

UNIWERSYTET Przyrodniczy we Wrocławiu

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ KATEDRA BIOSTRUKTURY I FIZJOLOGII ZWIERZĄT ZAKŁAD ANATOMII ZWIERZĄT

lek. wet. Karol Kirstein

Zastosowanie żebra świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*) do oceny wpływu wybranych systemów implantologicznych na mikrostrukturę i właściwości biomechaniczne tkanki kostnej

PRACA DOKTORSKA

PROMOTOR: DR HAB. N. WET ALEKSANDER CHRÓSZCZ, PROF. UPWR PROMOTOR POMOCNICZY: DR HAB. N. MED. MACIEJ DOBRZYŃSKI, PROF. UMED

WROCŁAW 2021

STRESZCZENIE

Materialy i metody

Jako materiał do badań wykorzystano 9 świeżych fragmentów kostnych żeber świni domowej rasy Wielka Biała Polska. Dla pozyskania materiału biologicznego nie było konieczne uzyskanie zgody Komisji Etycznej. Długość, szerokość i grubość materiału kostnego była zbliżona, a wartości średnie pomiarów metrycznych wynoszą kolejno 147,2 mm x 24,6 mm x 21,3 mm. W ramach prowadzonego eksperymentu, do wykonania odwiertu w tkance kostnej wykorzystano systemy implantologiczne. Ogólnie wykonano łącznie 81 odwiertów badanej tkanki kostnej. W każdym z nich zastosowano wiertło pilotowe oraz wiertło główne o następującej średnicy:

- BEGO Semados[®] RS (wiertło pilotowe 2,5 mm; wiertło główne 3,0 mm),
- BIOMET 31[®] T3 (wiertło pilotowe 2,3 mm; wiertło główne 2,75 mm),
- NEO BIOTECH[®] IS-III Active (wiertło pilotowe 2,2 mm; wiertło główne 2,9 mm).

Każdy z wymienionych systemów implantologicznych badany był zgodnie z następującymi parametrami systemu chłodzenia (chłodzenie zewnętrzne):

- chłodzenie przy użyciu 0,9% roztworu NaCl w temperaturze 20 stopni Celsjusza,
- chłodzenie przy użyciu 0,9% roztworu NaCl w temperaturze 3 stopni Celsjusza,
- bez chłodzenia.

Wykorzystano trzy, dostępne w przypadku każdego z wybranych systemów implantologicznych prędkości obrotowe wierteł:

- 800 obr/min,
- 1200 obr/min,
- 1500 obr/min.

Do wywołania ruchu obrotowego wiertła wykorzystano jako napęd mikromotor NeoSurge (NEO BIOTECH) wyposażony przez producenta w przekładnię kątową o redukcji 32:1.

Każdy odwiert wykonywano na zewnętrznej powierzchni żebra (*facies externa costae*) poprzez perforujące drążenie istoty zbitej, osiągając śródkoście, ze stałą głębokością wiercenia równą 10 mm. Przed wykonaniem odwiertu materiał kostny unieruchomiono na stole sekcyjnym, każdy odwiert wykonywano w temperaturze pokojowej z jednakową siłą nacisku powodowaną przez zawsze tego samego operatora posiadającego znaczące doświadczenie w wykonywaniu tego typu procedur medycznych. Pozwoliło to nie tylko na stabilizację materiału kostnego, ale i uzyskanie optymalnej siły nacisku stosowanej w praktyce lekarskiej podczas wykonywania

21

kanałów odwiertów w obrębie żuchwy człowieka. Proces wykonywania kanału odwiertu był rejestrowany przy użyciu kamery termowizyjnej ThermaCAM P640 (FLIR) w zakresie spektrum 7,5-13 µm i matrycą 640 x 480 pikseli. Termogramy były rejestrowane z częstotliwością 30,15 Hz a następnie analizowane pod kątem stwierdzenia maksymalnej temperatury w obrębie badanego obszaru, tj.: tkanki kostnej sąsiadującej z kanałem odwiertu i samego wiertła. W trakcie eksperymentu każde wiertło było wykorzystywane jedynie trzy razy, przy prędkości obrotowej 800, 1200 oraz 1500 obr/min. Znacząco ograniczyło to stępienie wiertła, a przez to generowanie zwiększonej ilości energii cieplnej. Pomiarów temperatury dokonywano w zamkniętym pomieszczeniu, w tej samej temperaturze, wilgotności i w warunkach pozbawionych ruchu powietrza. Wszystkie odwierty wykonał doświadczony implantolog, co zapewniło powtarzalność stosowanych procedur.

