-55%-os arányban voltak jelen. A kohezív típusú törések számának mértéke szintén jól tükrözi azt a korábbi feltevést, mely szerint az MDP molekulák segítik a csont és üveg felszín közötti jobb rögzítést a TPA-hoz képest. Az MDP tartalmú bond alkalmazásával készült mintáknál a kohezív törés jelentős mértékben megnövekedett, mikor protonált üveg felszínhez volt a minta rögzítve.

1.típusú adhezív törés 83%-, 50%- és 50%-os mértékben volt mérhető az 1., 2., és 3. csoportoknál használt titán minták alkalmazásával. A kohezív törés az 1.csoportnál 17%-ról 33%-ra emelkedett a 2.csoporthoz képest. Az adhezív törés második típusa szintén emelkedést mutatott 5%-ról 12%-ra a 2. és 3.csoport között. Ezek alapján megállapítható, hogy titán minták esetében erősebb kötődés alakult ki, ha azoknál MDP tartalmú bond volt alkalmazva, nem pedig termoplasztikus adhezív. A protonált üveg felszín esetén a 2.típusú adhézios törés nagyobb számban volt jelen, de az 1.típusú adhézios törésben nem volt jelentős különbség a protonált és nem protonált üveg felszínek között. Az üveg protonáltsága csökkentette az 1.típusú kohezív törést.

5. Megbeszélés

A többi kötőszövet felépítésének megfelelően a csont extracelluláris mátrixból és sejtekből áll. A csont olyan kompakt kötőszövet, amelyben az extracelluláris mátrix mineralizálódott.

A csontok, a porcok, és ízületek alkotják a szkeletális vázat, amely két fő funkciót lát el. Struktúrából adódó statikai funkciója révén támogatja és védi a szervezetet és a belső szerveket-szöveteket, valamint tapadási felületet biztosít az izmok számára. Emellett a csont a szervezet fontos kalcium és foszfát raktára. A vér megfelelő kalcium szintjét a csontból mobilizálható vagy raktározható kalcium által van biztosítva a PTH (parathyreoid hormon) és a kalcitonin szabályozása által. Ezen kívül a csontvelőben zajló vérképzés folyamatának is létfontosságú színtere.

Összetételét tekintve a mátrix ásványi anyag tartalma különbözteti meg a csontszövetet a többi kötőszövettől. Nagyrészt szervetlen ásványi anyagból, kalcium foszfátból áll, hidroxipapatit kristályok formájában. Szerves alkotóelemei a kollagén, valamint glükóz-amino-glikánok (hialuronsav, kondritin-szulfát, keratán-szulfát), glikoproteinek (oszteokalcin, oszteonektin, oszteopontin) és szialoproteinek, mely utóbbi kettő felelős a kalcium megkötésért az alapállomány mineralizációja során. Pusztán a kompakt csontszövetben négy különböző sejtípus található: progenitor csontsejtek, oszteoblasztok, oszteociták (csontsejtek), oszteoklasztok. A trabekuláris csontban lévő csontvelőben a hemopoetikus sejtek mellett számos további sejtfeleség is van: adipociták, fibroblasztok/fibrociták, vaszkuláris elemek sejtjei, valamint mezenhimális őssejtek, melyek direkt vagy indirekt módon a csont homeosztázis fentartásában, ill annak reparációjában részt vesznek (176-180).

Szerkezetét tekintve a kortikális csont, amely a csontváz közel 80%-át teszi ki tömör és kompakt (a csont külső részét képezi), míg a trabekuláris csont egy kevésbé kompakt, rugalmasabb, gyorsabban átépülő csontszövet. A csont mátrix nagyrészt I-es típusú kollagénből, nem kollagén eredetű fehérjékből áll és a teljes csontszövet szerves részének körülbelül 90%-át teszi ki. A hidroxipapatit kristályok is ezen mátrix részei. Ezek stabilizálása, a csontképződésben is fontos szerepet játszó a csont mátrixban található oszteokalcin jelenti, ami egy K-vitamin függő fehérje és az oszteoblasztok termelik (181).

A csont mátrix előállításáért az oszteoblasztok a felelősek. Az oszteoblasztok olyan multipotens (el nem kötelezett) mezenhimális sejtekből származnak, melyek több sejt típusra (oszteoblaszt, adipocita, kondrocita, mioblaszt, fibroblaszt) képesek differenciálódni. Oszteoblasztos differenciálódásának szabályzásában egyebek mellett a Runx2 és oszterix géneknek fontos szerepe van (182).

A csontképződés három egymást követő fázisban zajlik: oszteoid mátrix előállítása, érése és mineralizációja. Ideális esetben ez a három fázis egyforma arányban történik, vagyis a mátrix képződése ugyanolyan mértékben megy végbe, mint a mineralizációja. Kezdetben az oszteoblasztok által termelt kollagénből kialakul az oszteoid mátrix, mely a folyamatos termelés közben folyamatosan elkezd mineralizálódni. Később a kollagén szintézis mértéke csökkenni kezd, miközben a mineralizáció folytatódik egészen addig, amíg az oszteoid mátrix teljesen mineralizálódik. Az oszteoblasztok különböző növekedési faktorokat is termelnek és a rajtuk/bennük található receptorok által autokrin és parakrin módon szabályozzák az aktivitásuk. Olyan receptorok is találhatóak az oszteoblasztokon, amik a parathormon, inzulin, progeszteron, prolaktin, D3-vitamin, retinoidok, androgének, ösztrogének csont-homeosztázisban betöltött regulatív szerepét segítik elő (180).

A csont lebontás folyamatáért az oszteoklasztok felelősek, mely adott esetben facilitálhatja a csont újdonszövetképződést is.

A „remodeling” során a csont általában megőrzi alakját, funkcióját, nagyságát, de a celluláris architektúrában és a strómában mikroszkóposan is követhető finom elváltozások-átrendeződések lehetnek. Ez a folyamat az oszteoblasztok, oszteoklasztok és egyéb mezenhimális sejtek koordinált folyamatain keresztül megy végbe (180, 183,184).

A csontpótló anyagokra abban az esetben lehet szükség, amikor a csont nem képes önmaga gyors regenerációjára. Ennek oka lehet a csontdefektus nagyságának nagy kiterjedése, amit okozhat valamilyen sérülés, pl. törés, vagy sebészeti beavatkozás, daganatos elváltozás eltávolítása, ill. oszteoradonekrózis után. Emellett akár kisebb kiterjedésű lézióknál is akadályozva lehet a csontgyógyulás, amennyiben valamilyen helyi- vagy szisztémás eltérés áll a háttérben, például cukorbetegség, oszteoporózis. Fogászati protetikai munka nélkülözhetetlen feltétele egyes esetekben a megfelelő

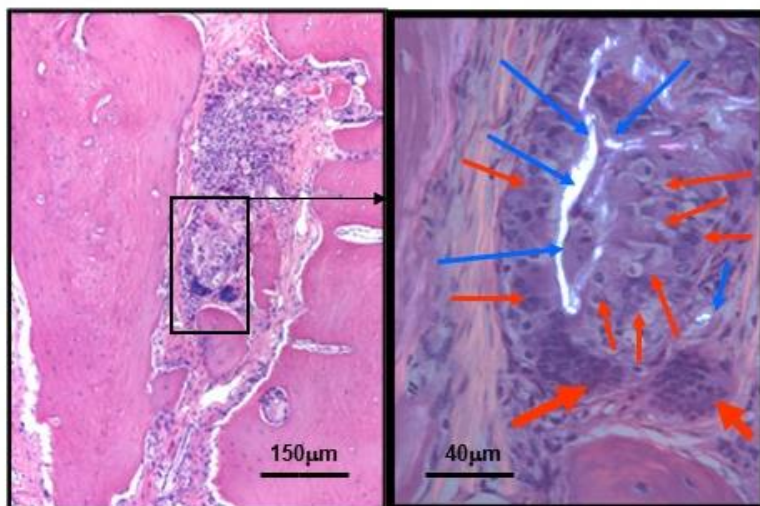
menyiségű, kiterjedésű csont megléte. Ezért a fogászatban is fontos jelentősége lehet a csontpótló anyagoknak, melyek elsődleges célja a csontgyógyulás folyamatának segítése, kiegészítése. Ennek érdekében számos kutatás folyik jelenleg is. A csontpótló anyagnak két fő szempontnak kell megfelelnie, hogy sikeres csontpótlást tudjon később biztosítani. Az első a graft szerkezeti tulajdonsága, mely magában foglalja a pórusok méretét, átjárhatóságát, a graft mechanikai tulajdonságát és a graft felszívódási hajlamát (10, 144, 185, 186). A megfelelő porózus struktúra teszi lehetővé a különböző sejtek vándorlását, anyagcsere biztosítását, ezzel a vaszkularizáció kialakulását gyulladásos sejtek jelenlétében is elősegítheti (187). A szilárdság a térfogat megfelelő ideig való fenntartásához szükséges. Ám a graftnak idővel teljesen fel kell szívódnia, amennyiben szeretnénk egy teljesen természetes, eredeti vagy ahhoz hasonló csontszerkezetet visszaállítani, különben a visszamaradó csontpótló anyagok akadályozhatják a trabekuláris csont kialakulását.

A fentieket figyelembe véve kutatásunk elsődleges célja az volt, hogy egy olyan előnyös kompozit bázist, - a korábban alkalmazott rendszerek mellett- graft-vázat találjunk csontpótlóként, mely a fenti fiziko-kémiai tulajdonságoknak megfelel.

