

На правах рукописи

ЗЕЛЕНСКИЙ ВИКТОР ИВАНОВИЧ

**РАЗРАБОТКА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ ДЛЯ
ПОВЕРХНОСТЕЙ ВНУТРИКОСТНЫХ ДЕНТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ.
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.**

14.01.14 - Стоматология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Ставрополь – 2022

Работа выполнена на кафедре стоматологии общей практики и детской стоматологии в Федеральном государственном бюджетном общеобразовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Долгалев Александр Александрович - доктор медицинских наук, доцент

Научный консультант:

Тарала Виталий Алексеевич - кандидат химических наук

Официальные оппоненты:

Лепилин Александр Викторович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой стоматологии хирургической и челюстно-лицевой хирургии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Олесов Егор Евгеньевич – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой клинической стоматологии и имплантологии ФГБУ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «22» июня 2022 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан «___» мая 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

Макеева Мария Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время, в общей структуре стоматологической помощи, дентальная имплантация занимает достаточно прочное место (А.И. Жусев, 2002). Бурное развитие имплантологии в стоматологической практике вполне естественно, по данным статистики, частичная и полная потеря зубов наблюдается более чем у 70% взрослого населения (Н.А. Хачикян, 2015). В этой связи, актуальность восстановительной имплантологии в современных условиях не вызывает сомнений, такой вид минимально инвазивного протезирования позволяет устранять любые дефекты зубных рядов, от единичных до протяженных.

При восстановлении целостности зубочелюстного аппарата, важным фактором успеха является достижение оптимальной остеоинтеграции, то есть устойчивой связи между костным ложем и поверхностью имплантата, образованной за счет прорастания клеток костной ткани в поверхность, либо в структуру имплантата. Успех клинического использования имплантатов составляет полвека и во многом объясняется биосовместимостью, технологичностью обработки и прочностью основного конструкционного материала имплантатов – титана (Азарин Г.С., 2017; Берсанов Р.У., 2016; Иванов С.Ю., 2017).

Ключевыми техническими факторами, от которых зависит остеоинтеграция, являются: качество и структура материала, из которого изготовлен имплантат, форма (дизайн) имплантата и поверхность имплантата (Brenemark, 1983; Albrektsson, 1981). Больным с фоновыми хроническими общесоматическими заболеваниями, такими как: сахарный диабет, остеопороз, последствия лучевой терапии, часто требуется определенный подход к имплантации искусственных конструкций. В этих ситуациях технические характеристики имплантатов становятся решающими факторами для успеха лечения (Thor A., Ekstrand K., Baer R.A., 2015).

Изменение микроструктуры поверхности имплантата и придание ей шероховатости, получаемые при нанообработке стандартного элемента, улучшит остеоинтеграцию. Возможность внедрения в клиническую практику имплантатов с наноструктурированной поверхностью, позволит проводить имплантацию в неблагоприятных клинических условиях.

Для производства дентальных имплантатов, в основном используются химически чистый титан марки VT1-0 (по международному стандарту ASTM — Grade IV) и алюминированно-ванадиевый сплав титана Ti-6Al-4V (отечественный аналог VT6, по международному стандарту ASTM — Grade V) (Mitsuo Niinomi, 2008). Сплав VT6 более прочный, чем сплав VT1-0 (чистый титан), и себестоимость продукции из него более низкая, хотя он тоже имеет определенные недостатки (В.А. Гармата, 1967).

Сплав VT6 не сдерживает стремительного образования соединительной ткани, препятствующей необходимой репарации костной структуры. Макроорганизм не оставляет дентальную имплантацию без «внимания» и ответом на вживление имплантата, являются аллергические и электрохимические реакции. Такое реагирование характерно для сплавов с высокой долей легирующих металлов, каким и является сплав VT6 содержащий алюминий и ванадий.

Также в доступной литературе практически отсутствуют исследования по созданию различных видов поверхности для имплантата, в зависимости от того вида тканей с которым контактирует та или иная поверхность данного имплантата. Нет исследований по дифференцированному нанесению различных поверхностей на один имплантат и тканевому ответу на эти поверхности.

На рынке представлены стандартные дентальные имплантаты с наноструктурированной поверхностью, например, Straumann SLActive (Швейцария), Astra Tech OsteSpeed (Швеция). Данные имплантаты показывают очень высокий уровень остеоинтеграции, в том числе в клинических ситуациях у пациентов с сопутствующей патологией (сахарный диабет, остеопороз и т.д.). К недостаткам этих конструкций можно отнести то, что данные имплантаты изготавливаются из сплава VT1-0, их прочностные характеристики ниже имплантатов из сплава VT6, а стоимость этих имплантатов выше, чем у имплантатов из сплава VT6.

