

Tommaso Grandi, Giovanna Garuti, Paolo Guazzi, Andrea Forabosco

# Studio comparativo della citotossicità di frese per implantologia in acciaio e rivestite in TiAlN

**PAROLE CHIAVE:** Frese chirurgiche, Fresatura dell'osso, Calore, Usura, Rivestimento TiAlN.

**Obiettivo:** è stato effettuato un rivestimento TiAlN per aumentare le performance delle frese chirurgiche e ridurre il rischio di usura. Questo lavoro ha studiato la citotossicità del rivestimento TiAlN comparandola con quella delle frese standard in acciaio.

**Metodi:** sono state condotte prove di citotossicità per contatto diretto con fibroblasti su frese in acciaio e frese con rivestimento. Al termine della fase di incubazione di 72 ore le cellule sono state osservate al microscopio ottico.

**Risultati:** non sono stati trovati effetti citotossici del rivestimento. Non sono state osservate cellule infiammatorie a contatto con le frese rivestite.

**Conclusioni:** il rivestimento TiAlN rappresenta una soluzione innovativa di sicuro interesse sia perché in grado di aumentare la durezza dello strumento e di ridurre l'usura e l'ossidazione, sia perché conferisce alla porzione rivestita della fresa un colore nero che facilita il riconoscimento delle tacche di profondità da parte dell'operatore durante l'osteotomia implantare.

## Tommaso Grandi

Professore a contratto, Dipartimento ad attività integrata di Chirurgie specialistiche Testa- Collo, Università di Modena e Reggio Emilia.

## Giovanna Garuti

Professore a contratto, Dipartimento ad attività integrata di Chirurgie specialistiche Testa- Collo, Università di Modena e Reggio Emilia.

## Paolo Guazzi

Libero professionista in Modena.

## Andrea Forabosco

Professore associato, Presidente del Corso di Laurea in Igiene Dentale, Università di Modena e Reggio Emilia.

## Corrispondenza:

Andrea Forabosco  
Viale Buon Pastore, 236  
41100 Modena  
Tel. 059-394593  
Cell. 3357870371  
Fax 059-394593  
andrea.forabosco@unimore.it

## INTRODUZIONE

Il successo di una riabilitazione implantare dipende in gran parte dalla capacità di guarigione primaria dell'osso alveolare che determina l'osteointegrazione dell'impianto<sup>1</sup>. La preparazione corretta del sito implantare e la presenza di un osso sano sono di importanza fondamentale per la guarigione primaria. L'osteotomia mediante frese provoca non solo un trauma meccanico ma anche un aumento della temperatura dell'osso che deve riparare intorno all'impianto. Il trauma termico provocato durante la preparazione implantare rappresenta un fattore importante che influenza l'osteointegrazione e dunque la soprav-

vivenza implantare. La necrosi ossea si manifesta quando la temperatura supera i 47° C per più di 1 minuto<sup>2</sup>. Pertanto l'insulto termico e meccanico all'osso deve essere minimizzato durante l'osteotomia implantare. Per questo le frese devono essere utilizzate con irrigazione per impedire il surriscaldamento del tessuto osseo. È stato osservato che temperature più elevate vengono raggiunte nella corticale esterna rispetto che al fondo dell'osteotomia e quindi è preferibile utilizzare un'irrigazione esterna della fresa<sup>3,4</sup>. È necessario effettuare un movimento continuo "dentro e fuori" per evitare di esercitare una pressione eccessiva. Se la fresa diminuisce la sua capacità di taglio, l'operatore deve sostituirla con una nuova.

È stato stimato che la fresa dovrebbe essere sostituita dopo circa 50 osteotomie, se non altro per la corrosione che compare sulle lame<sup>5</sup>.