Ideális esetben a csontba helyezett implantátum és csontpótló anyag scaffoldként működik, és a defektus helyét kitöltő mechanikai funkciója mellett segíti a szimultán csontképződést is. Ezek alapján, az implantátum vagy csontpótló anyagok sikerességének egyik lehetséges vizsgálati módszere az összeintegráció kiértékelése fénymikroszkóppal.

Jelen vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a laboratóriumi körülmények között általunk előállított szilika aerogél (AE) és β -TCP-AE kompozit csontpótlók *in vitro* nem mutattak lényeges citotoxicitást. Az alkalikus foszfatáz aktivitási vizsgálatok arra utaltak, hogy az AE és a β -TCP-AE szignifikánsan indukálta SAOS-2 differenciálatlan oszteoszarkóma sejtvonal oszteoblasztos differenciációját, mellyel összhangban az oszteoindukcióhoz és oszteogén maturációhoz köthető gének expressziójának egy része mérsékelt módon (csontszövetben megszokott egyéb sejtes elemek hiánya ellenére is) emelkedett. Ezek megalapozták, hogy a csontpótló céljából előállított AE és β -TCP-AE anyagokat *in vivo* rendszerben is megvizsgáljuk patkány koponyacsont-defektus modellben (calvaria critical size model). A szövettani eredmények azt mutatják, hogy a kontroll (kezeletlen,

üresen hagyott) csontdefektusban, hegesedő gyulladásos granulációs szövet kíséretében, dominálón a laterális csontszél mentén alakult ki reparatív csekély csontképzés az első hónapban, és csak 3 hónap elteltével volt detektálható kevés kalcifikáció és helyenként minimális osszifikáció a csontdefektus üregén belül intralézionálisan, a laterális reparatív csontújdonképződéstől függetlenül (8. ábra, kontroll, 3 hónap, kék nyíl). Ezzel szemben kisebb mértékben AE-vel, nagyobb mértékben β -TCP-AE-vel végzett csontpótlást követően egy nem specifikus sarjszövetképződéssel kombinált intenzív sejtdús idegentest típusú óriássejtes fibrotizáló granulomatosus gyulladás alakult ki az anyagok jelenléte miatt már az első hónapban, mellyel asszociáltan a csontdefektust határoló csontszélek mentén prominens reparatív osszifikáció indukálódott, ami az anyagok oszteokonduktív hatására utal. Mindemellett feltűnő volt már az 1 hónapos minták szövettani metszeteiben, különösen a β -TCP-AE-vel kezeltékben, hogy a csontosodó csontszélektől függetlenül az üregben (intralézionálisan) multifokális kalcifikáció (8. ábraA-B, kék nyilak) és incipiens osszifikáció is kialakult a csontpótló anyagok szolubilizált „tócsáinak” szomszédságában (8. ábraA-B, kék csillag). Ez korai osszeoindukcióra utal. Harmadik hónapra ezekből nagy, helyenként konfluáló újdonképzett csontszigetek alakultak ki oszteoblasztos szegéllyel (8. ábra, zöld nyilak), mialatt a csontpótló anyag mennyisége jelentősen csökkent. β -TCP-AE-vel kezeltékben három hónap alatt lényegében a csontdefektus teljes mértékben kompakt szövetté vált, és közel 70%-ban kemény újdonképződött csontszövetből állt. Az ürtér további részét krónikus lobsejtekkel átjárt fibrózus szövet foglalta el, mely utóbbiban helyenként nem metabolizálódott krisztalloid (szilika) csontpótló maradványok is jelen voltak, részben idegentest típusú többmagvú makrofágok citoplazmájában. Ez alátámasztja korábbi kutatások eredményeit és azokból levonható konklúziót, miszerint azok a hatékony osszeoinduktív csontpótló anyagok, amik sejt-mediált gyulladásos reakció kiváltása révén aktiválják a T-sejteket és makrofágokat, valamint a csontszövet mezenhimális elemeit (pl. őssejteket), és a citokinek, növekedési faktorok révén képesek beindítani egy oszteoblasztos sejtdifferenciációt, majd csontképzést (188,189).



26. ábra

Hat hónapos β -trikalcium foszfát szilika aerogél (β -TCP-AE) csontpótlót tartalmazó koponyacsont-defektus HE festett szövettani képe (200x): bal oldalon látható, hogy bár 6 hónap után csaknem teljes intralézionális (csontszélektől függetlenül képződött) csonthiányt záró osszifikáció már bekövetkezett, mégis a csontszigetek közt lévő kötőszövetben még a nem metabolizálódott csontpótló kristályos maradványai láthatók, idegentest típusú óriássejtes granulomatózus gyulladással. A bekeretezett rész polarizációs mikroszópban kinagyított (630x) részlete a jobb oldali fotón, ahol az erősen fénytörő szilika jellegű idegen anyag azonosítható (kék nyilak) számos nagy többmagvú makrofág (vastag piros nyilak) és epitelioid sejtek (vékony piros nyilak) jelenlétében.

Figyelemre méltó azonban, hogy állatkísérletes modellekben a csontpótló-graftok csontosodásban betöltött szerepét általában maximum 12 hétig (1-3 hónapig) követik, de kevésbé azt, hogy mikor következik be a teljes csontos reparáció. Eredetileg magunk is ezt a stratégiát választottuk 8 mm átmérőjű csontdefektus *in vivo* követéses vizsgálatára, azonban az eredmények azt tükrözik, hogy bár a β -TCP-AE hatékony oszteoinduktor, a 3 hónapos időtartam nem elegendő a teljes 100%-os csontosodás elérése szempontjából. Kiterjesztett hisztopatológiai követés érdekében készítettünk további mintákat is, ahol 6 hónapos β -TCP-AE-kezelt csontdefektus mintákat is vizsgáltunk. Amint látható az 26. ábrán, ekkor már 90% feletti szubtotális osszifikáció következik be, de a csontgerendák közt lévő fibrózus szövetben nem metabolizált szilika kristályok még mindig

detektálhatók idegentest típusú granulomatozus gyulladásos infiltrátumban (26 ábra). Ezt a tényt érdemes figyelembe venni, ha aerogél alapú csontpótlót használunk.

Csontpótló anyagok in vivo vizsgálatának hisztológiai kiértékelése során nemcsak hagyományos dekalcinált metszeteket, de natív kemény csontszövetből készült vékony csiszolatokat is érdemes használni, hogy az újdonszülött csont valós mésztartalmát megítélni tudjuk, valamint a graft- és recipiens szövet viszonyát jobban megérthessük, sejtszinten, mikroszkópos analízis segítségével is. Ennek érdekében paralell mintákon magunk is törekedtünk erre, de a vékony-csiszolat metszetkészítést nem tudtuk minden esetben reprodukálhatóan elvégezni, emiatt ennek eredményét első közleményünkben nem is publikáltuk.

A technikai problémák megoldása érdekében munkánk második részében a vékony-csiszolat készítés metodikai buktatóit vizsgáltuk, hogy arra hasznos megoldásokat találjunk.

A szövettani értékelés előfeltétele a megfelelő vékony csiszolat metszet készítése. Ez egy több lépcsős eljárási folyamat, melyben számos olyan tényező szerepel, amelyek nehezítik, akadályozzák a jó minőségű hisztopatológiai kiértékelés eredményességét. Ennek a több lépcsős folyamatnak leírását és az ahhoz kapcsolódó hisztopatológiai értékelését foglalja össze Troiano és munkatársai (190). Leírásuk szerint a fém implantátumok optimális feldolgozási módszere a hisztopatológiai értékeléshez a dekalcinálás nélküli szekciós perparációs eljárás. A dehidrációt, beágyazást és a titán-tartalmú csont blokk csiszolását követően a minta vastagsága 30- 100 mikronos nagyságban volt mérhető. Az egy sejtrétegű „monolayer” rétegvastagsághoz képest még ez is igen távol áll, amely a megfelelő hisztopatológiai értékeléshez lenne szükséges. Pazzaglia és mts. szerint vékony csiszolat esetén (15 mikron) a csont-implantátum határfelület jobban vizsgálható, mint vastagabb csiszolat esetén (191). Egy titán-csont tartalmú blokkból készülő csiszolat hisztopatológiai értékelésének sikerességét számos tényező befolyásolja, ezek közül csak az egyik a csiszolat megfelelő vastagsága. A beágyazott csont-implantátum szept mindkét oldalának csiszolásával elérhető a kívánt rétegvastagság, amennyiben a szept és a tárgylemez közötti adhézió elég erős a csiszolás és polírozás közben fellépő nyírószilárdsággal szemben. A nem megfelelő adhézió hiányában a szept-minta leválhat a tárgylemez üvegének felszínéről. Ennek kiküszöbölésére számos különböző módon felszínkezelte tárgylemez van, melyek felszíni

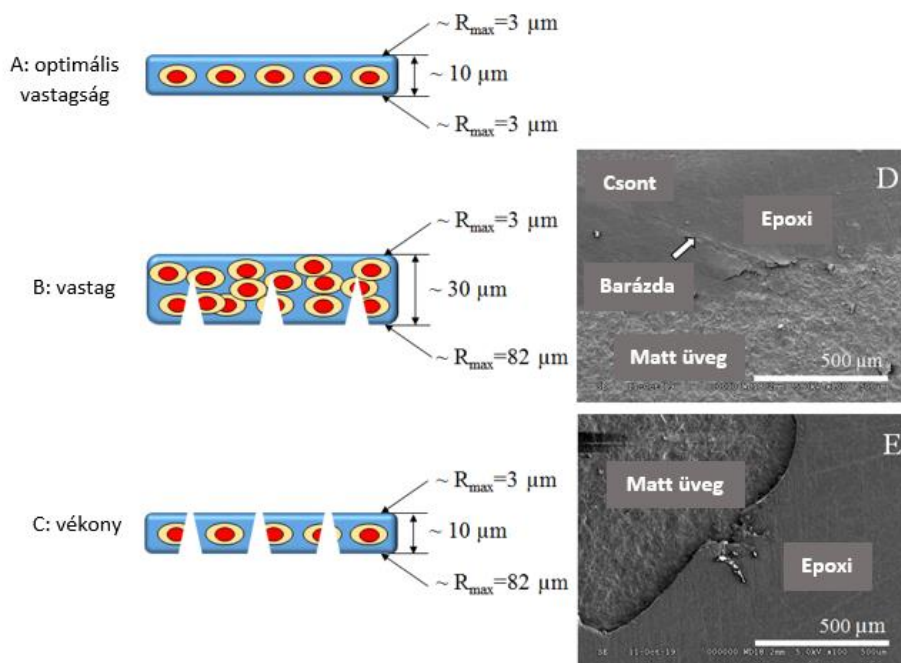
módosításának célja a jobb adhézió kialakítása a minta és a tárgylemez között, ezzel megakadályozva a fent említett problémát.

