

ПРЕИМУЩЕСТВА БИОСОВМЕСТИМОГО ПОКРЫТИЯ РАТЕКС ДЛЯ ДЕНТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ, ПАРАКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Новиков С.В., Тамазов И.Д., Тополянский П.А., Тополянский А.П.

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, ООО «Плазмацентр», Санкт-Петербург, Россия

Рассмотрена актуальность применения для дентальных имплантационных систем технологии нанесения тонкопленочных биосовместимых покрытий. Обоснован выбор и разработан процесс химического осаждения из паровой фазы (PACVD) для нанесения биосовместимого стеклокерамического покрытия Pateks (системы SiOCN) в клинических условиях. Используемое для этой цели оборудование является малогабаритным и низкоэнергетичным. Представленные исследования дентальных имплантатов с покрытием Pateks обосновывают возможность его нанесения в клинических условиях.

Ключевые слова: дентальный имплантат, биосовместимые покрытия, плазменная стерилизация.

Актуальность

Производители имплантационных систем постоянно совершенствуют их геометрию, применяют современные технологии и новые материалы. При этом, как было выявлено экспертной группой ученых при исследовании 62-х наиболее часто используемых видов имплантатов, большинство из них имеют не удаляемые загрязнения, повышающие риск их ранней утраты или развитие периимплантита [1]. В связи с этим перед врачами-стоматологами стоят задачи выбора оптимальной системы дентальных имплантатов и минимизации загрязненности их поверхности внутрикостной части.

Дентальные титановые имплантаты с минимальной шероховатостью используются уже более 50 лет. Имплантаты с развитой и одновременно модифицированной наружной поверхностью активно стали изготавливаться с начала 2000 годов при применении абразивно-струйной (пескоструйной, дробеструйной) обработки, травления (химического, ионного), электрохимического (анодного) и микродугового оксидирования (анодирования, пассивации), плазменное нанесение порошковых покрытий и других методов. Данные исследования посвящены дентальным имплантатам с минимальной исходной шероховатостью внутрикостной части и наличием тонкопленочного покрытия, обеспечивающего биосовместимые свойства. Эти покрытия способны минимизировать проблемы, связанные с выходом в окружающие ткани ионов токсичных легирующих элементов исходного материала и обеспечить снижение износа контактных поверхностей имплантатов, абатментов и винтов.

Для нанесения тонкопленочных покрытий на дентальные имплантаты с минимальной шероховатостью предлагается использовать, в основном, процессы физического осаждения из паровой фазы (PVD) [2-5]. Для реализации этих технологий применяется наукоёмкое, сложное и габаритное оборудование, эксплуатация которого требует высококвалифицированного персонала, специально оборудованного помещения, дополнительных методов обработки.

Нанесение тонкопленочных покрытий на дентальные имплантаты с одновременной их плазменной стерилизацией с использованием не сложного, малогабаритного и низкоэнергетичного оборудования является актуальной задачей.

Покрытия на основе соединений кремния получили известность после широкомасштабных исследований последних лет, доказывающих их перспективность применения [6]. Отечественными учеными также указывалось на эффективность использования таких покрытий в медицине [7].

Метод химического осаждения тонкопленочных покрытий из паровой фазы с использованием холодной атмосферной плазмы