Per incrementare le performance delle frese per implantologia sono stati studiati dei rivestimenti per aumentarne la durezza superficiale e ridurre l'usura. In particolare si è pensato di utilizzare un rivestimento ceramico di nitruro di titanio-alluminio (TiAlN). Il coating aderisce con uno spessore di 2-3  $\mu\text{m}$  alla superficie della fresa mediante un procedimento PVD (Physical Vapour Deposition) e conferisce allo strumento una maggiore durezza superficiale, un coefficiente di attrito migliore, un'elevata resistenza all'usura e un'eccellente proprietà di resistenza alla ossidazione. Le tecniche PVD all'interno dell'Ingegneria delle Superfici, rappresentano la famiglia di processi più "puliti" dal punto di vista ambientale diretto, in quanto avvengono in vuoto spinto e con l'uso molto limitato di gas (spesso inerti come l'argon), e dal punto di vista della contaminazione del rivestimento, essendo possibile un controllo molto preciso dei parametri e, quindi, delle proprietà del film ottenuto. La deposizione, infatti, avviene estraendo il materiale da riporto da una sorgente solida a livello "atomico", ovvero per estrazione di atomi o molecole dalla superficie della sorgente attraverso un arco elettrico o un gas inerte allo stato di plasma che erode gradualmente la sorgente e successiva condensazione sul componente da rivestire.

Il coating TiAlN, oltre a migliorarne le caratteristiche di lavoro, conferisce alla porzione rivestita della fresa un colore nero che facilita il riconoscimento delle tacche di profondità da parte dell'operatore durante l'osteotomia implantare.

Di fronte ai suddetti vantaggi gli Autori hanno voluto indagare la biocompatibilità del coating TiAlN utilizzato per le frese da implantologia.

Obiettivo del presente lavoro dunque è stato quello di valutare comparativamente le caratteristiche di citotossicità di campioni di frese per implantologia realizzate in acciaio AISI 630, sia in forma tale quale sia rivestita in TiAlN.

## ■ MATERIALI E METODI

Il materiale sperimentale era costituito da 10 frese per implantologia realizzate in acciaio AISI 630 (JDentalCare, Modena): 5 di queste frese erano state sottoposte a rivestimento PVD Hyperlox per

impieghi medicali (Lafer, Piacenza) e risultavano, quindi, ricoperte in TiAlN a livello della punta.

I materiali sono stati sterilizzati mediante calore umido da autoclave, in particolare per 45 minuti a 121° C.

Sono state condotte prove di citotossicità per contatto diretto. Le cellule utilizzate per la verifica della citotossicità sono stati fibroblasti di tessuto connettivo muscolare di topo L-929 (BS CL 56), acquistati presso il Centro Substrati Cellulari dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Si tratta di una linea cellulare continua ancoraggio-dipendente, cioè che necessita per crescere e proliferare di un substrato a cui aderire.

Una sospensione di  $2,25 \times 10^5$  fibroblasti in 4,0 mL di terreno Minimum Essential Eagle's Medium (EMEM, Lonza Milano srl, Milano), addizionato di 10% di siero di feto bovino, L-glutamina, penicillina e streptomina è stata introdotta in contenitori sterili in polistirene per colture cellulari a scomparti. Contemporaneamente le punte in acciaio AISI 630, rivestite e non, estratte sotto cappa a flusso laminare dalla busta sigillata in cui erano state sterilizzate in autoclave, sono state introdotte all'interno degli scomparti (una fresa per ciascun scomparto) e poste a diretto contatto con la sospensione cellulare.

Sono stati introdotti anche 4 controllo negativi, cioè sicuramente privi di effetti citotossici (cilindri d'oro puro di dimensioni comparabili a quelle dei campioni) e 4 controlli positivi, cioè dotati per certo di effetti citotossici (cilindri di gomma nitrilica, di dimensioni comparabili con quelle dei campioni). I contenitori sono stati successivamente posti in incubatore a 37° C, 5% di CO<sub>2</sub> e umidità relativa del 98% per 72 ore (Figg. 1,2). Al termine delle 72 ore di crescita, le cellule cresciute a diretto contatto con i materiali in esame sono state osservate al microscopio ottico invertito LEICA, DM IL. In particolare è stato osservato e documentato tutto il perimetro di ciascun campione per evidenziare, anzitutto, il livello di proliferazione cellulare, quindi, l'eventuale presenza di cellule morte, di cellule a morfologia alterata, di cellule giganti multinucleate (indice di presenza di effetti di tipo infiammatorio). I risultati qualitativi dell'osservazione microscopica sono stati confrontati con quanto osservato a livello dello strato cellulare a contatto con il controllo negativo (i cilindri d'oro) e a contatto con il controllo positivo (i cilindri di gomma

nitrilica). Dopo l'osservazione microscopica, le cellule sono state fissate con una soluzione costituita da tampone fosfato Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Lonza Milano srl, Milano) e glutaraldeide 4%, colorate con blu di toluidina e infine fotografate con macchina digitale.