A pozitív töltésű üvegfelszín kialakítása történhet egy polimer réteggel, vagy kémiai folyamattal, amikor is kémiai csoportok kovalens kötással kötődnek az üveg szilika atomjaihoz. Kutatásunk során az üvegfelszín pozitív töltöttségét salétromsavas maratással érték el. Az adhézió növelésére egy másik lehetséges megoldás a mikromechanikai „interlocking”, amit homokfújással vagy savas maratással érhetünk el. Ezért vannak teljesen mattított tárgylemezek is, melyek ideálisak például vérvérképek vizsgálatára. A hisztotechnológiában használt mattító eljárások folyamán növelik a kötési erősséget az üvegfelszín és a minta között. A mattítás eredményeként keletkező mikrobarázdák az üveg felszínén növelik a felszín nagyságát, így nő az adhéziós felszín nagysága és kötési erőssége. Emellett a minta is tartalmaz mikrobarázdákat, karcolásokat, melyek tovább növelik az adhéziót. Itt érdemes kitekinteni az abrazív anyagok által okozott karcolások, mikrobarázdák és a minta rétegvastagsága viszonyára. Ehhez egy jól nedvesítő bond megválasztása szükséges. Megfelelő hidrophil tulajdonságának köszönhetően a bond képes bepenetrálni és kitölteni a felszín egyenetlenségeit.

A mintában az alábbi esetben alakulhatnak ki perforációk: vastag minta esetén, ha a minta csiszolása során a minta egész átmérőjében karcolások, mélyedések alakulnak ki, vagy ha túl vékony, a mintában egy perforáció alakulhat ki (27. ábra C), amely a minta tárgylemezről való leválásához is vezethet a nem megfelelő adhézió következményeként. Azért, hogy ez ne történhessen meg fontos egy adhezív anyag használata. Vastagabb minta esetében ez a perforáció nem biztos, hogy megjelenik, de ebben az esetben a vastagság zavarhatja a patológiai értékelést, bizonyos esetekben teljesen kivitelezhetetlenné teheti azt (27. ábra B). Egy ideális vékony csiszolat esetében a megfelelő rétegvastagság, polírozás, erős mechanikai és kémiai adhézió vezet a sikeres hisztopatológiai vizsgálathoz (27. ábra A).

A fent említetteket ismételve, a patológia értékeléshez használt vékonycsiszolat elkészítése egy többlépcsős folyamat. Az egyik legnagyobb nehézség a dekalcinálás nélküli vékony csiszolat készítésének folyamatában a megfelelő rétegvastagság létrehozása. Kutatásunk során megpróbáltuk a csont-titán és epoxi anyagokat tartalmazó szelet és a tárgylemez üvegfelszíne közötti adhéziót kémiai és mikromechanikai úton növelni, hogy a későbbi csiszolás során megfelelő rétegvastagságú vékonycsiszolat

készülhessen. Elsődleges célunk az adhézió növelése volt a 10-MDP tartalmú adhezív bond és a tárgylemez között, az üvegfelszín savazásával és protonálásával. A csiszolás során alkalmazott abrazív papír és a minta között fellépő nyíróerő miatt a vizsgált mintáknál nyíró szilárdság mérés történt.



27. ábra

(A) mindkét oldalán csiszolt minta sematikus ábrája optimális rétegvastagság esetén (B) vastag minta, egyik oldalán optimális csiszolással (C) vékony minta, egyik oldalán optimális csiszolással (D) pásztázó elektron mikroszkópos (PEM) kép a minta elválását mutatja a homokfűjt üvegfelszínről, csiszolás okozta mély barázdával (nyíl) (E) PEM kép perforált csont mintáról

A mérések alapján a termoplasztikus adhezívnek volt a legkisebb kötési ereje (24. ábra 1. csoport). A termoplasztikus adhezív egy magas viszkozitású (6000 cps 121⁰ C fokon) hőre olvadó anyag. Penetrációs képessége a felszín irregularitását tekintve csekély, nem képes sima üvegfelszínhez való kötődésre, ami a minták 80%-ának esetében volt adhezív miatt megfigyelhető kötődési hiba (25. ábra). Az esetek többségében a termoplasztikus anyag elvált a sima üvegfelszíntől. Kisebb százalékban volt kohezív szakadás magában a termoplasztikus anyagban. A magas viszkozitás miatt a lehülést követően számos apró légbuborék volt megfigyelhető az anyagban, amely a későbbi kohezív szakadási

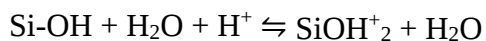
probléma okozójaként szerepelhet. Méréseink alapján a mattított üveg 10- MDP tartalmú bond adhezívvel (24. ábra 2. csoport) alkalmazva szignifikánsan magasabb nyíróerő szilárdságot mutatott a csont és titán anyagok esetében, mint ugyanezen anyagok termoplasztikus adhezívvel történő használata során (24. ábra 1. csoport). Az epoxi gyanta esetében a különbség nem volt szignifikáns, de a kohezív szakadások száma megemelkedett a termoplasztikus adhezív esetében, amely mutatja a mikromechanikai retenció jelentőségét, amely a megfelelő nedvesítőképesség is jellemez (4. táblázat). A homokfűjás következtében kialakult érdesebb üvegfelszín a megnövekedett felület miatt fokozza az adhéziót hatékonyságát. Az adhézió hatékonyságának növelésének egy ismert módja a fogászatban a mikromechanikai retenció alkalmazása a fogfelszínen, vagy a fogpótláson (192). A polimerizált epoxi gyanta az MDP tartalmú bonddal érdesített és protonált üvegfelszínen ugyanolyan nagyságú nyíró szilárdsági értéket mutat, mint a termoplasztikus adhezív (24. ábra).

Az EpoFix összetevői a DGEBA (diglicidil éter biszfenol A) prepolimer gyanta és TETA (tri-etilén-tetra-amin) hálósító anyag. A polimerizáció végén hidroxil csoportok alakulnak ki a polimer láncon (193). A kontaktszög mérések alapján az epoxi gyanta felszíne hidrofób tulajdonsággal rendelkezik (4. táblázat), de az MDP tartalmú bond könnyen tudja nedvesíteni ezt a felszínt is az etanol tartalmának köszönhetően (23. ábra). A megkötött epoxi polimer felszíne a kémiaiilag polimerizálható vagy reaktív molekula végződés hiánya miatt egy „inert” felszínnek tekinthető. Így az epoxi gyanta a kezelt üvegfelszín felületéhez elsődlegesen a 10-MDP tartalmú adhezíven keresztül tud kötődni mikromechanikai retenció révén. Ebből a szempontból az adhezívnek egy igen jelentőségteljes szerepe van a nedvesítésben az epoxi felületén, ami hozzájárul a üvegfelszínhez való adhézió létrejöttében. A kezelt és protonált üvegfelszín esetében a 2. típusú adhezív szakadás (12. és 24. ábra) csak kis százalékban (11%) jelentkezett, míg ugyanez a típusú szakadás teljesen hiányzott a protonálás nélkül használt üvegfelszínnek esetében. Ez arra enged következtetni, hogy protonált üvegfelszín esetében erősebb kötés tud létrejönni az üveg és az MDP tartalmú bond között, mint a nem protonált üveg esetében. Mivel az epoxinak nincs szabad vegyértéke, amivel az MDP-hez kötődni tudna, így a 2. típusú szakadás a minta anyag és az MDP között fog bekövetkezni. Ez a típusú szakadás hozzájárul ahhoz a megállapításhoz, hogy nincs szignifikáns különbség a protonált és nem protonált variációk között. Ebben a kutatásban kereskedelmi forgalomban kapható 10-MDP-t alkalmazva növeltük az adhéziót az üveg felszíne és a