Для нанесения тонкопленочных покрытий в клинических условиях разработан метод химического осаждения покрытий из паровой фазы в условиях плазменного ассистирования холодной атмосферной плазмой (PFCVD) [8]. Данный процесс осуществляется без вакуума и специализированных камер при локальном воздействии высокоскоростного атомарного и молекулярного плазменного потока с обрабатываемым изделием одновременно с его активацией. Для реализации технологии используется малогабаритный плазмохимический реактор, циклически перемещаемый относительно обрабатываемых поверхностей. Также возможно сканирование изделий относительно неподвижного плазмохимического реактора. Формирование покрытия осуществляется в результате химических реакций, протекающих вблизи от поверхности, на поверхности и в приповерхностном слое подложки дентальных имплантатов в условиях локализованной плазменной активации. При этом проявляются все основные активационные эффекты этого воздействия, а именно: тепловые и газодинамические свойства плазменного потока; наличие направленного потока ионизированных и возбужденных частиц; испускание инфракрасного, видимого и ультрафиолетового излучения; образование озона; наличие низкочастотных и высокочастотных пульсаций плазмы. Отличительной характеристикой процесса является минимальный нагрев дентальных имплантатов при нанесении покрытий, не превышающий 100°C за счет возможности скоростного перемещения плазмохимического реактора или дентальных имплантатов. Осаждаемые покрытия являются мультислойными (50-250 слоев) с нанометровым диапазоном монослоев (2-20 нм). Для нанесения данных покрытий используются жидкие прекурсоры на основе элементоорганических и неорганических жидкостей семейства СЕТОЛ, суммарный годовой расход которых при односменной работе оборудования составляет примерно 0,5 литра. Данные покрытия являются аморфными, благодаря использованию прекурсоров, имеющих в своем составе элементы - аморфизаторы, а также в связи с высокими скоростями их охлаждения в процессе осаждения, равными (10^{10} – 10^{12}) К/с [8].

Для реализации данного процесса разработано малогабаритное и низкоэнергетичное оборудование для нанесения биосовместимых покрытий на дентальные имплантаты с одновременной их плазменной стерилизацией (рис. 1, 2) [9].

Обработка холодной атмосферной плазмой в дентальной имплантологии наиболее активно стала использоваться в международной практике в последние десять лет [10]. Она обеспечивает улучшение адгезии факторов роста клеток костной ткани за счет изменения шероховатости и увеличения смачиваемости поверхности внутрикостной части дентальных имплантатов [11-13].



Рис. 1. Установка для клинического нанесения покрытия Pateks на имплантационные системы с одновременной их плазменной стерилизацией



Рис. 2. Процесс нанесения биосовместимого покрытия Pateks с плазменной стерилизацией вертикального винта для абатмента имплантата

Требования к выбору материалов тонкопленочных покрытий дентальных имплантатов

При выборе материала биосовместимого покрытия, наносимого с использованием разработанного оборудования, основное внимание уделялось:

- керамическим материалам, так как керамика является диэлектриком, а диэлектрические свойства поверхностного слоя имплантатов обеспечивают отсутствие электрогальванических эффектов в полости рта и формирование отрицательно-монопольного электрета для адсорбции протеинов факторов роста костной ткани;
- осаждению покрытий в аморфном стеклообразном состоянии, позволяющем заполнять впадины шероховатой поверхности внутрикостной части дентальных имплантатов, уменьшающем количество микродефектов на их поверхности и тем самым снижающем способность прикрепления биопленки бактерий;
- физико-механическим свойствам материала покрытия, обладающим увеличенной твердостью при низком модуле упругости, повышенным упругим восстановлением и близостью модулей упругости покрытия и титанового материала дентальных имплантатов;
- повышенной адгезии наносимых при атмосферном давлении покрытий к оксидной пленке на исходном материале имплантатов;
- повышенной гидрофильности и смачиваемости поверхности с покрытием внутрикостной части дентальных имплантатов, что является условием остеоинтеграции.

На основании вышеприведенных требований были разработаны биосовместимые стеклокерамические покрытия системы SiOCN (покрытие Pateks).

Исследования плазменной технологии стерилизации с получением покрытия Pateks для дентальных имплантатов

Инфекция является одной из возможных причин неудачной дентальной имплантации и может привести к развитию периимплантита. Поэтому обработка поверхностей имплантатов непосредственно перед их установкой плазмой должна обеспечить их дополнительную стерилизацию.

Эффективность плазменной стерилизации имплантатов, проводимой одновременно с нанесением покрытия Pateks, оценивалась на модельных образцах из титанового сплава Grade 5 (рис. 3). Исследования проводились в РНИИТО им. Р.Р. Вредена.



