

# MORFOLOGISCH ONDERZOEK VAN CELADHESIE AAN IMPLANTATIEMATERIALEN<sup>\*)</sup>

ENKELE ORIËNTERENDE PROEVEN

J. JANSEN

*Uit de afdeling Tandheelkundige Materialen van de Katholieke Universiteit te Nijmegen. Hoofd: Prof. Dr. F. C. M. Driessens.*

## 1. Inleiding

Tandimplantaten onderscheiden zich van andere implantaten door één specifiek facet: het implantaat steekt voor een deel in het kaakbot en voor een deel in de mond. Via de penetratie door de mucosa bestaat er dus een verbinding tussen het milieu interieur en het milieu exterieur.

Als niet op een of andere wijze in voldoende mate aanhechting van gingiva aan het implantaat tot stand komt, kan er een influx van bacteriën, debris, etc. plaatsvinden langs het implantaat de weefsels in. Uit de statistische evaluatie van endostale implantaten door Cranin (1977) verricht, blijkt hoe belangrijk het bestaan van een dergelijke porte d'entrée is voor het al of niet slagen van een implantaat. Er werden 952 implantaten onderzocht, geplaatst bij 458 patiënten. De evaluatieprocedure bestond uit het vaststellen of er pijn en gevoeligheid waren bij het palperen en bekloppen van het implantaat en uit het bestuderen van periapicale en panoramische röntgenfoto's. Implantaten in (resten van) elementen lieten 5 jaar na het inbrengen 91% succes zien terwijl de bladimplantaten na die periode maar in 55% succes hadden. Een belangrijk verschil tussen twee typen implantaten is dat bij endodontische implantaten de afsluiting tussen milieu interieur en exterieur op natuurlijke wijze verzorgd wordt door de resten van een natuurlijk element, terwijl bij de bladimplantaten het gingivale

weefsel tegen een lichaamsvreemd materiaal aanligt.

Indien men morfologisch wil nagaan of en in hoeverre de aanhechting van de gingivacellen aan het materiaal van het implantaat verschilt van die aan de natuurlijke tand en daarbij het oplossende vermogen van de elektronenmicroscopie wil benutten, dan stuit men bij regelrecht elektronenmicroscopisch onderzoek van de klinische situatie op zulke technische problemen dat onderzoek aan handzamer *in vitro* materiaal aangewezen lijkt.

Bij een dergelijk *in vitro* onderzoek naar de hechting van weefsel aan implantaat zijn de volgende punten relevant:

1. invloed van de chemische aard van het implantatiemateriaal op de celgroei;
2. invloed van de oppervlakteconfiguratie van het implantaat op de celgroei;
3. de manier van aanhechting van de cellen aan het implantatiemateriaal.

### 1.1. De invloed van het materiaal op de vitaliteit van de cellen

Voor het tot stand komen van hechting is het natuurlijk in de eerste plaats nodig dat het materiaal de vitaliteit van de cellen niet negatief beïnvloedt. Door cellen op verschillende implantatiematerialen te laten groeien en vervolgens te bekijken met een raster-elektronenmicroscopie, kan men eventuele reacties van de cellen op het materiaal bestuderen. Een dergelijk onderzoek is bijvoorbeeld gedaan door Nakamura (1978) en door Baumhammers (1978).

Materialen die cytotoxische stoffen af-

### Samenvatting:

Er worden enkele oriënterende proeven beschreven over de toepassing van (raster)elektronenmicroscopie voor het onderzoek van de aanhechting van gingivacellen aan transmucosale implantaten. Het blijkt dat het met aangepaste technieken mogelijk is informatie te verwerven over de invloed van materiaal en oppervlak van het implantaat op de cellen en over de vorming van hemidesmosomen.

geven veroorzaken celdood en zijn dus niet geschikt als implantatiemateriaal. Voorbeelden hiervan zijn zilver en nikkel, terwijl materialen als goud en titaan geen invloed bleken te hebben op de celvitaliteit.