dekalcinálás nélkül készült minta között. Az irodalomban található hisztotechnológiai eljárás, mely szerint a 10-MDP anyag felhasználható adhézió fokozás céljából leírja a 10-MDP pozitív hatását a csont és titán felszínre. Számos tanulmány szerint fontos a 10-MDP tartalmú bond használata a csont és titán anyagok esetén (162, 163). A 10-MDP egy bifunkcionális molekula, egyik vége a hidroxí-apatit kalcium ionjához tud kötődni, míg másik vége az alkalmazott gyanta monomerjeit tudja polimerizálni megvilágítás közben. Meerbek és mtsai. leírása alapján a 10-MDP foszfát csoportja kémiai kötést tud létrehozni az apatit kalcium ionjával, ahol a metakrilát csoportok egymás felé, míg a foszfát csoportjaik egymástól elfelé irányulnak (163). Tsuchimoto és mtsai. nyírószilárdsági méréssel vizsgálták a 10-MDP tartalmú primer hatását titán és gyanta alapú cementen. Eredményeik szerint a legerősebb kötés 10wt% 10-MDP primer esetében volt mérhető titán felszíneken (194). Fotoelektron spektroszkópos vizsgálatok alapján a desztillált vizes mosás ellenére is láthatóak foszfor (P) nyomok a 10-MDP adhezívvvel kezelt titán felszíneken. Kezeletlen titán felszíneken ez a foszfor a mérhető egységnyi határ alatt volt. A P és a Ti aránya függ a polifoszforsav koncentrációjától. Ezek a kémiai összefüggések határozzák meg a csont, a titán és az üveg felszíne között kialakuló adhézió erősségét. Méréseink alapján a kezelt üvegfelszín és 10-MDP adhezív alkalmazása csont és titán minták esetében létrejövő kémiai kötődés hozzájárult a megemelkedett SBS értékekhez (24. ábra). Csont minták esetében az 1. és 2. csoportok között szignifikáns különbség van a nyírószilárdság értékek szerint. Az 1. típusú adhezív szakadás csökkent (25. ábra), ami mutatja, hogy az alacsony viszkozitású 10-MDP tartalmú bond könnyedén befolyik a felszín irregularitásiba, ezzel biztosítva a mikromechanikai kapcsolódást. Epoxi minta 2.csoportjában az 1.típusú kohezív szakadás mértéke megemelkedett. Ez mutatja az apatit kalcium ionjai és a 10-MDP aktív foszfát csoportjai között létrejövő erős kötést, mely már számos más tanulmányban is bizonyítva volt.

Az üvegfelszín protonálása általában az üvegfelszín tisztításában vagy a felület aktiválásában gyakran alkalmazott módszer. XPS eredmények alapján nátrium és kalcium ionok az üveg felszín savas maratásának következtében szabadulnak fel (21. ábra, 3. táblázat). Ezek az eredmények kapcsolódnak Jang és mtsai. eredményeihez (195). Kutatásunk során a tárgylemez salétromsavas kezelése egy új lehetőség volt a dekalcinálás nélkül készülő minták üveg felszínhez való kötődésének erősítésére. A nyíró szilárdsági mérések eredményei alapján megállapítható, hogy van a savazásnak egy

optimális ideje, ami 3 órás maratást jelent (20. ábra). Vizes közegben az üvegfelszín hidroxilációja szilanol csoportok (Si-OH) keletkezését eredményezi. A felszínen elhelyezkedő (Si-OH) szilanol csoportok a salétromsavas oldatból a következő reakción keresztül könnyen fel tudnak venni egy prtotont (196):

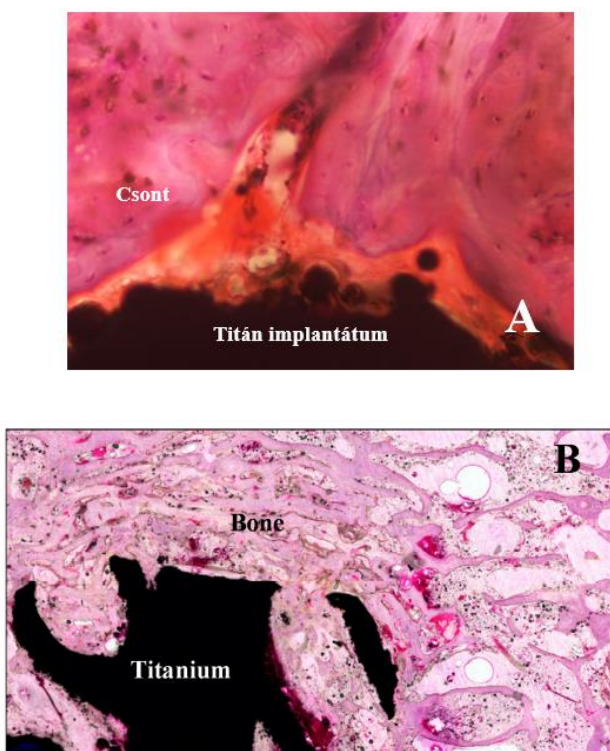


Ezért van, hogy az üveg alkotóelemei a salétromsavas kezelés után pozitív töltéssel rendelkeznek savas pH alatt/mellett (3. táblázat). A kontaktszög mérések eredményei alapján megállapítható, hogy az adhezívnek jobb nedvesítő képessége van a savazással kezelt, pozitív töltésű üvegfelületen, mint a nem protonált felszínen, amely a kémiai adhézió révén hozzájárul az erősebb kötődéshez (4. táblázat). A zéta potenciál mérések alapján a salétromsavas kezelést követően az üvegfelszínnek pozitív töltése lesz (2. táblázat). Pazinato és mtsai leírták, hogy a savazásnak kitett üveg felszíneken oldhatatlan szilika sók keletkeztek. Ezek a kicsapódott sók még ultrahangos mosással sem távolíthatók el (175). Az XPS mérések szerint a lúgosodás folyamata a savas kezelés következménye, amikor is az alkalikus ionok kimosódnak az üveg felszínéből (21. ábra, 3. táblázat) oldhatatlan sókat képezve azon. A 10-MDP tartalmú adhezívek PO_4 csoportjához való kötődésük által ezek a felszínen kicsapódott sók erősítik a kémiai kötést. Lee és mtsai eltérő kölcsönhatást írtak le a cirkónium primer (MDP) és a „glazúrozott” felszín között (197). Ebből adódóan feltételezhető, hogy a Pazinato által leírt üvegfelszínen kicsapódott oldhatatlan sók meghatározó tényezői az üvegfelszín és az MDP tartalmú adhezív kémiai kötésének (175).

Csont és titán mintáknál az MDP tartalmú bond erősebb kötést eredményezett méréseink szerint protonált üvegfelszínhez, mint nem protonálthoz (24. ábra). A kutatások alapján megállapítható, hogy a pozitívan töltött felület – amennyiben az apatit Ca^{2+} - a 10-MDP foszfát csoportjához való kötődést kedvezően befolyásolja. Az üveg felszín protonálásával a SiOH^+_2 pozitív töltésű ionok keletkeznek a felszínen, ami megmagyarázza a kohezív szakadások gyakori előfordulását csont mintáknál (25. ábra). Titán minták esetében a 10-MDP tartalmú bond erősebb adhezívnek bizonyult a termoplasztikus adhezívénál. Protonált üveg felszínek esetében a nyírószilárdság értékek szignifikánsan emelkedtek és a titán mintáknál volt a legmagasabb a 2.típusú kohezív szakadások száma. Ennek magyarázata a titán és a 10-MDP adhezív között kialakult erős ionos kötés, melyet tanulmányok támasztanak alá. Így összefoglalásként elmondható,

hogyan az üvegfelszín protonálása mellett, a különböző anyagok (epoxi, csont, titán), és az alkalmazott ragasztó (MDP tartalmú bond és gyanta) is befolyással vannak a szakadások típusára (adhezív vagy kohezív) és a nyírószilárdság mérés eredményeire.

A 28. képen látható egy vastag (A) és egy ideális (B) vastagságú vékonycsiszolat hematoxilin-eosin (HE) festést követően. Titán anyagot tartalmazó csont mintából készülő vékonycsiszolat készítésének lépéseit a 29. ábra mutatja be.