Рис. 3. Вид экспериментальных имплантатов

После вскрытия стерильной упаковки на девять образцов наносилось покрытие Pateks толщиной 0,1-0,2 мкм на установке ТЕСИС-116 (рис. 1). После этого образцы отдельно укладывались индивидуальным стерильным инструментом в стерильный бокс за минимально короткое время (не более 5 секунд). Длительность переноса образцов до момента начала исследований – 1,5 часа.

Для оценки роста аэробных и факультативно - анаэробных микроорганизмов образцы (пять с нанесенным покрытием и два необработанных) помещались в питательную среду из триптон-соевого бульона (Oxoid, Великобритания). Для оценки роста анаэробных микроорганизмов четыре образца с покрытием и один необработанный образец помещались в анаэробный бульон (НИЦФ, Россия). Все образцы инкубировали в течение более чем 20 часов при температуре 37°C при визуальном контроле наличия микробного роста через 20 часов, 2 суток, 3 суток и 14 суток.

Анализ микробного роста (рис. 4) показал, что для всех девяти образцов с покрытием бактериальный рост отсутствовал при инкубации в любой из двух сред и в течение всех контрольных временных периодов. Для четырех исходно нестерильных образцов наблюдался микробный рост в обеих питательных средах уже после первой контрольной временной точки - 20 часов инкубации.

Таким образом, учитывая отсутствие микробного роста для всех девяти образцов с покрытием Pateks, можно заключить, что процесс нанесения покрытия обеспечивает их стерильность.

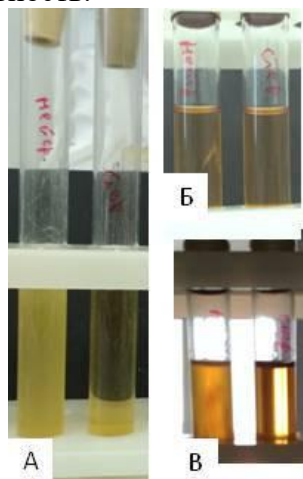


Рис. 4. Вид образцов с бактериальным ростом и его отсутствием, где А - образцы в триптон-соевом бульоне, сутки инкубации, нестерильный и стерильный соответственно; Б - образцы в анаэробном бульоне, сутки инкубации, нестерильный и стерильный соответственно; В - образцы в анаэробном бульоне, 14 суток инкубации, нестерильный и стерильный соответственно

Цитотоксические исследования экспериментальных имплантатов с покрытием Pateks in vitro

В экспериментах использовались образцы имплантатов, изготовленные из титанового сплава Grade 5 – близкого аналога российского материала ВТ6 (рис. 3) с покрытием Pateks системы SiOCN (4 шт.) и аналогичные образцы без покрытия (4 шт.). Толщина наносимых покрытий составляла 0,5-0,7 мкм. Исследования проводилось в ФГБУ «НИИ гриппа». Проявление цитотоксичности in vitro определялось в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-5.

Подготовку образцов проводили путем изготовления экстрактов в стерильных условиях. Модельной средой для вытяжек служила культуральная бессывороточная среда альфа-МЕМ (ООО «БиолоТ», Россия), которая кроме этого использовалась в ходе определения цитотоксичности в качестве отрицательного контроля.

Каждый образец помещали в индивидуальную стерильную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой. Объем культуральной среды составлял 1 мл для каждого образца. Пробирки устанавливались в термостат с температурой 37°C. Длительность экстракции образцов составляла 24 и 72 часа. Для выявления цитотоксичности экстрактов были выбраны фибробласты соединительной ткани легкого эмбриона человека. Клетки культивировали в среде альфа-МЕМ с добавлением 2% сыворотки теленка (Sigma, США).

Три 96-луночные планшеты засеивались фибробластами в посевной концентрации 20 тыс/мл. В течение суток клетки инкубировались в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Тестирование начинали на суточном клеточном монослое, достигшем субконфлуэнтности. Длительность экспозиции составила 72 часа в CO₂-инкубаторе.