## ■ RISULTATI

Le frese a contatto con le cellule L929 al termine della fase di incubazione e della fase di fissazione e colorazione giacciono su un tappeto cellulare continuo e compatto, di un colore blu-violetto omogeneo grazie alla colorazione con blu di toluidina. Già dalle foto macroscopiche è possibile osservare l'assenza di effetti citotossici che avrebbero prodotto aree prive di colore tanto più ampie quanto più intensi i fenomeni citotossici (Fig. 3,4).

A livello microscopico, la figura 5 mostra lo strato di cellule L929 cresciuto a contatto con il controllo negativo, cioè a contatto con i cilindri d'oro puro: come atteso le cellule, che in seguito alla colorazione con blu di toluidina appaiono di colore blu-violetto intenso, presentano un'elevata densità (tutto lo spazio a disposizione è stato colonizzato), la consueta forma poligonale e risultano ben ancorate al fondo del contenitore in polistirene. Non sono presenti in numero significativo cellule giganti multinucleate, indice di fenomeni infiammatori. Al contrario dalla figura 6, che presenta il risultato ottenuto con il controllo positivo, cioè a contatto con i cilindri di gomma nitrilica, emerge un quadro completamente diverso: la densità cellulare risulta ridotta di più del 90% e le poche cellule rimaste appaiono per lo più distaccate o in fase di distacco dal fondo del pozzetto e con morfologia rotondeggiante, ossia completamente diversa da quelle del controllo negativo, conseguenza dell'esposizione a molecole citotossiche.



**Fig. 1** Immagine macroscopica della fresa in acciaio AISI 630 non rivestita posta nel contenitore per cellule al termine delle 72 ore di incubazione.



**Fig. 2** Immagine macroscopica della fresa in acciaio AISI 630 rivestita TiAlN posta nel contenitore per cellule al termine delle 72 ore di incubazione.



**Fig. 3** Immagine macroscopica della fresa in acciaio AISI 630 non rivestita posta nel contenitore per cellule dopo il processo di colorazione con blu di toluidina.



**Fig. 4** Immagine macroscopica della fresa in acciaio AISI 630 rivestita TiAlN posta nel contenitore per cellule dopo il processo di colorazione con blu di toluidina.

Dal momento che i controlli negativi e positivi hanno dato i risultati attesi è possibile accettare come valido l'esperimento attuato.

Le figure 7, 8 mostrano il risultato ottenuto con le frese in acciaio AISI 630 non ricoperte: in tutto il contenitore, indipendentemente dalla porzione analizzata, le cellule hanno sempre evidenziato densità e morfologia del tutto confrontabili con quelle del controllo negativo. I fibroblasti hanno proliferato in modo omogeneo anche a stretto contatto della fresa in quanto dal materiale non viene rilasciato alcun elemento citotossico.

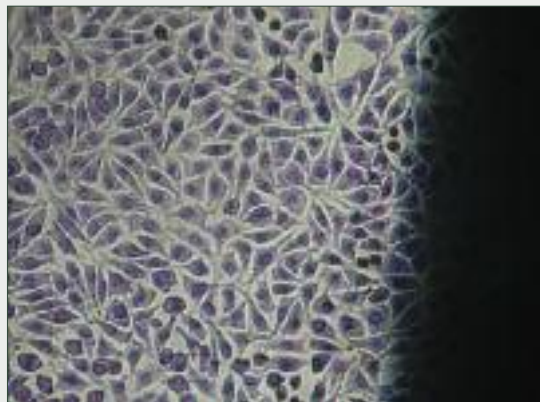
Le figure 9, 10 mostrano il risultato ottenuto a livello della porzione della fresa sottoposta a rivestimento PVD TiAlN: anche in questo caso in tutto il contenitore, indipendentemente dalla porzione analizzata, le cellule hanno mostrato densità e morfologia del tutto confrontabili con quelle del controllo negativo. I fibroblasti esposti a zone di diversa composizione chimica superficiale a

contatto con il medesimo dispositivo, hanno proliferato in modo omogeneamente normale in quanto non disturbati dal rilascio di alcun elemento citotossico. Non sono mai state evidenziate cellule giganti multinucleate ad indicazione dell'assenza di effetti di tipo infiammatorio.