Po wykonaniu odwiertów, świeży materiał kostny z wydrążonymi kanałami odwiertu utrwalono w roztworze 4% formaldehydu o pH 7,2 przez okres 48h. Następnie badane fragmenty żeber zostały wypłukane w wodzie bieżącej. Po wypłukaniu, materiał kostny został pocięty z użyciem wolnoobrotowej piły diamentowej w celu otwarcia łoża implantu o możliwie największej średnicy. Uzyskane w ten sposób wycinki kostne były płukane, przy użyciu wytrząsarki w temperaturze 25 stopni Celsjusza, przez czas 10 minut. Dla oczyszczenia powierzchni kości zastosowano 0,9% roztwór NaCl. Badane fragmenty kostne były obserwowane i oceniane z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse 80i zaopatrzonym w filtry UV-2A (EX: 330-380; DM: 400; BA: 420) oraz B-2a (EX: 450-490; DM: 505; BA: 520) i w powiększeniu 40x oraz 100x. Takie wykorzystanie technik histologicznych pozwoliło nie tylko na uniknięcie wielu niepożądanych zmian morfologii tkanki kostnej, ale też pozwoliły na bezpośrednią obserwację całego kanału odwiertu zamiast struktury dwuwymiarowej preparatu histologicznego.

Badanie morfometryczne zostało wykonane z wykorzystaniem oprogramowania NIS Elements AR software.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej wykorzystując oprogramowanie GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) oraz STATISTICA (StatSoft, Inc. Tulsa, USA). Test normalności rozkładu D'Agostino i Paersona, ANOVA wraz z testem Bonferroni post-hoc, Kruskal-Wallis i Dunns zostały wykorzystane, a dla ustalenia współczynnika korelacji między badanymi grupami zastosowano współczynnik korelacji Spearmana.

22

Analiza wyników przeprowadzonych badań, w ramach których oszacowano wysokość temperatury w trakcie wykonywanych kolejnych odwiertów z wykorzystaniem roztworów chłodzących o dwóch temperaturach oraz bez chłodzenia dla prędkości obrotowych wiertła wynoszących 800 obr/min, 1200 obr/min oraz 1500 obr/min wykazały, że istotna statystycznie różnica w rejestrowanej wysokości temperatury występuje jedynie w przypadku porównania systemu BEGO i NEO BIOTECH, gdy zastosowano płyn chłodzący o temperaturze 3 stopni Celsjusza, tj.: 22,3 i odpowiednio 21,8°C, p = 0,024. W przypadku wiercenia bez chłodzenia z użyciem systemu implantacyjnego NEO BIOTECH czas wykonywania odwiertu był znacząco krótszy niż w przypadku systemu BEGO (odpowiednio: 1,76 s oraz 2,72 s, p = 0,035) czy BIOMET 3i (1,76s oraz 3,25s, p = 0,001). Przy zastosowanym chłodzeniu, czas wykonywania odwiertu wykonanego przy użyciu systemu NEO BIOTECH był istotnie statystycznie dłuższy w porównaniu do systemu BEGO (3,68s oraz 2,33s, p = 0,005) czy systemu BIOMET 3i (3,68s oraz 2,70s,

p = 0,044). W przypadku, gdy obniżono temperaturę płynu zapewniającego chłodzenie z 20 do 3 stopni Celsjusza stwierdzone różnice w czasie wykonania kanału odwiertu nie cechowały się istotnością statystyczną.

Ponadto wykazano, że prędkość obrotowa wiertła równa 800 obr/min powoduje konieczność stosowania dłuższego czasu kontaktu wiertła z tkanką kostną, a w skutek tego zwiększa emisję ciepła, podczas gdy zwiększona emisja ciepła obserwowana przy prędkości obrotowej wiertła równej 1500 obr/min wynika z większego nasilenia zjawiska tarcia.