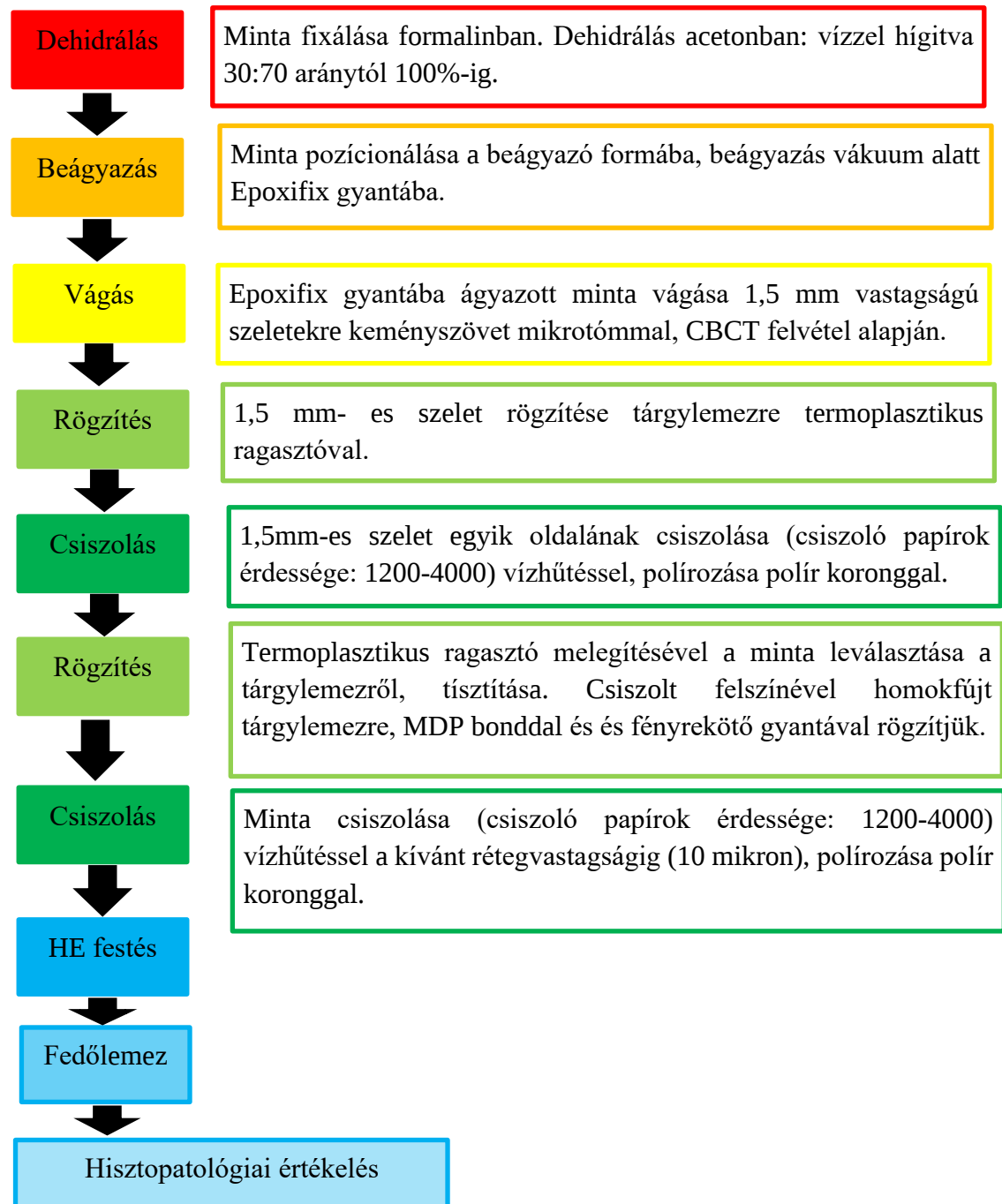


28. ábra

Vékony csiszolat metszetek hematoxilin-eosin festéssel, 3 hónapja behelyezett titán implantátumokkal: (A), csiszolat vastagsága 30 μm , ahol látható a titánt körülvevő csontosodott szél, azonban a szövettani részletek már nem követhetők (B), vékony csiszolat metszet 10 μm vastagságban, itt már jól kivehető a csont szövettani szerkezete, hasonlóan a hagyományos metszetekhez. Eredeti nagyítás mindkét kép esetében: 10x

Eredményeink alapján a dekalcinálás nélkül készülő, titán anyagot tartalmazó csont vékonycsiszolatok nyírószilárdsági értéke magasabb volt 10-MDP adhezív alkalmazása esetén, mint a termoplasztikus adhezív során. Az MDP tartalmú bond anyagok kémiai-

mikromechanikai retenciót növelve több kohezív szakadási típust eredményeznek és magasabb nyírószilárdsági értékeket mutatnak. Az üveg salétromsavas kezelése pozitív töltésű motívumot eredményez a felszínen, ami előnyösen befolyásolja az MDP nedvesítő képességét és a nyírószilárdsági mérések eredményeit.



29. ábra

Munkánk során készült vékony csiszolat metszetek előállításának folyamat ábrája

5.1. PhD értekezés alapját szolgáló jelen kutatások új megállapításai

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 foszfátáz és az oszteogenezisben résztvevő gének egy részének mérsékelt emelkedése utalt.

3. *In vivo* vizsgálatokat követően hisztopatológiaiilag 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 nagyobb részben 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-alloplastokat 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 -trikálcium-foszfát aerogél) kompozit anyagok fiziko-kémiai karakterizálását és *in vitro* sejtbiológiai hatásait vizsgáltuk, melyek non-toxikusnak és SAOS-2 sejtvonalon oszteoblasztos differenciációt elősegítőknak 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-nel 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* képződött csontosodási szigetek kialakulása oszteoid mátrixszal 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 (véltetően autokrín és parakrín regulációval) oszteogén sejtes differenciációt, majd csontképzést eredményeznek. Figyelemre méltó azonban, hogy 3 hónap elteltével a folyamat még nem végződik teljes (100%-os) csontos defektuszárással, a lobos kötőszövetben a csekély mennyiségű nem metabolizált szilikamaradványokkal asszociáltan alacson intenzitású granulomatozus gyulladás még jelen van, további újdonszövetképződött 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.

Summary

For bone substitutions, bioceramic-alloplasts maybe applied which preferably facilitate bone's repair by an osteoinduction, therefore, can be useful in reconstructive orthopedics, jaw surgery or even in the process of dental implantology or parodontology, as well.

In the present study we constructed mesoporous silica aerogel (AE) and β -TCP-AE (β -tricalcium phosphate aerogel) composite materials for grafts to substitute bone defects. They were physicochemically characterized and proved to be non-toxic on cells applied. The materials have shown *in vitro* osteoinductive effects on a SAOS-2 cell line, indicating appropriate for grafting into a bone defect. Accordingly, *in vivo* studies with these materials on rat's calvaria bone confirmed that when 8 mm size bone defects were reconstructively substituted with either material, both, but to a larger extent the β -TCP-AE showed an intense osteoconductive bone repair along the lateral edges of the defect, i.e., arising from the remaining bone-rim, manifested as early as the 1st month which developed further by the 3rd month, respectively. In addition, foci of intralesional calcifications with early *de novo* ossifications were also detected (i.e., independently from the lateral bony edges) characterized by osteoid matrix formation surrounded by osteoblasts in active cell cycle, reflecting osteoinduction. According to the histopathological results, the ossification processes are mediated by the presence of capillary-rich granulation tissue formation combined with the silica AE-induced foreign body giant cell granulomatous chronic fibrosing inflammation and, in turn, the activated macrophages and other cellular elements (most likely via autocrine and paracrine regulations) appear stimulate the osteoblastic differentiation toward new bone formations. Remarkably, however, by the 3rd month of observational time a completed (100%) ossification of the defect could not be detected. Instead, within the remaining inflamed fibrous tissues small amounts of non-metabolized crystalloid silica remnants were found and an associated persistent low grade giant cell granulomatous inflammation while islets of additional new bone formations are being in progress.

Originally, we wished to evaluate the real mineralized quantities of the osteoid matrix for the newly formed bone tissues within the defect using thin ground sections of the native (non-decalcified) hard tissue samples. However, we could not prepare such ground sections in a reproductive fashion, due to technical problems. Therefore, during the second part of our studies we established a modified method for preparing thin ground sections even from titanium-containing hard bony tissue samples. Accordingly, when

using frosted slides with surface protonation followed by a 10-MDP adhesive bond's application, thin ground sections can readily be made in a reproductive fashion.

7. Irodalom

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. Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG, et al. Bone graft, derivatives & substitutes. Cambridge, Butterworth-Heinemann, 1994, 3-102
3. Flati G, Di Stanislao C. Chirurgia nella preistoria. Parte I. Provincia Med Aquila. 2004, 2, 8-11
4. De Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop.* 1988, 226, 293-8
5. van Meekeren J. Heel-en geneeskunstige aanmerkingen. Commelijn, 1668
6. Peltier LF. Bone-graft surgery. *Clin Orthop.* 1996, 324, 5- 12
7. Peltier LF. Transplantation of tissue from lower animals to man. *Clin Orthop.* 2000, 371. 3-9
8. Saroch N. Periobasics. A textbook of periodontics and implantology. 2017, ISBN: 8193473000, 9788193473009
9. Böhner M, Bastien Le Gars, Santoni B, Döbelin N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomaterialia.* 2020, 113, 23–41
10. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004, 62, 6: 724–729
11. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CJ. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration *Biomaterials Research.* 2019, 23:4
12. Wells HG. Pathological calcification. *The Journal of medical research.* 1906, 14:491
13. Albee FH. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg.* 1920, 71:32
14. Schram W, Fosdick L. Stimulation of healing in long bones by use of artificial material. *J Oral Surg.* 1948, 6: 209

15. Norman ME, et al. An in-vitro evaluation of coralline porous hydroxyapatite as a scaffold for osteoblast growth. *Clin Mater*. 1994, 17:85–91
16. Dekker R, et al. Bone tissue engineering on calcium phosphate-coated titanium plates utilizing cultured rat bone marrow cells: a preliminary study. *JMSMM*. 1998, 9:859–63
17. Friedman CD, et al. BoneSource™ hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J Biomed Mater Res*. 1998, 43: 428–32
18. Ben-Nissan B. *Advances in calcium phosphate biomaterials*; 2014.
19. Frank O, et al. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem*. 2002, 85: 737–46.
20. Shea JE, Miller SC. Skeletal function and structure: implications for tissue- targeted therapeutics. *Adv Drug Del Rev*. 2005, 57: 945–57
21. Whited BM, et al. Osteoblast response to zirconia-hybridized pyrophosphate-stabilized amorphous calcium phosphate. *J Biomed Mater Res A*. 2006, 76: 596–604
22. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. in *osteoimmunology*. Boston: Springer, 2009. 43–9
23. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*. 2010, 77: 4–12
24. Peacock M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010, 5: S23–30
25. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007, 40: 251–64
26. Kuroda Y, et al. Osteoblasts induce Ca_2^+ oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105: 8643–8
27. Julien M, et al. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblast: role of ERK1/2 and Fra-1. *J Bone Miner Res*. 2009, 24: 1856–68