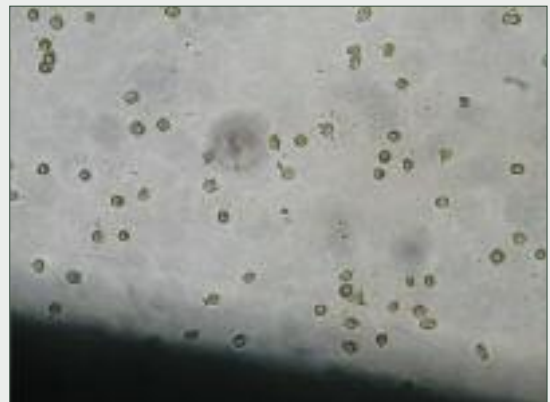
Inoltre queste foto indicano l'assenza di frammenti di rivestimento, ossia l'assenza di fenomeni di distacco del coating.

## ■ DISCUSSIONE

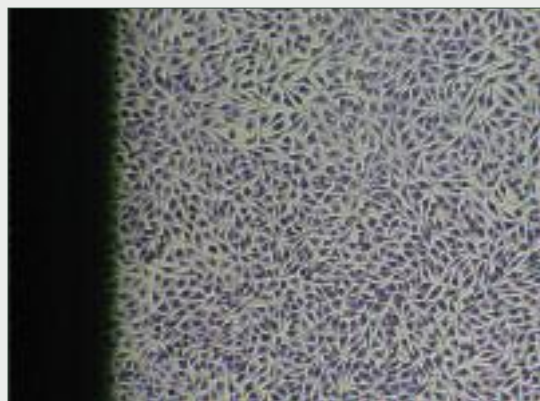
La preparazione del sito implantare mediante frese chirurgiche può portare a una necrosi ossea se non viene rispettata la fisiologia e si determina un danno termico irreversibile. La riparazione avviene attraverso la formazione di tessuto fibroso all'interfaccia osso-impianto e ciò può



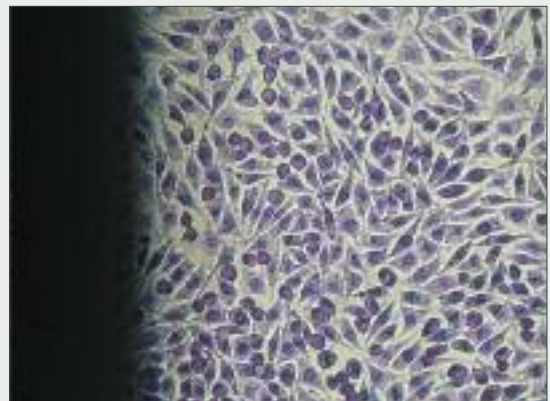
**Fig. 5** Immagine microscopica 200x delle cellule cresciute a contatto con il controllo negativo, ossia i cilindri di oro puro, dopo la colorazione con blu di toluidina.



**Fig. 6** Immagine microscopica 200x delle cellule a contatto con il controllo positivo, ossia i cilindri di gomma nitrilica, dopo la colorazione con blu di toluidina.



**Fig. 7** Immagine microscopica 100x delle cellule a contatto con una fresa in acciaio AISI 630 non rivestita dopo la colorazione con blu di toluidina.



**Fig. 8** Immagine microscopica a più forte ingrandimento (200x) delle cellule a contatto con una fresa in acciaio AISI 630. I fibroblasti appaiono con una densità e una morfologia del tutto confrontabili con quelli del controllo negativo.

compromettere la prognosi a lungo termine della riabilitazione implantare.