Badanie termograficzne pozwoliło na mierzenie temperatury na powierzchni tkanki kostnej oraz samego wiertła. Dzięki zastosowaniu wiercenia wstępnego (wierteł pilotowych), uzyskano wstępny kanał odwiertu skutecznie pogłębiany do głębokości 1 mm przez wiertło główne. Kamera termowizyjna ustawiona została kontrlateralnie do długiej osi kanału odwiertu, dzięki czemu możliwa była ciągła obserwacja wierzchołka wiertła podczas wykonywania odwiertu oraz bezpośrednio po nim. Analiza wyników badania termograficznego dowiodła, że różnice w maksymalnej rejestrowanej temperaturze oraz tej mierzonej po wyjęciu wiertła z kanału odwiertu wynoszą około $0,7^{\circ}C \pm 0,2^{\circ}C$ i były one stałe niezależnie od zastosowanego systemu chłodzenia lub jego braku. Ponadto analiza uzyskanych wyników dowiodła, że zastosowanie płynu chłodzącego o temperaturze 20°C i 3°C nie daje istotnych statystycznie różnic w wartościach mierzonej temperatury. Natomiast samo zastosowanie systemu chłodzenia w trakcie wykonywania odwiertu posiada istotne znaczenie z punktu widzenia statystycznej analizy uzyskanych w pracy wyników. Przede wszystkim może wydłużać (system NEO BIOTECH) lub skracać czas (system BEGO i BIOMET 3i) potrzebny na wykonanie odwiertu. Za najbardziej optymalną z punktu widzenia emisji energii cieplnej uznano prędkość obrotową wiertła (o średniej średnicy), równą 1200 obr/min Jednocześnie należy stwierdzić, że zastosowanie skutecznego systemu chłodzenia jest niezbędne nie tylko w przypadku wiertła głównego, ale przede wszystkim w odniesieniu do wierteł pilotowych, ze względu na wartość temperatury związanej z emisją energii cieplnej. Wiąże się to z faktem, że podczas wstępnego odwiertu rejestrowana temperatura zbliżała się lub osiągała wartość krytyczną dla wywołania nieodwracalnych zmian w strukturze tkanki kostnej.

Wyniki badania histologicznego wskazują, że zastosowanie skutecznego systemu chłodzenia znacząco ogranicza zasięg strefy uszkodzenia tkanki kostnej (w obrębie wierzchołka kanału odwiertu oraz ściany kanału odwiertu) przy wszystkich trzech wybranych prędkościach obrotowych wiertła. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że zastosowanie środka chłodzącego o temperaturze 20 i 3°C nie wykazuje istotnych statystycznie różnic w rozmiarach strefy uszkodzenia tkanki kostnej. Współczynnik korelacji Spearmana dla stwierdzanej temperatury i rozmiaru metrycznego strefy uszkodzenia został wyliczony dla każdego odwiertu, prędkości obrotowej wiertła i systemu zastosowanego chłodzenia lub jego braku. Analiza struktury mikroanatomicznej wykazała zróżnicowanie zmian morfologicznych obserwowanych w badanych próbach tkanki kostnej zależnych od prędkości obrotowej wiertła i sposobu chłodzenia. Podczas wiercenia z prędkością obrotową 800 obr/min i użyciem płynu chłodzącego o temperaturze 3°C strefa destrukcji tkanki kostnej była widoczna. Jednocześnie, ta sama prędkość obrotowa wiertła pozbawionego chłodzenia powodowała umiarkowane uszkodzenie tkanki kostnej oraz szpiku kostnego. Obraz histologiczny zmian tkanki kostnej powodowany wykonaniem odwiertu z prędkością obrotową 1200 obr/min i zastosowaniem płynu chłodzącego o temperaturze 20°C cechował się zmianami jedynie w wierzchołkowej części kanału odwiertu, bez wyraźnej strefy kompresji tkanek. Ta sama prędkość obrotowa wiertła, pozbawiona chłodzenia, powodowała całkowitą destrukcję struktury tkanki kostnej i szpiku kostnego oraz uwidocznienie pustej jamy szpikowej. W końcu wiertło o predkości obrotowej równej 1500 obr/min, bez systemu chłodzenia, nie powodowało silnego ucisku tkanki kostnej oraz wypełnienie wierzchołkowej części kanału odwiertu tkanką łączną. Natomiast zastosowanie płynu chłodzącego w temperaturze 20°C skutkowało zmianą morfologii tkanki kostnej spowodowanej wykonaniem odwiertu, powodując całkowitą destrukcję tkanki kostnej i szpiku kostnego oraz uszkodzenie struktury beleczkowej tkanki kostnej z widoczną jamą szpikową. Badanie histometryczne strefy uszkodzenia badanej tkanki kostnej wokół powstałego kanału odwiertu wykazało, że stosowanie pośredniej prędkości obrotowej wiertła (1200 obr/min) jest najmniej traumatyczne.