Состояние монослоя и морфологии клеток контролировали ежедневно с помощью инвертированного микроскопа Unico (United Products & Instruments, США). Количественным тестом служила окраска тетразолиевым красителем тиазолилом голубым (Sigma, США), интенсивность которой в клетках пропорциональна активности их дыхания (тест МТТ). Результаты анализа снимали на планшетном анализаторе Varioskan (Thermo Fisher Scientific, США) при характеристической длине волны 550 нм. Полученные данные обрабатывались в программе Excel 2010.

В течение всего времени инкубации фибробластов с экстрактами из образцов не было отмечено никаких изменений ни в морфологии клеток, ни в состоянии монослоя в целом по сравнению с клетками в отрицательном контроле.

В результате исследований выявлено (табл. 1), что образцы с покрытием Pateks практически не действуют на клетки, как к 24-часовых, так и 72-часовых вытяжек. Клетки в присутствии 72-часовых экстрактов с имплантатами из титанового сплава Grade 5 также не отличались от контрольных.

Таблица 1. Влияние покрытия имплантатов на жизнеспособность линии диплоидных фибробластов легкого человека по результатам МТТ-теста

Вид покрытия и исходный материал	Экстракция 24 часа		Экстракция 72 часа	
	% от контроля	Отклонение от контроля	% от контроля	Отклонение от контроля
Pateks	107,7±6,2	7,7	106,9±4,8	6,9
Титановый сплав Grade 5	-	-	98,0±2,4	2,0

Примечание: величина отклонения от контроля >10 является цитотоксичной для фибробластов легкого человека.

Таким образом, образцы имплантатов с покрытием Pateks безопасны для культуры фибробластов легкого эмбриона человека.

Биологические исследования экспериментальных имплантатов с покрытием Pateks in vivo

Контактный и дистантный остеогенез в области установленных имплантатов с покрытием Pateks и контрольных титановых имплантатов без покрытия изучался путем оценки реакции костной ткани в области метафиза и диафиза бедренной кости кроликов через 4 и 12 недель. Толщина нанесенных покрытий составляла 0,5-0,7 мкм. Исследования проводились в РНИИТО им. Р.Р. Вредена с разрешения этической комиссии.

В эксперименте участвовало шесть кроликов породы шиншилла, в правую заднюю лапу которым устанавливались экспериментальные имплантаты с покрытием Pateks (рис. 3), а в левую заднюю лапу - аналогичные контрольные имплантаты без покрытия (материал имплантата - титановый сплав Grade 5). Имплантаты устанавливались в зоны диафиза (контактный остеогенез) и эпифиза (дистантный остеогенез) бедренной кости. В проводимом исследовании три кролика выводились из эксперимента через 4 недели, а три кролика - через 12 недель.

В процессе исследований производилась:

- декальцинация с использованием ультразвукового декальцинатора U-200 (Mtpoint, Россия);
- перенос материала в гистологическом процессоре для автоматической проводки STP 120 (Thermo Fisher Scientific, США);
- заливка в парафин на станции заливки Tissue-Tek® TEC™ 5 (Sakura Seiki Co., Ltd., Япония);
- микротомия на ротационном микротоме RMD-4000 (Mtpoint, Россия);
- окраска гематоксилином и эозином в аппарате для автоматической окраски материала Rfaello (DiaPath, Италия);
- дополнительная окраска азур-эозином по Романовскому;
- окраска альциановым синим в наборе для окраски препаратов (12 сосудов, Bio Optica, Италия);
- микроскопия микропрепаратов на микроскопе Nikon Eclipse 50i (NIKON, Япония).

Через 4 недели после проведенной операции инсталляции имплантатов с покрытием Pateks в компактной пластинке диафиза при плотном прилегании имплантата формировалась пластинчатая костная ткань с организованными балками. В местах не плотного прилегания в области дистантного остеогенеза промежутки восполнялись сформированной костной мозолью, которая до 60% была представлена остеогенной клеточно-волокнутой тканью без признаков воспаления. Костные балки сформированы, как на границе с имплантатом, так и с единичными балками на удалении с формированием мозоли из губчатой кости. Соотношение костной ткани в этих зонах 1:4 (рис. 5, рис. 7 а).