28. Tada H, et al. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone*. 2011, 48: 1409–16
29. Mozar A, et al. High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK–RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*. 2008, 215: 47–54
30. Zhang R, et al. Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation. *J Bone Miner Res*. 2011, 26: 1047–56
31. Liu DM, Troczynski T, Tseng WJ. Water-based sol–gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*. 2001, 22: 1721–30
32. Song Y, et al. Electrodeposition of ca–P coatings on biodegradable mg alloy: in vitro biomineralization behavior. *Acta Biomater*. 2010, 6:1736–42
33. Arce JE, et al. Calcium phosphate–calcium titanate composite coatings for orthopedic applications. *Ceram Int*. 2016, 42:10322–31
34. Wang MJ, Chao SC, Yen SK. Electrolytic calcium phosphate/zirconia composite coating on AZ91D magnesium alloy for enhancing corrosion resistance and bioactivity. *Corros Sci*. 2016, 104: 47–60
35. Bhaskar SN, Brady JM, Getter L, Grower MF, Driskell T. Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1971, 32: 336–346
36. Getter L, Bhaskar NS, Cutright DE, Perez B, Brady JM, Driskell TD, O’Hara MJ. Three biodegradable calcium phosphate slurry implants in bone. *J. Oral Surg Chic*. 1972, 30, 4: 263–268
37. Roberts Jr. SC, Brilliant JD. Tricalcium phosphate as an adjunct to apical closure in pulpless permanent teeth. *J. Endod*. 1975, 1, 263–269
38. Nery EB, Lynch KL, Rooney GE. Alveolar ridge augmentation with tricalcium phosphate ceramic. *J Prosthet Dent*. 1978, 40: 668–675.

39. Köster K, Karbe E, Kramer H, Heide H, König R. Experimenteller knochen- ersatz durch resorbierbare calciumphosphat-keramik. *Langenbecks Arch Chir.* 1976, 341: 77–86
40. Cameron HU, Macnab I, Pilliar RM. Evaluation of a biodegradable ceramic. *J Biomed Mater Res.* 1977, 11: 179–186
41. Köster K, Heide H. Bioaktive calciumphosphat keramik für den Knochen- und Zahnersatz. *Biotech Umschau.* 1978, 2: 226–229
42. Jarcho M, Salsbury RL, Thomas MB, Doremus RH. Synthesis and fabrication of b-tricalcium phosphate (whitlockite) ceramics for potential prosthetic applications. *J Mater Sci.* 1979, 14: 142–150
43. Riess G, H. Heide H, Köster K, Reiner R. Erste klinische und tierexperimentelle Erfahrungen mit tricalciumphosphat (TCP)-implantaten. *Dtsch Zahnärztliche Z.* 1978, 33: 287
44. Curry NA, Jones DW. Crystal structure of brushite, calcium hydrogen orthophosphate dihydrate: a neutron-diffraction investigation. *J Chem Soc A Inorg Phys Theor.* 1970, 0: 3725–3729
- 45 Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates (CaPO) and dentistry. *Bioceram Dev Appl.* 2016, 6:2 DOI: 10.4172/2090-5025.100009
46. Fletcher J, Walsh D, Fowler CE, Mann S. Electrospun mats of PVP/ ACP nanof ibres for remineralization of enamel tooth surfaces. *Crystengcomm.* 2011, 13: 3692-3697
47. Uysal T, Baysal A, Uysal B, Aydinbelge M, Al-Qunaian T. Do fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate affect shear bond strength of orthodontic brackets bonded to a demineralized enamel surface? *Angle Orthod.* 2011, 81: 490-495
48. Tabrizi A, Cakirer B. A comparative evaluation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and fluoride on the shear bond strength of orthodontic brackets. *Eur J Orthod.* 2011, 33: 282-287

49. Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J. Effects of CPPACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: a quantitative assessment using micro-computed Tomography. *J Dent*. 2011, 39: 405-413
50. Skrtic D, Antonucci JM. Bioactive polymeric composites for tooth mineral regeneration: physicochemical and cellular aspects. *J Funct Biomater*. 2011, 2: 271-307
51. Chow CK, Wu CD, Evans CA. In vitro properties of orthodontic adhesives with fluoride or amorphous calcium phosphate. *Int J Dent*. 2011, 2011: 583521
52. Foster JA, Berzins DW, Bradley TG. Bond strength of an amorphous calcium phosphate-containing orthodontic adhesive. *Angle Orthod*. 2008, 78: 339-344
53. Sun W, Zhang F, Guo J, Wu J, Wu W. Effects of amorphous calcium phosphate on periodontal ligament cell adhesion and proliferation in vitro. *J Med Biol Eng*. 2008, 28: 107-112
54. Uysal T, Ulker M, Baysal A, Usumez S. Microleakage between composite-wire and composite-enamel interfaces of flexible spiral wire retainers. Part 2: Comparison of amorphous calcium phosphate-containing adhesive with conventional lingual retainer composite. *Eur J Orthod*. 2009, 31: 652-657
55. Uysal T, Ulker M, Akdogan G, Ramoglu SI, Yilmaz E. Bond strength of amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composite used as a lingual retainer adhesive. *Angle Orthod*. 2009, 79: 117-121
56. Sanada Y, Fujinaka T, Yoshimine T, Kato A. Optimal reconstruction of the bony defect after frontotemporal craniotomy with hydroxyapatite cement. *J Clin Neurosci*. 2011, 18: 280-282
57. Hicks MJ, Flaitz CM. Enamel caries formation and lesion progression with a fluoride dentifrice and a calcium-phosphate containing fluoride dentifrice: A polarized light microscopic study. *ASDC J Dent Child*. 2000, 67: 21-28
58. Sullivan RJ, Masters J, Cantore R, Roberson A, Petrou I, et al. Development of an enhanced anticaries efficacy dual component dentifrice containing sodium fluoride and dicalcium phosphate dihydrate. *Am J Dent*. 2001, 14: 3A-11A

59. Silva MFDA, Melo EVDS, Stewart B, De Vizio W, Sintes JL, et al. The enhanced anticaries efficacy of a sodium fluoride and dicalcium phosphate dihydrate dentifrice in a dual-chambered tube. A 2-year caries clinical study on children in Brazil. *Am J Dent*. 2001, 14: 19A-23A
60. Niwa M, Sato T, Li W, Aoki H, Aoki H, et al. Polishing and whitening properties of toothpaste containing hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2001, 12: 277-281
61. Sintes JL, Elías-Boneta A, Stewart B, Volpe AR, Lovett J. Anticaries efficacy of a sodium monofluorophosphate dentifrice containing xylitol in a dicalcium phosphate dihydrate base. A 30-Month Caries Clinical Study In Costa Rica. *Am J Dent*. 2002, 15: 215-219
62. Jeong SH, Jang SO, Kim KN, Kwon HK, Park YD, et al. Remineralization potential of new toothpaste containing nano-hydroxyapatite. *Key Eng Mater*. 2006, 309-311: 537-540
63. Lv K, Zhang J, Meng X, Li X. Remineralization effect of the nano-HA toothpaste on artificial caries. *Key Eng Mater*. 2007, 330-332: 267-270
64. Uysal T, Amasyali M, Ozcan S, Koyuturk AE, Akyol M, et al. In vivo effects of amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composite on enamel demineralization around orthodontic brackets. *Aust Dent J*. 2010, 55: 285-291
65. Uysal T, Amasyali M, Koyuturk AE, Ozcan S, Sagdic D. Amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composites. Do they prevent remineralisation around orthodontic brackets? *Aust Orthod J*. 2010, 26: 10-15
66. Bröchner A, Christensen C, Kristensen B, Tranæus S, Karlsson L, et al. Treatment of post-orthodontic white spot lesions with casein phosphopeptide-stabilised amorphous calcium phosphate. *Clin Oral Investig*. 2011, 15: 369-373
67. Antonucci JM, Skrtic D. Fine-tuning of polymeric resins and their interfaces with amorphous calcium phosphate, a strategy for designing effective remineralizing dental composites. *Polymers*. 2010, 2: 378-392
68. Beerens MW, Van Der Veen MH, Van Beek H, Ten Cate JM. Effects of casein phosphopeptide amorphous calcium fluoride phosphate paste on white spot lesions and

dental plaque after orthodontic treatment: A 3-month follow-up. *Eur J Oral Sci.* 2010, 118: 610-617

69. Zhao J, Liu Y, Sun WB, Zhang H. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chem Cent J.* 2011, 5: 40

70. Gupta R, Prakash V. CPP-ACP complex as a new adjunctive agent for remineralisation: A Review. *Oral Health Prev Dent.* 2011, 9: 151-165

71. Zhang Q, Zou J, Yang R, Zhou X. Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. *Int J Paediatr Dent.* 2011, 21: 374-381

72. Nicholson JW, Hawkins SJ, Smith JE. The incorporation of hydroxyapatite into glass-polyalkenoate (“glass-ionomer”) cements: A preliminary study. *J Mater Sci Mater Med.* 1993, 4: 418-421

73. Enan ET, Hammad. Microleakage under orthodontic bands cemented with nano-hydroxyapatite-modified glass ionomer. *Angle Orthod.* 2013, 83: 981-986

74. Seifi M, Arayesh A, Shamloo N, Hamed R. Effect of nanocrystalline hydroxyapatite socket preservation on orthodontically induced inflammatory root resorption. *Cell J.* 2015, 16: 514-527

75. Ajami S, Pakshir HR, Babanouri N. Impact of nanohydroxyapatite on enamel surface roughness and color change after orthodontic debonding. *Prog Orthod.* 2016, 17: 11

76. Saint-Surin I, Castrot R, Vandersteen C, Oueiss A, Savoldelli C. Combined mentalis weakening and periosteal flaps in mandibular anterior alveolar corticotomy-assisted orthodontics with bone grafting. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2021, 122: 311-314

77. Köle H. Surgical operations on the alveolar ridge to correct occlusal abnormalities. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol.* 1959, 12: 515–29 [http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220\(59\)90153-7](http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220(59)90153-7)

78. Wilcko MT, Wilcko WM, Pulver JJ, Bissada NF, Bouquot JE. Accelerated osteogenic orthodontics technique: a 1-stage surgically facilitated rapid orthodontic technique with alveolar augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009, 67: 2149–59 <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2009.04.095>.

