Новиков С.В., Тамазов И.Д., Тополянский П.А., Тополянский А.П.
Преимущества биосовместимых покрытия pateks для дентальных имплантатов,
параклинические исследования

*Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова*

*ООО «Плазмацентр»
(Россия, Санкт-Петербург)*

doi: 10.18411/lj-05-2019-46

ids: lj-05-2019-46

Аннотация

Рассмотрена актуальность применения для дентальных имплантационных систем технологий нанесения тонкопленочных биосовместимых покрытий. Обоснован выбор и разработан процесс для нанесения биосовместимых стеклокерамических покрытий Pateks (системы SiOCN) в клинических условиях. Используемое для этих задач оборудование является малогабаритным и низкоэнергетичным. Представленные исследования дентальных имплантатов с покрытиями Pateks обосновывают возможность нанесения данных покрытий в клинических условиях.

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

Abstract

Considered the relevance of the application thin-film biocompatible coatings for dental implants. The choice is grounded and the process for applying biocompatible «Pateks» glass-ceramic coatings (SiOCN systems) in a clinical setting is developed. The equipment used for these tasks is small-sized and low-energy-intensive. The presented studies of dental implants with «Pateks» coatings substantiate the possibility of applying these coatings in a clinical setting.

Keywords: Dental implant, biocompatible coating, plasma sterilization

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 стоит задача выбора оптимальной системы дентальных имплантатов, минимизации загрязненности их поверхности внутрикостной части. Достижение этой характеристики является приоритетной задачей данных исследований.

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. Дентальные имплантаты 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 и пониженным износом контактных поверхностей титанового сплава имплантатов, абатментов, 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 низкоэнергоемкого оборудования является актуальной задачей.

Покрытия на основе соединений кремния получили известность после широкомасштабных исследований последних лет, доказывающих их перспективность применения [13]. Отечественными учеными также указывалось на эффективность использования таких покрытий в медицине [14].

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 асистирувания холодной атмосферной плазмой [6]. 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, тем самым исключаящее изменения металлической решетки титанового сплава. Наносимые покрытия являются мультислойными (50-250) 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. Наносимые 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.

Для реализации данного процесса разработано малогабаритное и низкоэнергоемкое оборудование для нанесения биосовместимых покрытий на дентальные имплантаты с одновременной их плазменной стерилизацией (рис. 1, рис. 2) [7].

Обработка холодной атмосферной плазмой в дентальной имплантологии получило развитие в международной практике в последние десять лет [9]. Применение данной технологии, предназначено для улучшения адгезии факторов роста, клеток

костной ткани за счет изменения шероховатости и увеличения смачиваемости поверхности внутрикостной части дентальных имплантатов [10-12].

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

Рис. 2. Процесс нанесения биосовместимого покрытия с плазменной стерилизацией: вертикального винта для абатмента имплантата на оборудовании ООО «Плазмацентр»[7]

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, диэлектрические свойства покрытий, обеспечивают отсутствие электрогальванических эффектов в полости рта, формирование отрицательно-монопольного электрета для адсорбции протеинов факторов роста костной ткани;
- - возможности осаждения покрытий в аморфном стеклообразном состоянии (позволяет заполнять впадины шероховатой поверхности внутрикостной части имплантатов, уменьшить количество микродефектов поверхности дентальных имплантатов, и снизить способность к прикреплению биопленки бактерий);
- - физико-механическим свойствам материала покрытия, которые должны иметь повышенную твердость при низком модуле упругости, иметь повышенные значения упругого восстановления и близость модулей упругости покрытия и титанового материала дентальных имплантатов, способствовать образованию сжимающих напряжений на поверхности имплантатов;
- - повышенной адгезии наносимых при атмосферном давлении покрытий к оксидной пленке;
- - 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 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 (рис. 1). После этого образцы индивидуально 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 плазменного 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-MEM (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-MEM 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 оба вида образцов с покрытиями Pateks и 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 покрытий 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

Таким образом, образцы имплантатов с покрытиями Pateks, безопасны для культуры фибробластов легкого эмбриона человека. Примечание: величина отклонения от контроля >10 является цитотоксичной для фибробластов легкого 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 Rafaello (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 промежуток восполнялся сформированной костной мозолью, которая до 60% была представлена остеогенной клеточно-волокнуистой 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)

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.