Il danno termico al tessuto osseo è dovuto in gran parte all'utilizzo di strumenti rotanti non idonei o all'utilizzo scorretto.

È sempre consigliato iniziare a fresare l'osso con una fresa di calibro ridotto per ridurre il tempo di fresaggio e rendersi conto della qualità ossea. In presenza di osso di scarsa qualità (tipo III o IV) si possono utilizzare le frese con un'alta velocità (1200-1500 rpm) sotto abbondante irrigazione di acqua. In presenza di osso duro (tipo I e II) è preferibile utilizzare le frese a una velocità più ridotta (400-600 rpm)<sup>6</sup>.

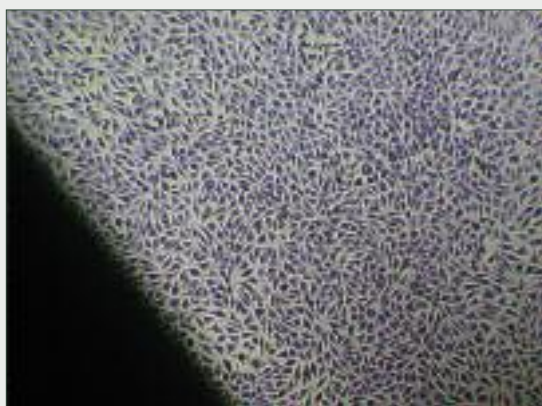
Le frese chirurgiche per implantologia comunemente prodotte in acciaio AISI 630 vanno incontro a usura e devono essere sostituite periodicamente<sup>7</sup>. L'utilizzo di una fresa usurata infatti determina una minore efficienza di taglio e pertanto l'operatore sarà costretto a esercitare sull'osso una pressione maggiore per un tempo più lungo determinando così un danno termico<sup>8</sup>. In uno studio su animale è stato valutato l'effetto di fresaggi nell'osso effettuati con frese nuove e non sull'espressione cellulare di osteoprotegerina e proteina RANKL<sup>9</sup>. È stato osservato che le frese che avevano già effettuato trenta perforazioni alteravano l'equilibrio proteico. In un altro studio su modello animale è stato osservato che non ci sono differenze nel comportamento di frese a doppia o tripla elica; entrambe determinano un aumento critico di temperatura del tessuto osseo dopo circa venticinque utilizzi<sup>10</sup>.

Per migliorare le caratteristiche di lavoro delle frese per implantologia sono stati studiati dei rivestimenti superficiali. Frese rivestite in TiN vengono utilizzate già da anni e presentano una resistenza all'usura maggiore rispetto alle frese in acciaio standard<sup>7</sup>.

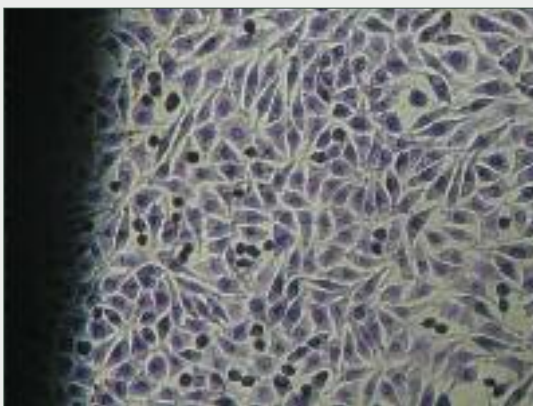
Durante l'intervento chirurgico spesso l'operatore lamenta difficoltà nella visione delle tacche di profondità sulle frese in acciaio che risulta ostacolata dalla presenza di sangue, saliva e dal riflesso della luce della lampada del riunito. Per questo motivo si è pensato di utilizzare un coating che rendesse la fresa di colore nero. Il rivestimento in nitruro di titanio-alluminio (TiAlN) dello strumento aumenta la durezza superficiale, il coefficiente di attrito, la resistenza all'usura e la resistenza alla ossidazione. Inoltre questo coating conferisce alla porzione rivestita della fresa un colore nero che facilita il riconoscimento delle tacche di profondità da parte dell'operatore durante l'osteotomia implantare.