79. Wilcko WM, Wilcko T, Bouquot JE, Ferguson DJ. Rapid orthodontics with alveolar reshaping: two case reports of decrowding. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2018, 38: 516 <http://dx.doi.org/10.11607/prd.00.0403>
80. Coscia G, Coscia V, Peluso V. Augmented corticotomy combined with accelerated orthodontic forces in Class III orthognathic patients: Morphologic aspects of the mandibular anterior ridge with cone-beam computed tomography. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013, 71:1760
81. Roblee RD, Bolding SL, Landers JM. Surgically facilitated orthodontic therapy: A new tool for optimal interdisciplinary results. *Compend Contin Educ Dent*. 2009, 30: 264
82. Wilcko WM, Wilcko T, Bouquot JE, et al. Rapid orthodontics with alveolar reshaping: Two case reports of decrowding. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001, 21: 9
83. Murphy KG, Wilcko MT, Wilcko WM, et al. Periodontal accelerated osteogenic orthodontics: A description of the surgical technique. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009, 67: 2160
84. Bogoch E, Gschwend N, Rahn B, et al. Healing of cancellous bone osteotomy in rabbits—Part I: Regulation of bone volume and the regional acceleratory phenomenon in normal bone. *J Orthop Res*. 1993, 11: 285
85. Antonarakis GS, Joss CU, Triaca A, Kuijpers-Jagtman AM, Kiliaridis S. Gingival recessions of lower incisors after proclination by orthodontics alone or in combination with anterior mandibular alveolar process distraction osteogenesis. *Clin Oral Investig*. 2017, 21: 2569–79 <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-017-2056-8>
86. Yared KFG, Zenobio EG, Pacheco W. Periodontal status of mandibular central incisors after orthodontic proclination in adults. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2006, 130: e1–8 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2006.01.015>
87. Ahn HW, Lee DY, Park YG, et al. Accelerated decompensation of mandibular incisors in surgical skeletal Class III patients by using augmented corticotomy: A preliminary study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012, 142: 199

88. Kim SH, Kim I, Jeong DM, et al. Corticotomy-assisted decompensation for augmentation of the mandibular anterior ridge. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011, 140: 720
89. Iino S, Sakoda S, Ito G, et al. Acceleration of orthodontic tooth movement by alveolar corticotomy in the dog. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007, 131: 448
90. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001, 10: S96–S101 DOI 10.1007/ s005860100282
91. Böhner M, Lemaître J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*. 2009, 30: 2175–2179.
92. Lu X, Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials*. 2005, 26: 1097–1108
93. Böhner M, Miron RJ. A proposed mechanism for material-induced heterotopic ossification. *Mater Today*. 2019, 22: 132–141
94. Ohtsuki C, Kokubo T, Neo M, Kotani S, Yamamuro T, Nakakura T, Bando Y. Bone-bonding mechanism of sintered β -3CaOP₂O₅. *Phosphorus Res Bull*. 1991, 1: 191–196
95. Neo M, Kotani S, Fujita Y, Nakamura T, Yamamuro T, Bando Y, Ohtsuki C, Kokubo T. Differences in ceramic-bone interface between surface-active ceramics and resorbable ceramics: a study by scanning and transmission electron microscopy. *J Biomed Mater Res*. 1992, 26: 255–267
96. Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Kokubo T, Takeuchi H. Four calcium phosphate ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. *Biomaterials*. 1993, 14: 216–224
97. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Öhman A. Osseointegrated titanium implants in the treatment of the edentulous jaw. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1977, 11, 16:1–175
98. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981, 52: 155–170

99. Dorland's Illustrated Medical Dictionary 32nd Edition. Saunders 2011, 1950 eBook ISBN: 9781455709854
100. 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
101. Brazete D, Torres PMC, Abrantes JCC, Ferreira JMF. Influence of the Ca/P ratio and cooling rate on the allotropic $\alpha \leftrightarrow \beta$ -tricalcium phosphate phase transformations. *Ceram Int*. 2018, 44, 8249–8256
102. Akao M, Aoki H, Kato K, Sato A. Dense polycrystalline β -tricalcium phosphate for prosthetic applications. *J Mater Sci*. 1982, 17, 343–346
103. 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
104. 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
105. Enderle R, Gotz-Neunhoeffler 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
106. Kannan S, Goetz-Neunhoeffler F, Neubauer J, Ferreira JMF. Synthesis and structure refinement of zinc-doped β -tricalcium phosphate powders. *J Am Ceram Soc*. 2009, 92, 1592–1595
107. 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
108. Torres PMC, Abrantes JCC, Kaushal A, Pina S, Döbelin N, Böhner M, Ferreira JMF. Influence of Mg-doping, calcium pyrophosphate impurities and cooling rate on the

allotropic $\alpha \leftrightarrow \beta$ -tricalcium phosphate phase transformations, J Eur Ceram Soc. 2016, 36, 817–827

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

110. 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

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

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

113. 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

114. 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

115. Galea L, Böhner M, Thuring J, Dobelin 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

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

117. GarcíaGonzalez CA, Budtova T, Duaes L, Erkey C, DelGaudio P, Gurikov P, Koebel M, Liebner F, Neagu M, Smirnova I. An opinion paper on aerogels for biomedical and environmental applications. Molecules 2019, 24, 1815.

118. Kistler S.S. Coherent expanded aerogels and jellies. *Nature*. 1931, 127, 741
119. Kistler S.S. Coherent expanded aerogels. *Journal of Physical Chemistry*. 1932, 36,1: 52-64
120. Labs aerogel sets new record. Web: <https://str.llnl.gov/str/October03/NewsOctober03.html>
121. Frickie J, Emmerling A. Aerogels-preparation, properties, applications. *Structure and Bonding*.1992, 77, 37-87
122. 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.
123. 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.
124. Kuttor A, Melinda S, Rente T, et al. Preparation and application of highly porous aerogel-based bioactive materials in dentistry. *Front Mater Sci*. 2014, 8,(1): 46–52
125. Rubin M, Lampert CM. Transparent silica aerogels for window insulation. *Solar Energy Materials*. 1983, 7, 393-400
126. 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
127. 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
128. Wittwer V. Development of aerogel windows. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1992, 145, 233-236
129. Jensen KI. Passive solar component based on evacuated monolithic silica aerogel. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1992, 145, 237-239
130. Gao S, Wang Y, Wang T, Luo G, Dai Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. *Bioresource Technology*. 2009, 100, 996-999

131. Novak Z, Habulin M, Krmelj V, Knez Z. Silica aerogels as supports for lipase catalyzed esterifications at sub- and supercritical conditions. *Journal of Supercritical Fluids*. 2003, 27, 169-178
132. Maury S, Buisson P, Perrard A, Pierre AC. Influence of the sol-gel chemistry on the activity of a lipase encapsulated in silica aerogel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004, 29, 133-148
133. El Rassy H, Maury S, Buisson P, Pierre AC. Hydrophobic silica aerogel-lipase biocatalysts. Possible interactions between the enzyme and the gel. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2004, 350, 23-30
134. Smirnova I, Mamic J, Arlt W. Adsorption of drugs on silica aerogels. *Langmuir*. 2003, 19, 8521-8525
135. Lin Y.-F, Ko CC, Chen CH, Tung KL, Chang, KS. Reusable methyltrimethoxysilane based mesoporous water-repellent silica aerogel membranes for CO₂ capture. *Royal Chemical Society Advances*. 2014, 4, 1456
136. Wörmeyer K, Smirnova I. Adsorption of CO₂, moisture and ethanol at low partial pressure in aminofunctionalised silica aerogels. *Chemical Engineering Journal*. 2013, 225, 350-357
137. E. Barrios, D. Fox, Y.Y.L. Sip, R. Catarata, J.E. Calderon, N. Azim, S. Afrin, Z. Y. Zhang, L. Zhai, Nanomaterials in advanced, high-performance aerogel composites: a review. *Polymers* 2019, 11, 726.
138. Z. Liu, Y. Ran, J. Xi, J. Wang, Polymeric hybrid aerogels and their biomedical applications. *Soft Matter* 2020, 16, 9160–9175.
139. Barrios E, Fox D, Li Sip YY, Catarata R, Calderon JE, Azim N, Afrin S, Zhang Z, Zhai L. Nanomaterials in advanced, high-performance aerogel composites: a review. *Polymers*. 2019, 11, 726
140. Salgado M, Santos F, Rodríguez Rojo S, Reis RL, Duarte ARC, Cocero MJ. Development of barley and yeast β -glucan aerogels for drug delivery by supercritical fluids. *J CO₂ Util.* 2017, 22, 262–269