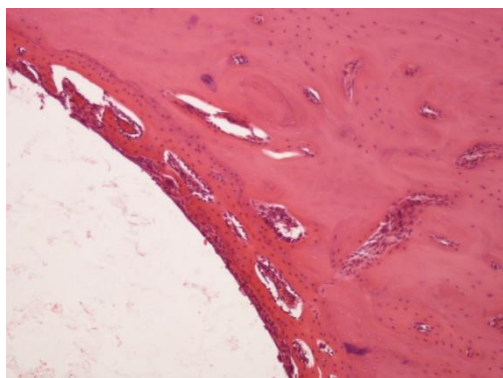


Рис. 5. Микропрепарат. Область плотного прилегания с узкой полоской костной ткани с большим количеством клеточных элементов, x100 (кролик № 3)

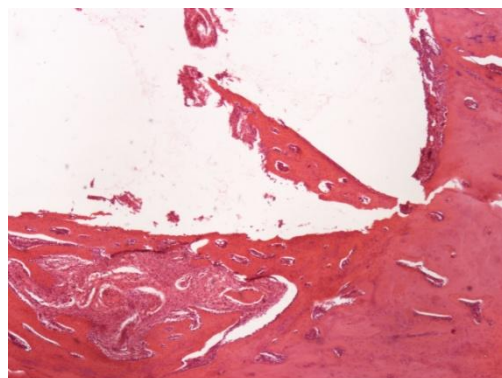
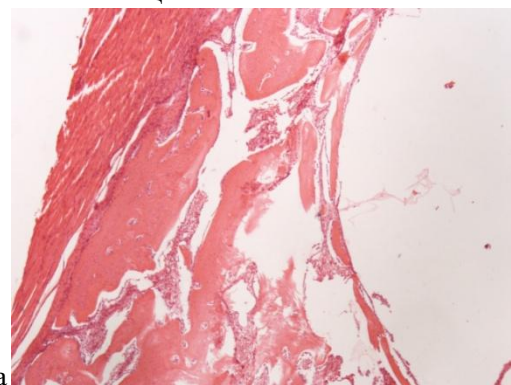
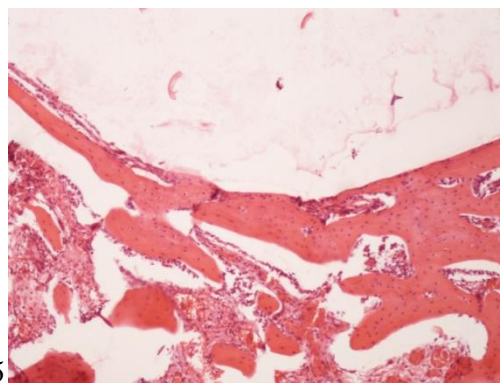


Рис. 6. Микропрепарат. Область не плотного прилегания с узкой полоской костной ткани справа и широкой зоны замещения дефекта внизу, x100 (кролик № 3)

Через 4 недели после проведенной операции инсталляции контрольных титановых имплантатов без покрытия в компактной пластинке диафиза при плотном прилегании имплантата по линии границы имплантат-кость отмечались очаги краевой базофилии, что может свидетельствовать о закислении и повышенной минерализации ионами металлов (рис. 6, рис. 7, б). Кроме этого, по периферии костного ложа в прилежащей компактной пластинке определялась более выраженная декомпактизация и незавершенная реорганизация костных балок. В местах неплотного прилегания в области дистантного остеогенеза промежуток восполнен мозолью из губчатой кости с тонкими костными балками. При этом вокруг сформированного ложа отмечалась декомпактизация кости.