### 1.2 De invloed van het oppervlak van het implantaat op de celgroei

Zoals uit de literatuur blijkt kan de oppervlaktestructuur van een implantaat invloed hebben op de aanhechting van plaque en tandsteen, wat dan aanleiding kan zijn tot peri-implantale weefselafbraak (Skerman, 1974). Het is zeer goed mogelijk dat onregelmatigheden op het oppervlak van een implantaat, zoals scherpe randen en hoeken, ook invloed kunnen hebben op de celgroei. Een reden hiervoor zou kunnen zijn dat de structuur van de oxydefilm, die normaliter een metaaloppervlak bedekt en 'passief' maakt, op scherpe randen verstoord is, wat dan aanleiding is tot de afgifte van cytotoxische corrosieproducten, die de celgroei stoppen.

### 1.3. De manier van aanhechting van de cellen

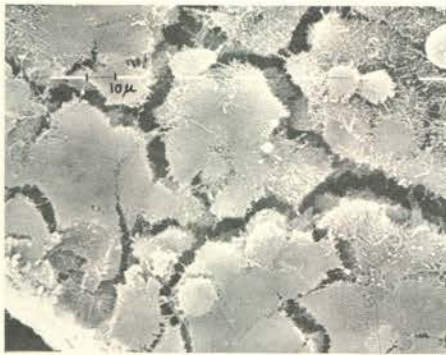
Zoals blijkt uit onderzoek verricht door James (1974) en Listgarten (1975), zal aanhechting van gingiva-epitheel aan een implantaat morfologisch gezien op dezelfde manier kunnen plaatsvinden als aan het natuurlijke element, namelijk door hemidesmosomen. Hemidesmosomen zijn celonderdelen, die alleen met de transmissie-elektronenmicroscopie en dus aan dunne coupes zijn aan te tonen. Het is, uitgaande van klinisch materi-

<sup>\*)</sup> Naar een voordracht gehouden tijdens de wetenschappelijke vergadering van de Ned. Ver. voor Prothetische Tandheelkunde te Amsterdam d.d. 13 december 1980.



aal echter moeilijk coupes te verkrijgen waarin zowel implantaat als weefsel aanwezig is. Dit is eenvoudiger bij *in vitro* experimenten omdat men daarbij vooraf met de vervaardiging van coupes rekening kan houden. Dergelijk *in vitro* onderzoek is, overigens van een ander gezichtspunt uit dan ten behoeve van implantaten, reeds gedaan door Taylor (1970) met epoxyhars en glazuur (beide materialen zijn eenvoudig te verwerken voor transmissie-elektronenmicroscopie). Taylor nam in beide gevallen hemidesmosomen waar in de cellen van de grenslaag langs het substraat.

Wij hebben oriënterend onderzoek gedaan met de raster-elektronenmicroscopie (waarmee de vorm en het oppervlak van intacte cellen bestudeerd kunnen worden) over de punten 1.1. en 1.2. en ten behoeve van 1.3. hebben wij een nieuwe, meer algemeen toepasbare techniek voor het maken van coupes ontwikkeld en beproefd.



Afb. 1. SEM-opname: HeLa-cellen op glas, 6 dagen; 640 $\times$ . De scherpe rand is duidelijk te zien: opvallend zijn de vele cytoplasmatische uitlopers tot vlak aan de rand van het glas.



Afb. 2. SEM-opname: HeLa-cellen op Ti, 6 dagen; 640 $\times$ . Linksonder ziet men de scherpe rand van het titaanfolie; rechtsboven zijn nog cellen met cytoplasmatische uitlopers te zien.

## 2. Proeven

De *in vitro* proeven werden uitgevoerd met gekweekte HeLa-cellen. Dat zijn gemakkelijk in cultuur te houden cellen, die tientallen jaren geleden uit een cervix-carcinoom zijn gekweekt en over de hele wereld voor zulke proeven gebruikt worden.