WNIOSKI

Przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- podczas wykonywania łoża implantu (kanału odwiertu) zmiany rejestrowanej temperatury związane są bezpośrednio z zastosowaniem systemu chłodzenia oraz prędkością obrotową wiertła,
- 2. nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w przypadku zastosowania środka chłodzącego o temperaturze 20 i 3°C,
- w przypadku wszystkich testowanych systemów implantacyjnych stwierdzono, że istotne statystycznie zmiany temperatury rejestrowanej podczas wykonywania odwiertu występują w odniesieniu do wierteł pilotowych,
- 4. system implantologiczny NEO BIOTECH cechuje najkrótszy czas przygotowania łoża implantu (wykonania kanału odwiertu),
- 5. temperatura krytyczna (47°C), pochodząca z doniesień dostępnej literatury, powodująca nieodwracalne zmiany morfologiczne struktury tkanki kostnej, została przekroczona jedynie w przypadku wierteł pilotowych przy prędkości obrotowej wiertła równej 1500 obr/min dla wszystkich trzech badanych systemów implantologicznych,
- 6. stwierdzono, że rozmiar wiertła nie wpływa na stopień uszkodzenia tkanki kostnej, niezależnie od temperatury stosowanego płynu chłodzącego,
- znacząco mniej rozległa strefa uszkodzenia tkanki kostnej powstała w przypadku zastosowania systemu chłodzenia, a jego temperatura nie powoduje istotnych statystycznie różnic w uzyskanych wynikach,
- 8. badania wykazały, że najmniej inwazyjne względem tkanki kostnej jest stosowanie prędkości obrotowej wiertła równej 1200 obr/min.

SUMMARY

Aim of the study

- 1. Determining which of the selected implant systems has the best cooling system properties and does not cause adverse morphological changes in the bone tissue that may affect the success of implant-bone osseointegration.
- 2. Describing the morphological changes and the extent of the bone tissue damage zone formed during the drilling of the borehole in relation to selected implant systems.

Materials and methods

Nine fresh rib bone fragments of a domestic pig of the Great White Poland breed were used as the research material. To obtain biological material, it was not necessary to apply for the consent of the Ethics Committee. The length, width and thickness of the bone material were similar, and the mean values of the metric measurements were respectively 147.2 mm x 24.6 mm x 21.3 mm. As part of the experiment, implant systems were used to drill a bore in the bone tissue. Overall, a total of 81 boreholes of the studied bone tissue were drilled. For each of them a pilot drill and a main drill with the following diameter were used:

- BEGO Semados® RS (2.5 mm pilot drill; 3.0 mm main drill),
- BIOMET 3I® T3 (pilot drill 2.3 mm; main drill 2.75 mm),
- NEO BIOTECH® IS-III Active (pilot drill 2.2 mm; main drill 2.9 mm).

All the listed implant systems were tested in accordance with the following parameters of the cooling system (external cooling):

- cooling with 0.9% NaCl solution at 20°C,
- cooling with 0.9% NaCl solution at 3°C,
 - without cooling.

Three rotational speeds of drills, available for each of the selected implant systems, were used:

- 800 rpm.,
- 1200 rpm.,
- 1500 rpm..

A NeoSurge micromotor drive (NEO BIOTECH), equipped by the manufacturer with an angular gear with a 32:1 reduction, was used to trigger the rotary movement of the drill.