а



б

Рис. 7. Микропрепарат. Губчатая кость сформирована в области метафиза в зоне плотного (а) и не плотного (б) прилегания, x100 (кролик № 2)

Выводы

1. Разработан метод и оборудование для нанесения в клинических условиях биосовместимого стеклокерамического тонкопленочного покрытия Pateks. Процесс осуществляется без использования вакуумных и других специализированных камер при атмосферном давлении с одновременной плазменной стерилизацией.
2. Проведенные исследования плазменной стерилизации имплантатов при нанесении покрытия Pateks показали отсутствие микробного роста при инкубации в триптон-соевом и анаэробном бульонах в течение максимальных 14 суток испытаний.
3. Цитотоксическими исследованиями установлено, что покрытие Pateks на экспериментальных имплантатах не угнетает жизнедеятельность фибробластов легкого эмбриона человека, величина отклонения – 7,7 (величина отклонения от контроля >10 является цитотоксичной для фибробластов легкого человека).

4. При биологических исследованиях *in vivo* на гистологических срезах костной ткани животных, экспериментальные имплантаты с покрытием Pateks по сравнению с имплантатами без покрытия формируют область плотного прилегания с узкой полоской костной ткани с большим количеством клеточных элементов через 4 месяца после инсталляции их в костную ткань животных. Использование покрытия Pateks позволяет добиться более быстрой реорганизации и компактизации костной ткани в области установленного имплантата, независимо от вида протекания остеогенеза при сравнении с исходным материалом Grade 5.

Литература

1. Ушаков А.И. Краткий обзор доклада об исследовании поверхностей моделей имплантатов различных производителей. Российская стоматология. 2014. Т. 7. № 3. - С. 57-68
2. Scarano A., Piattelli M., Vrespa G., Caputi S., Piattelli A. Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: An *in vivo* human study. J. Oral Implant. 2003. 29. - pp. 80-85
3. Youssef S., Al Jabbari, Jennifer Fehrman, Ashley C. Barnes, Angela M. Zapf, Spiros Zinelis and David W. Berz. Titanium Nitride and Nitrogen Ion Implanted Coated Dental Materials. Coatings. 2012. № 2. - pp. 160-178
4. Штанский Д.В., Петржик М.И., Башкова И.А. и др. Адгезионные, фрикционные и деформационные характеристики покрытий Ti-(Ca,Zr)-(C,N,O,P) для ортопедических и зубных имплантов. Физика твердого тела. 2006. № 7 (48). - С. 1231-1238
5. Иванов С.Ю., Царев В.Н., Быстров Ю.А., Ивашкевич С.Г., Чувилкин В.И. Сравнительная оценка адгезивных свойств бактерий полости рта к новому электретному покрытию дентальных имплантатов. Институт стоматологии. 2007. № 2. - С. 80-81
6. Stephen E. Sadow. Silicon Carbide Biotechnology. A Biocompatible Semiconductor for Advanced Biomedical Devices and Applications. 2016. Elsevier. - 356 p.
7. Мансурова Л.А., Федчишин О.В., Трофимов В.В., Зеленина Т.Г., Смолянко Л.Е. Физиологическая роль кремния. Сибирский медицинский журнал. 2009. № 7. - С. 16-18
8. Соснин Н.А., Ермаков С.А., Тополянский П.А. Плазменные технологии. Санкт-Петербург: Изд-во Политехнического ун-та. 2013. - 406 с.
9. Новиков С.В., Тамазов И.Д., Тополянский П.А., Тополянский А.П. Использование холодной атмосферной плазмы в стоматологии. Здоровье и образование в 21 веке. 2018, т. 20, № 1. - С. 124-127
10. Cha S., Park Y.-S. Plasma in dentistry. Clin Plasma Med. 2014 July. 2 (1). - pp. 4-10
11. Arora V., Nikhil V., Suri N.K., Arora P. Cold Atmospheric Plasma (CAP) in Dentistry. Dentistry. 2014. 4. - pp. 189-193
12. Giro G., Tovar N., Witek L., Marin C., Silva N.R., Bonfante E.A. et al. Osseointegration assessment of chairside argon-based nonthermal plasma-treated Ca-P coated dental implants. J. Biomed Mater Res. Part A. 2012. 101. 9. - pp. 1-6
13. Duske K., Koban I., Kindel E., Schroder K., Nebe B., Holtfreter B. et al. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. J. Clin Periodontol. 2012. 39. - pp. 400-407