### 2.1. Raster-elektronenmicroscopie (ad 1.1 en 1.2.)

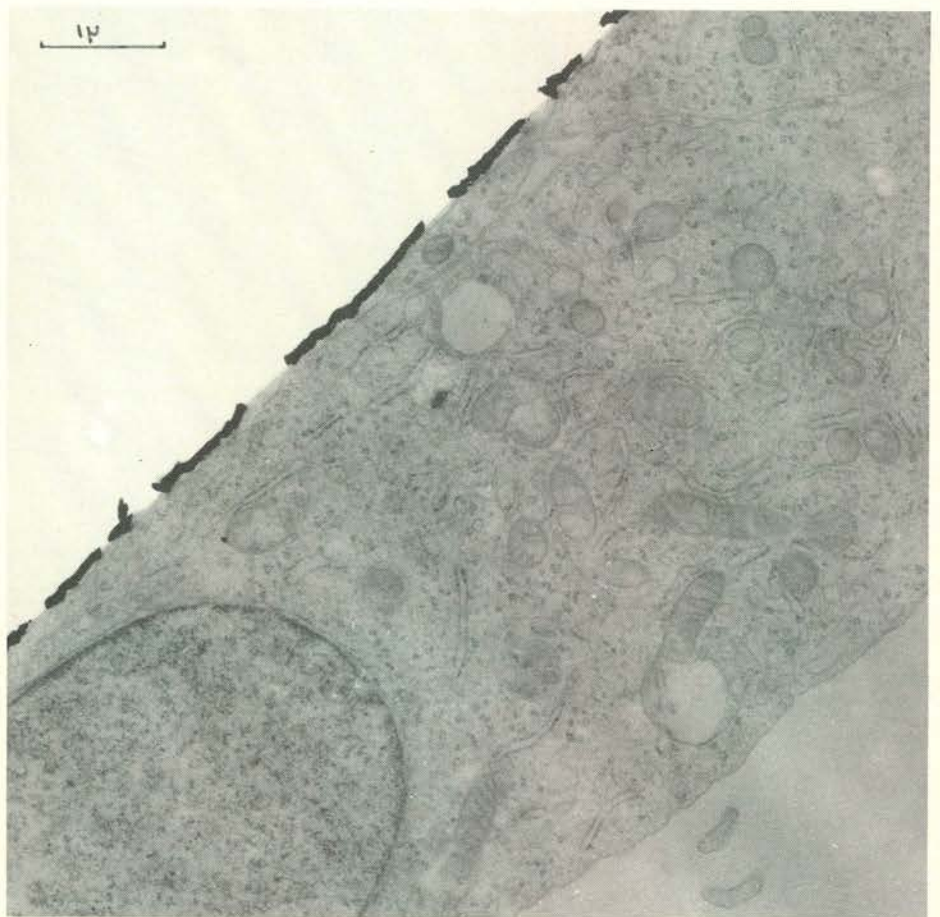
Afbeelding 1 toont HeLa-cellen op glas na 6 dagen kweken: men ziet dat de cellen min of meer de vorm van een halve bol hebben en dat het oppervlak dicht bezet is met de voor 'gezonde' cellen karakteristieke uitstulpinkjes. Vlak bij de scherpe rand van het glas is het beeld hetzelfde als verder ervandaan. In afbeelding 2 wordt het aspect getoond van eveneens 6 dagen gekweekte HeLa-cellen aan de rand van titaanfolie: de cellen zijn hier platter en ze missen de uitstulpingen, terwijl onder dezelfde kweekomstandigheden

wat verder van de folierand af het beeld normaal is.

Of de oorzaak van dit verschillende gedrag gezocht moet worden in bovengenoemde plaatselijke verstoring van de oxydefilm – wat bij glas natuurlijk geen rol kan spelen – is nog niet aangetoond; nader onderzoek zal hier meer informatie over moeten verschaffen. Er is in ieder geval wel aangetoond dat zich processen aan de scherpe randen afspelen, die van belang kunnen blijken te zijn.