Each well was made on the outer surface of the rib (*facies externa costae*) by perforating the compact body and reaching the diploe with a constant drilling depth of 10 mm. Before drilling the bore, the bone material was immobilized on the dissecting table. Each bore was made at room temperature with the same pressure force caused by always the same operator with significant experience in performing this type of medical procedure. This allowed not only to stabilize the bone material but also to obtain the optimal pressure force used in medical practice when making bore canals in the human mandible. The process of making the well channel was recorded with the ThermaCAM P640 (FLIR) thermal imaging camera in the 7.5-13 µm spectrum and a 640x480-pixel matrix. Thermograms were recorded with a frequency of 30.15 Hz and then analyzed for the maximum temperature within the examined area, i.e. bone tissue adjacent to the borehole and the drill itself. During the experiment, each drill was used only three times, at speeds of 800, 1200, and 1500 rpm. This significantly reduced the blunt drill bit and thus the generation of

an increased amount of thermal energy. Temperature measurements were made in a closed room, at the same temperature, humidity, and in conditions with no air movement. All boreholes were performed by an experienced implantologist, which ensured the repeatability of the procedures used.

After drilling, the bone material with hollow well channels was placed in a 4% formaldehyde solution, pH 7.2, for 48 hours. Then, the tested rib fragments were rinsed in running water. After rinsing, the bone material was cut with a low-speed diamond saw in order to open the implant bed with the largest possible diameter. The bone sections obtained in this way were rinsed using a shaker at 25°C for 10 min. A 0.9% NaCl solution was used to clean the bone surface. The examined bone fragments were observed and evaluated using a Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope equipped with UV-2A (EX: 330-380; DM: 400; BA: 420) and B-2a (EX: 450-490; DM: 505; BA: 520) and with 40x and 100x magnifications. Such use of histological techniques not only made it possible to avoid many undesirable changes in the morphology of the bone tissue, but also allowed direct observation of the entire borehole instead of the two-dimensional structure of the histological preparation.

The morphometric results and it's statistical analysis was performed with the use of NIS Elements AR software.

All obtained results were statistically analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and STATISTICA (StatSoft, Inc. Tulsa, USA). The D'Agostino and Paerson distribution normality test, ANOVA along with the Bonferroni post -hoc, Kruskal-Wallis and Dunns test were used, and the Spearman correlation coefficient was applied to establish the correlation coefficient between the studied groups.

Results

The analysis of the results of the tests, which estimated the temperature during subsequent drillings with the use of cooling solutions with two temperatures and without cooling, for the rotational speeds of the drill of 800 rpm., 1200 rpm. and 1500 rpm., showed that statistically significant difference in the recorded temperature value occurs only when comparing the BEGO and NEO BIOTECH systems, when a cooling fluid with a temperature of 3°C was used, i.e.: 22.3 and 21.8°C, respectively, p = 0.024. In the case of drilling without cooling using the NEO BIOTECH implant system, the drilling time was significantly shorter than in the case of the BEGO system (1.76s and 2.72s, respectively, p = 0.035) or BIOMET 3i (1.76s and 3,25s, p = 0.001). With the use of cooling, the time of drilling a well, made with the NEO BIOTECH system, was statistically significantly longer compared to the BEGO system (3.68s and 2.33s, p = 0.005) or the BIOMET 3i system (3.68s and 2.70s, p = 0.044). In the case when the temperature of the cooling fluid was lowered from 20 to 3°C, the differences in the time of drilling the well channel were not statistically significant.

Moreover, it has been shown that the rotational speed of the drill of 800 rpm. necessitates a longer contact time between the drill and the bone tissue, and consequently increases the heat emission, while the increased heat emission observed at the rotational speed of the drill of 1500 rpm. results from the greater intensity of the phenomenon of friction.