141. Mallepally RR, Marin MA, Surampudi V, Subia B, Rao RR, Kundu SC, McHugh MA. Silkfibroin aerogels: potential scaffolds for tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 2015, 10, 035002
142. Weng L, Boda SK, Wang H, Teusink MJ, Shuler FD, Xie J. Novel 3D hybrid nanofiber aerogels coupled with BMP-2 peptides for cranial bone regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2018, 7, 1–16
143. Jia H, Tian Q, Xu J, Lu L, Ma X, Yu Y. Aerogels prepared from polymeric β -cyclodextrin and graphene aerogels as a novel host-guest system for immobilization of antibodies: A voltammetric immunosensor for the tumor marker CA 15–3. *Microchim Acta.* 2018, 185, 517
144. Hannink G, Arts JJC. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Int Care Injured.* 2011, 42, 22–25
145. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005, 26, 5474–91
146. Blokhuis TJ, Termaat MF, den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. *J Trauma.* 2000, 48, 179–86
147. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1970, 4, 433–56
148. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem.* 1997, 121, 317–24
149. Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mamood J, Takita H. Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connect Tissue Res.* 2002, 43, 529–34
150. Jingyi L, Huijun Y, Chuanzhong C. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. *RSC Adv.* 2018, 8: 2015–2033

- 151 Wang H, Ding J, Zhu X, Fan H, Zhang X. Degradation property of biphasic calcium phosphate ceramics with different porosity. *J Funct Mater*. 2010, 10, 1727–1730
- 152 Schnieders J, Gbureck U, Vorndran E, Schossig M, Kissel T. The effect of porosity on drug release kinetics from vancomycin microsphere/calcium phosphate cement composites. *J Biomed Mater Res*. 2011, 99, 391–398
153. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002, 81–98
154. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev*. 2008, 108, 4742–53
155. Dong M, Jiao G, Liu H, et al. Biological silicon stimulates collagen type 1 and osteocalcin synthesis in human osteoblast-like cells through the BMP-2/ Smad/RUNX2 signaling pathway. *Biol Trace Elem Res*. 2016, 173(2), 306–315
156. Low KL, Tan SH, Zein SH, Roether JA, Mourino V, Boccaccini AR. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010, 94, 273–86
157. Ignjatovic N, Tomic S, Dakic M, Miljkovic M, Plavsic M, Uskokovic D. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Bio- materials*. 1999, 20, 809–16
158. Gross UM, Strunz V. Surface staining of sawed sections of undecalcified bone containing alloplastic implants. *Stain Technol*. 1977, 52, (4): 217-9 doi: 10.3109/10520297709116778.
159. 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
160. Chai WL, Moharamzadeh K, Brook IM, VanNoort R. A review of histomorphometric analysis techniques for assessing implant-soft tissue interface. *Biotechnic & Histochemistry* 2011, 86 (4), 242–254

161. 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
162. 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
163. 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
164. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011, 27, 17–28
165. Hegedűs V, Kerényi F, Boda R, Horváth D, Lázár I, Tóth-Győri E, Dezső B, Hegedűs Cs. β -Tricalcium phosphate-silica aerogel as an alternative bioactive ceramic for the potential use in dentistry. *Advances in Applied Ceramics*. 2019, DOI: 10.1080/17436753.2019.1625567
166. Szalóki M, Hegedűs V, Fodor T, Martos R, Radics T, Hegedűs Cs, Dezső B. Evaluation of the Effect of the Microscopic Glass Surface Protonation on the Hard Tissue Thin Section Preparation. *Appl Sci*. 2020, 10, 7742; doi:10.3390/app10217742
167. Jokay I, Soós G, Répássy G, et al. Apoptosis in the human inner ear. Detection by in situ end-labeling of fragmented DNA and correlation with other markers. *Hear Res*. 1998, 117, (1–2): 131–139
168. Tsakiris I, Torocsik D, Gyongyosi A, et al. Carboxypeptidase-M is regulated by lipids and CSFs in macrophages and dendritic cells and expressed selectively in tissue granulomas and foam cells. *Lab Invest*. 2012, 92, (3): 345–361
169. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper KF, Mikos AG: Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012, 7: 1918-1929
170. Szabo K, Papp G, Dezső B, et al. The histopathology of labial salivary glands in primary Sjogren's syndrome: focusing on follicular helper T cells in the inflammatory

infiltrates. *Mediators Inflamm.* 2014, 2014: 11. Article ID 631787.
<https://doi.org/10.1155/2014/631787>

171. Robaszkiewicz A, Erdelyi K, Kovacs K, et al. Hydrogen peroxide-induced poly (ADP-ribosyl) ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death. *Free Radic Biol Med.* 2012, 53(8): 1552–1564

172. Dong M, Jiao G, Liu H, et al. Biological silicon stimulates collagen type 1 and osteocalcin synthesis in human osteoblast-like cells through the BMP-2/ Smad/ RUNX2 signaling pathway. *Biol Trace Elem Res.* 2016, 173 (2): 306–315

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

174. 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

175. Pazinato FB, Lopes FA, Marquezini L, De Castro FLA, Atta MT. Effect of surface treatments on the spreading velocity of simplified adhesive systems. *J Appl Oral Sci.* 2006, 14, 393–398

176. Ross MH. Szövevény. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest, 2007,181-202

177. Burr D, Allen MR. Basic and applied bone biology 2nd edition. Cambridge: Academic Press, 2019. -ISBN: 9780128132593

178. Szentágothai J. Funkcionális anatómia. Medicina Könyvkiadó Budapest. 1975, 261-283

179. Fonyó A, Ligeti E. Az orvosi élettan tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest, 2008, 341-350

180. Dimitrios Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Ann NY Acad Sci.* 2006, 1092, 385-396 doi.org/10.1196/annals.1365.035

181. Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996, 382, 448–452

182. Bianco P, Riminucci M, Grontho S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001, 19, 180–192
183. Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita M, Kitamura C, Fukushima H. The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects. *Inter J of Dent*. 2012, Article ID 148261
184. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases*. 2002, 8, 147–159
185. An YH. Mechanical properties of bone. In: An YH, Draughn RA, editors. *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. Boca Raton: CRC Press; 2000, 41–64
186. Ginebra MP. Calcium phosphate bone cements. In: Deb S, editor. *Orthopaedic bone cements*. 1st ed. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited; 2008, 206–30
187. Chaparro O, Linero I. Regenerative medicine: A new paradigm in bone regeneration *Intech Open*. 2016, - ISBN: 978-953-51-2539-6. DOI:[10.5772/62523](https://doi.org/10.5772/62523)
188. A, Los M, wiechec E. Biomaterials, Definition, Overview. *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*. 2019
189. Jin W, Chu PK. Osseointegration. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. 2019
190. Troiano NW, Kacena AA. Bone Implants: Processing, Embedding, Cutting, and Histopathology. *J Histotechnol*. 2006, 29, 253–264
191. Pazzaglia U, Bernini F, Zatti G, Dinucci A. Histology of the metal-bone interface: Interpretation of plastic embedded slides. *Biomaterials* 1994, 15, 273–277
192. Özcan M, Dünder M, Erhan Çömlekog˘lu M. Adhesion concepts in dentistry: Tooth and material aspects. *J Adhes Sci Technol*. 2012, 26, 2661–2681
193. Benard F, Campistron I, Laguerre A, Vigier G, Laval F. Influence of silica fillers during the electron irradiation of DGEBA/TETA epoxy resins, part II: Study of the thermomechanical properties. *Polym Degrad Stab*. 2006, 91, 2119–2125

194. Tsuchimoto Y, Yoshida Y, Mine A, Nakamura M, Nishiyama N, Van Meerbeek B, Suzuki K, Kuboki T. Effect of 4-MET- and 10-MDP-based primers on resin bonding to titanium. *Dent Mater J*. 2006, 25, 120–124
195. Jang HK, Chung YD, Whangbo SW, Kim TG, Whang CN, Lee S. Effects of chemical etching with nitric acid on glass surfaces. *Glass* 2001, 19, 267–274
196. Antonio Alves JJ, Baptista Baldo J. The Behavior of Zeta Potential of Silica Suspensions. *New J. Glas. Ceram.* 2014, 4, 29–37
197. Lee JH, Lee M, Kim KN, Hwang CJ. Resin bonding of metal brackets to glazed zirconia with a porcelain primer. *Korean J Orthod.* 2015, 45, 299–307



Nyilvántartási szám: DEENK/485/2021.PL
Tárgy: 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.
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





5. 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
6. 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.
7. 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
8. Watted, N., Muhamad, A. H., Proff, P., Watted, A., **Hegedűs, V.**, Borbély, P.: Chirurgische Freilegung palatinal verlagter Zähne.
Oralchirurgie Journal 4, 2-12, 2018.
9. Borbély, P., **Hegedűs, V.**, Veiszenbacher, É.: Practical notes in orthodontics: for dental students : exercise. Hansa-Dont Orthodontic Studio Ltd., Budapest, 128 p., 2018.
10. 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.
11. Kerényi, F., Tarapcsák, S., Hrubí, E., Baráthné Szabó, Á., **Hegedűs, V.**, Balogh, S., Bágyi, K., Varga, G., Hegedűs, C.: Fogból eredű összegek fluoreszcens és mágneses válogatásának összehasonlító vizsgálata.
Fogorv. Szle. 109 (1), 29-33, 2016.
12. Abu-Hussein, M., Watted, N., **Hegedűs, V.**, Borbély, P.: Corticotomy in the Modern Orthodontics.
J. Dent. Med. Sci. 14 (11), 68-80, 2015.





13. 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 Bioanyagtan 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 Atillának és Dr. Lázár Istvánnak. Köszönöm a családomnak és a barátaimnak, hogy mellettem vannak és támogatnak!