### 2.2. Transmissie-elektronenmicroscopie (ad 1.3.)

Zoals eerder aangegeven zal de hechting waarschijnlijk verzorgd worden door hemidesmosomen. Deze kunnen alleen door transmissie-elektronenmicroscopie in ultradunne coupes aangetoond worden. Met de huidige technieken is het echter niet mogelijk metaal te snijden voor transmissie-elektronenmicroscopische coupes. Een oplossing voor dit probleem is door ons



Afb. 3. Transmissie-EM-opname: HeLa-cel op goud; 22.000 $\times$ . De dikke zwarte lijn rechtsboven is de goudlaag; men kan onderscheiden een kern (linksonder), mitochondriën en endoplasmatisch reticulum.



gevonden in het opdampen van een zeer dunne metaallaag op een dragermateriaal. Hierop kan men de cellen laten groeien. Na afloop van het experiment worden cellen en metaal van de drager afgenomen en dan kan het geheel wel verwerkt worden tot dunne EM-coupees.

Deze methode is beproefd in een vooronderzoek met HeLa-cellen, hoewel het bekend is dat deze celsoort het vermogen tot vorming van hemidesmosomen verloren heeft. De cellen werden gekweekt op een goudlaag, die op polystyreen gedampt was.

Men kan zien (afb. 3) dat het gaat om klaarblijkelijk normaal functionerende cellen met een kern, mitochondriën, lysosomen en endoplasmatisch reticulum; de goudlaag is niet als een doorlopende lijn te zien. Daar het polystyreen tijdens het opdampen van het goud vervormd is, was de laag hier en daar onderbroken. In afbeelding 4 ziet men dat het celmembraan de metaallaag op bepaalde plaatsen zeer

dicht nadert. Hier zouden hemidesmosomen met deze techniek duidelijk aan te tonen geweest zijn. De uiteindelijke opzet is natuurlijk om een dergelijk onderzoek te doen met cellen, waarin men in geval van hechting aan een geschikt substraat wel hemidesmosomen kan verwachten. Men hoeft zich niet te beperken tot metalen als substraat; men kan ook cellen laten groeien op b.v. keramische materialen. Op deze manier kan waarschijnlijk een weg gevonden worden om aan te tonen welke implantatiematerialen in principe aanhechting van epitheelweefsel mogelijk maken.

Resumerend kan gesteld worden dat de bedoeling van deze proeven was de mogelijkheden te verkennen van een morfologisch onderzoek van de adhesie van het gingiva-epitheel aan het implantaat. Vooralsnog lijkt het ontbreken van kennis hierover een optimaal ontwerp van tandimplanten en daarmee uitgebreide toepassing ervan

in de weg te staan. Het bleek dat raster- en transmissie-elektronenmicroscopische technieken in beginsel aan dit doel aangepast kunnen worden.

De werkgroep waarbinnen deze experimenten plaatsvinden bestaat naast de auteur uit: Dr. P. J. van Mullem, Dr. J. M. L. Wolters-Lugterhorst, Ir. J. R. de Wijn en Drs. M. M. A. Ramseelaar.