Thermographic examination made it possible to measure the temperature on the surface of the bone tissue and on the drill itself. Due to the use of pre-drilling (pilot drills), a preliminary borehole was successfully dredged to a depth of 1 mm by the main drill. The thermal imaging camera was set contralaterally to the long axis of the well channel. Thus, it was possible to constantly observe the drill tip during the drilling and immediately afterwards. The analysis of the thermographic test results proved that the differences in the maximum recorded temperature and that measured after the drill was taken out of the well channel were about $0.7^{\circ}C \pm 0.2^{\circ}C$ and they were constant regardless of the applied cooling system or its absence. Moreover, the analysis of the obtained results proved that the use of a coolant with a temperature of 20 and 3°C does not result in statistically significant changes in the measured temperature values. On the other hand, the very use of the cooling system during the drilling process is of significant importance from the point of view of the statistical analysis of the results obtained in the work. First, it can extend (the NEO BIOTECH system) or shorten (BEGO and BIOMET 3i systems) the time needed to drill the well. The rotational speed of the drill (medium diameter) equal to 1200 rpm. was considered the most optimal from the point of view of thermal energy emission. At the same time, it should be noted that the use of an effective cooling system is necessary not only

for the main drill, but above all for pilot drill bits, due to the temperature value associated with the emission of thermal energy. This is caused by the fact that during the initial drilling the recorded temperature approached or reached a critical value for inducing irreversible changes in the structure of the bone tissue.

The results of the histological examination indicate that the application of an effective cooling system significantly reduces the extent of the bone tissue damage zone (the apical part of the well channel and the wall of the well channel) at all three selected rotational speeds of the drill. The statistical analysis of the obtained results showed that the use of a cooling agent at a temperature of 20 and 3°C does not show statistically significant differences in the size of the bone tissue damage zone. The Spearman correlation coefficient for the observed temperature and the metric size of the damage zone were calculated for each well, drill speed and cooling system used, or without it. The analysis of the microanatomical structure showed different morphological changes observed in the bone tissue samples tested, depending on the rotational speed of the drill and the cooling method. During drilling with a rotational speed of 800 rpm. and the use of a coolant at a temperature of 3°C, the bone tissue destruction zone was visible. At the same time, the same rotational speed of the drill without cooling caused moderate damage to the bone tissue and bone marrow. The histological image of bone tissue changes caused by drilling a well with a rotational speed of 1200 rpm. and the use of a cooling fluid at a temperature of 20°C showed changes only in the apical part of the well canal, without a clear tissue compression zone. The same rotational speed of the drill, without cooling, completely destroyed the structure of the bone tissue and the bone marrow, and the empty marrow cavity was visible. Finally, the drill with a rotational speed of 1500 rpm., without a cooling system, did not cause strong compression of the bone tissue and did not fill the apical part of the well canal with connective tissue. On the other hand, the use of a cooling fluid at a temperature of 20°C resulted in a change in the morphology of the bone tissue caused by the drilling of the borehole, leading to a complete destruction of the bone tissue and the bone marrow, and damaging the trabecular structure of the bone tissue with a visible marrow cavity. Histometric examination of the damaged area of the bone tissue around the borehole showed that the use of an intermediate rotational speed of the drill (1200 rpm.) is the least traumatic.

Conclusions

The research carried out in this doctoral dissertation allowed us to draw the following conclusions:

1. during the creation of the implant bed (borehole channel), changes in the recorded temperature are directly related to the use of the cooling system and the rotation speed of the drill,

2. no statistically significant differences were found in the case of using a cooling agent with a temperature of 20 and 3° C,

3. for all tested implant systems, it was found that statistically significant changes in temperature recorded during drilling occur in relation to pilot drills,

4. the NEO BIOTECH implant system is characterized by the shortest time of preparation of the implant bed (drilling of the borehole),

5. critical temperature (47 $^{\circ}$ C), derived from the reports of the available literature, causing irreversible changes in the morphological structure of the bone tissue, was exceeded only in the case of pilot drills at the rotational speed of the drill equal to 1500 rpm. for all three tested implant systems,

6. it was found that the size of the drill did not affect the degree of the bone tissue damage, regardless of the temperature of the coolant used,

7. a significantly less extensive bone tissue damage zone appears when the cooling system is used; its temperature does not cause statistically significant differences in the results obtained,

8. the research showed that the use of the rotational speed of the drill equal to 1200 rpm. is the least invasive to the bone tissue.