In questo studio è stata verificata la citotossicità di frese rivestite in TiAlN comparandola con quella di frese in acciaio AISI 630.

Dallo studio eseguito è possibile concludere che le frese prodotte da JDentalCare rivestite PVD TiAlN sono prive di effetti citotossici. I fibroblasti hanno proliferato in modo omogeneo anche a stretto contatto della fresa in quanto dal materiale non viene rilasciato alcun elemento citotossico. Non sono state evidenziate cellule di tipo infiammatorio in numero superiore a quanto documentato per il controllo negativo.



**Fig. 9** Immagine microscopica 100x delle cellule a contatto con una fresa con rivestimento TiAlN dopo la colorazione con blu di toluidina.



**Fig. 10** Immagine microscopica a più forte ingrandimento (200x) delle cellule a contatto con una fresa con rivestimento TiAlN. I fibroblasti non sono stati disturbati dal rilascio di alcun elemento citotossico. Non si osservano fenomeni di distacco del coating.

In base ai risultati di questo studio è possibile concludere che le frese per implantologia rivestite PVD TiAlN rappresentano una soluzione innovativa di sicuro interesse sia perché in grado di aumentare le performance dello strumento, riducendo così i rischi di danno termico all'osso, sia perché facilitano all'operatore la visione delle tacche di profondità durante l'intervento in conseguenza della loro colorazione nera.

## ■ BIBLIOGRAFIA

1. Alberktsson T, Brånemark P-I, Hansson HA, Lindstrom J. Osteointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopædica Scandinavica* 1981;52:155-170.
2. Eriksson RA, Alberktsson T. Temperature threshold levels for heat induced bone tissue injury: a vital microscopic study in rabbit. *Journal of Prosthetic Dentistry* 1983;50: 101-107.
3. Cem Sener B, Dergin G, Gursoy B, Kelesoglu E, Slih I. Effects of irrigation temperature on heat control in vitro at different drilling depths *Clinical Oral Implant Research* 2009;20: 294-98.
4. Augustin G, Davila S, Mihoci K, Udiljak T, Vedrina DS, Anatabak A. Thermal osteonecrosis and bone drilling parameters revisited. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 2008;128(1):71-77.
5. Olive FL Allsobrook, Leichter J, Holborow D, Swain M. Descriptive study of the longevity of dental implant surgery drills. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* Published online Sep 2009 DOI 10.1111/j.1708-8208.2009.00205x.
6. Reingewirtz Y, Szmukler-Moncler S, Senger B. Influence of different parameters on bone heating and drilling time in implantology. *Clinical Oral Implant Research*, 1997;8:189-197.
7. Ercoli C, Funkenbusch PD, Lee HJ, Moss ME, Graser GN. The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy preparation for dental implants: a study of drill durability. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2004;19(3):335-349.
8. Abouzgia MB, James DF. Temperature rise during drilling through bone. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* 1997;12(3):342-353.
9. Pereira Queiroz T, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia IR, VieiraEH. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008;6:1233-1240.
10. Chacon GE, Bower DL, Larsen PE, McGlumphy EA, Beck FM. Heat production by 3 implant drill systems after repeated drilling and sterilization. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2006;64(2):265-269.

Tommaso Grandi, Giovanna Garuti, Paolo Guazzi, Andrea Forabosco

## Comparative study of the citotoxicity of drills steel and coated with TiAlN for dental implantology

**KEY WORDS:** Surgery drills, Bone drilling, Heat, Wear, Coating TiAlN.

**Aim:** A TiAlN coating was performed to improve the performance of the surgery drills and to reduce the wear. This paper studied the citotoxicity of the coating TiAlN compared with that of the standard steel drills.

**Materials and methods:** Citotoxicity tests were conducted by direct contact with fibroblasts and steel drills or drills coated. At the end of the 72h incubation period the cells were observed by light microscopy.

**Results:** No cytotoxic effects of the coating on fibroblast were found. No inflammatory cells were observed.

**Conclusions:** The TiAlN coating represents an innovative solution. This coating is not citotoxic, increases the hardness of the drill and reduces the wear and oxidation, gives to the drill a black colour which facilitates recognition of the depth marks by the dentist during the implant osteotomy.