#### Summary:

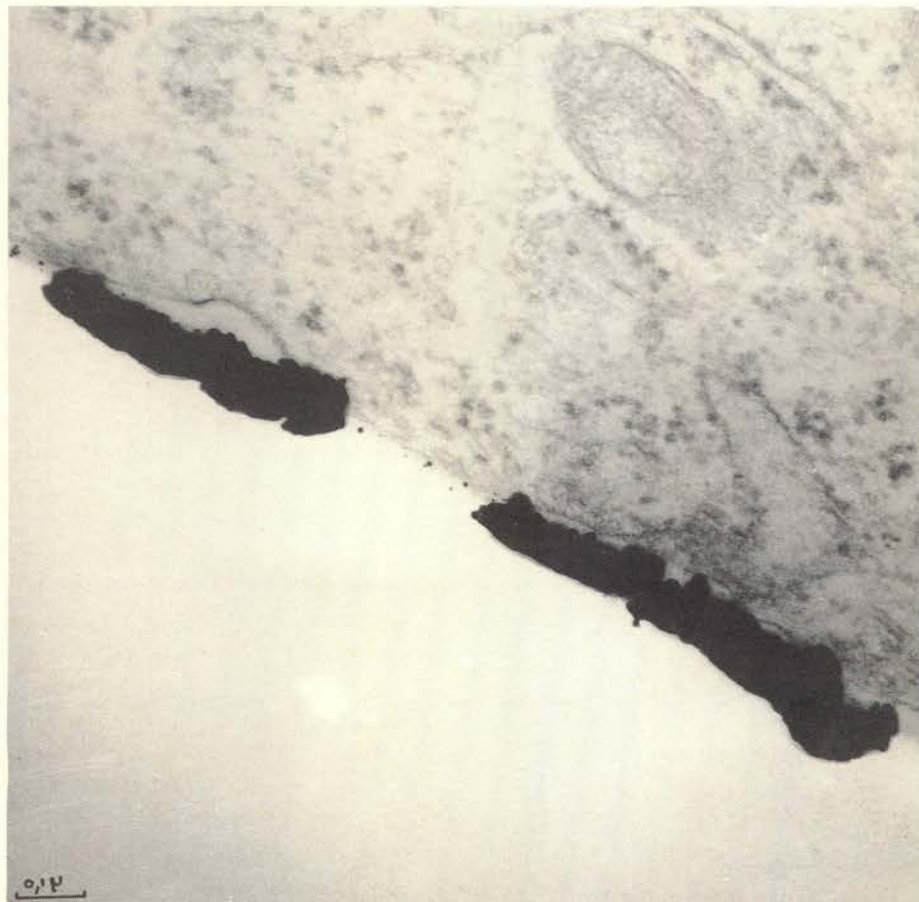
Title: Morphological investigation of cell adhesion to implant materials.

A description is given of some preliminary experiments on the application of scanning and transmission electron microscopy to the investigation of gingiva cell adhesion to transmucosal implants.

Appropriately modified techniques are shown to be useful in obtaining information on the influence of the material and its surface configuration on cells and on the presence of hemidesmosomes.

#### Literatuur:

1. Baumhammers, A., Langkamp, H. H., Matta, R. K., Kilburg, K. (1978): Scanning electron microscopy of epithelial cells grown on enamel, glass and implant materials. *J Period* 49: 592-597.
2. Cranin, A. N., Rabkin, M. F., Garfinkel, L. (1977): A statistical evaluation of 952 endosteal implants in humans. *J Am Dent Assoc* 94: 315-320.
3. James, R. A., Schultz, R. L. (1974): Hemidesmosomes and the adhesion of junctional epithelial cells to metal implants - a preliminary report. *Oral Implant* 4: 294-302.
4. Listgarten, M. A., Lai, C. H. (1975): Ultrastructure of the intact interface between an endosseous epoxy resin dental implant and the host tissues. *J Biol Buccale* 3: 13-28.
5. Nakamma, M., Kawahara, H., Imai, K., Kawamoto, T., Hosohama, T., Kataoka, Y. (1978): Cell contact to metal surface. *JDAM* 19: 98-111.
6. Skerman, J. H., Elgeneidy, A. K., Stallard, R. E. (1974): Periodontal implications of the surface characteristics of dental implants in the area of gingival junction. *J Period* 45: 731-738.
7. Taylor, A. C. (1970): Adhesion of cells to surfaces in biological systems. R. S. Manly ed.. Academic Press, New York. Pp. 51-71.



Afb. 4. Transmissie-EM-opname: HeLa-cel op goud; 115.000 $\times$ . De dikke zwarte lijn is de goudlaag; bij het linker goudpartikel valt op dat er in het midden een 'ruimte' is tussen celmembraan en goud terwijl meer aan de randen een goede adaptatie bestaat.