Рис. 6. Микропрепарат. Область не плотного прилегания с узкой полоской костной ткани справа и широкой зоны замещения дефекта внизу, $\times 100$ (кролик № 3)

Рис. 7. Микропрепарат. Губчатая кость сформирована в области метафиза в зоне плотного (а) и не плотного (б) прилегания, $\times 100$ (кролик № 2)

Выводы

1. Разработан метод и оборудование для нанесения биосовместимых стеклокерамических тонкопленочных покрытий Pateks методом химического осаждения покрытий из паровой фазы с одновременной плазменной стерилизацией, для применения в клинических условиях.
2. Проведенные исследования плазменной технологии стерилизации имплантатов с покрытием Pateks показали отсутствие микробного роста при инкубации в триптон-соевом и анаэробном бульонах в течение максимальных 14 суток испытаний.
3. Цитотоксическими исследованиями установлено, что покрытия 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

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 электретенному покрытию дентальных имплантатов. Институт стоматологии. 2007. № 2. - С. 80-81
6. Соснин Н.А., Ермаков С.А., Тополянский П.А. Плазменные технологии. Санкт-Петербург: Изд-во Политехнического ун-та. 2013. - 406 с.
7. 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
8. Карасев М.В.
9. www.relyon-plasma.com
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
14. Stephen E. Saddow. Silicon Carbide Biotechnology. A Biocompatible Semiconductor for Advanced Biomedical Devices and Applications. 2016. Elsevier. - 356 p.
15. 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
16. Мансурова Л.А., Скорнякова А.Б., Казимировская В.Б., Трофимов В.В., Воронков М.Г. Исследование репаративной активности силимидиновой пленки. Строение и реакционная способность кремнийорганических соединений. Материалы 5-го Всероссийского симпозиума. Иркутск. 1996. - С. 127
17. Трофимов В.В., Федчишин О.В. Применение гидроксиапатита и кремнийорганических соединений в стоматологической имплантологии. Актуальные проблемы клинической медицины: Материалы X научно практической конференции, Ч.II. - Иркутск. 1999. - С. 127-133
18. Bolz A., Schaldach M. Artificial heart valves: improved blood compatibility by PECVD a-SiC:H coating. Artificial Organs. August 1990. Volume 14. Issue 4.- pp. 260-269
19. Pettersson M., Tkachenko S., Schmidt S. and others. Mechanical and tribological behavior of silicon nitride and silicon carbon nitride coatings for total joint replacements. J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 2013. Sep. Vol. 25. - pp. 41-47
20. Hayakawa T., Yoshinari M., Nemoto K. Characterization and protein-adsorption behavior of deposited organic thin film onto titanium by plasma polymerization with hexamethyldisiloxane. Biomaterials. 2004; 25. - pp. 119-127
21. Патент на изобретение RU 2284794 C2. Способ протезирования при отсутствии коронковой части зуба. Летягин Е.В., Летягина Р.А., Ханов А.М. МПК А61С13/30 (2006.01) Заявка: 2005100392/14, 11.01.2005. опубл. 10.10.2006
22. Воронов И.А., Ишполитов Е.В., Царев В.Н. Подтверждение протективных свойств нового покрытия из карбида кремния «Панцирь» при моделировании микробной адгезии, колонизации и биодеструкции на образцах стоматологических базисных полимеров. Клиническая стоматология. 2016. № 1 (77). - С.60-65
23. Путляев В.И. Современные биокерамические материалы. Соросовский образовательный журнал. 2004. Т. 8. № 1. - С. 44-50
24. Шевейко А.Н., Сухорукова И.В., Кирюханцев-Корнеев Ф.В., Штанский Д. В. Сравнительные исследования структуры и химических свойств наноконпозиционных покрытий TiCaPCON-Ag. Физикохимия поверхности и защита материалов. 2015. Т. 51. № 3. - С. 416-426
25. Лясникова А.В. Теоретические исследования физико-химических процессов формирования и функционирования серебросодержащих наноструктурированных покрытий. Вестник СГТУ. 2009. № 1, т. 2. - С. 80-86