Степень разработанности темы исследования. Использование дентальных имплантатов с наноструктурированной поверхностью дает лучший результат остеоинтеграции (Baer R.A.,

2015). В большинстве случаев имплантаты с SLA поверхностью изготавливаются из сплава VT1-0. Особый интерес, в качестве материала для имплантатов, представляет сплав VT6, обладающий высокими прочностными характеристиками. В литературе отсутствуют сведения об использовании магнетронного распыления чистого Ti, для покрытий внутрикостных дентальных имплантатов из сплава VT6. Это явилось основанием для планирования и проведения научно-исследовательской работы.

Цель исследования: доказать в эксперименте что покрытия, созданные с помощью магнетронной обработки, являются изолирующими, биологически совместимыми и могут быть использованы при производстве дентальных имплантатов из сплавов титана.

Задачи исследования:

1. Исследовать структуру и элементный состав разработанных и произведенных нанопокрываний дентальных имплантатов.
2. Исследовать в эксперименте на клеточных культурах уровень пролиферации и жизнеспособность фибробластов на модифицированных покрытиях титановых имплантатов.
3. Исследовать на экспериментальной модели тканевой ответ на установку имплантатов с модифицированными покрытиями.
4. Проанализировать результаты уровня остеоинтеграции имплантатов с модифицированными покрытиями.

Научная новизна исследования. В работе впервые использован метод магнетронного распыления чистого Ti для получения покрытий, выращенных методом магнетронного распыления на поверхностях образцов дентальных имплантатов изготовленных из сплава VT6. Впервые исследована структура и элементный состав разработанных, модифицированных покрытий.

Впервые исследована биосовместимость на клеточных культурах (фибробластах) модифицированных покрытий дентальных имплантатов.

Впервые исследована биосовместимость на куриных эмбрионах модифицированных покрытий дентальных имплантатов.

Впервые в эксперименте на крупных животных исследован тканевой ответ (остеоинтеграция) модифицированных покрытий дентальных имплантатов.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты позволяют уточнить механизмы клеточных и тканевых ответов на новые модифицированные покрытия титановых имплантатов. Исследован механизм формирования здоровой костной ткани вокруг имплантатов, который позволяет использовать эти знания для повышения эффективности лечения частичной и полной потери зубов, особенно у пациентов пожилого возраста и с сопутствующей патологией. Полученные данные планируются использоваться при производстве дентальных имплантатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Методом магнетронного распыления получены модифицированные покрытия на основе Титана с концентрациями примесей алюминия порядка 0,19 ат.%, что значительно меньше чем в сплаве VT6, и низкой концентрацией Ванадия, которая была ниже предела обнаружения метода энергодисперсионной спектроскопии.

2. Клетки, культивированные в присутствии образца сплава VT6 с модифицированным покрытием, полученным при магнетронном распылении мощности 200Вт, обладают по показателям уровня метаболизма и жизнеспособности, сравнимыми с показателями, полученными для образца сплава VT1-0.

3. Средние значения абсолютной и относительной масс эмбрионов на 12-е и 18-е сутки инкубации, в присутствии имплантатов с модифицированными покрытиями, не претерпели статистически значимых отличий между экспериментальными группами.

4. Дентальные имплантаты из сплава марки VT6 с модифицированными покрытиями, полученные методом магнетронного распыления, не уступают по уровню остеоинтеграции имплантатам из сплава марки VT1-0, как в норме так и при моделировании остеопороза.

Внедрение в практику. Результаты исследования внедрены и применяются в учебном процессе ООО «Учебно–методический центр ДНМО» г. Ставрополя.

Степень достоверности. С позиции доказательной медицины, значимость полученных результатов определяется достоверностью и репрезентативностью материалов исследований, основанных на оптимальном количестве экспериментов *in-vitro* и *in vivo*. Статистический анализ проводили с использованием современных методик, используемых в статистической науке.

Апробация работы проведена на расширенном заседании кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» г. Москва 30 сентября 2021 года. Материалы работы доложены на Международной научной конференции студентов и молодых учёных на английском языке «Актуальные вопросы медицины» (Ставрополь, 2018); Всероссийском молодёжном форуме с международным участием «Неделя науки» (Ставрополь, 2017, 2019, 2020); конференции «Биотехнология: взгляд в будущее» (Ставрополь 2017); Всероссийская конференция "Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей" (Рязань 2018); 54-я Всероссийская стоматологическая научно-практическая конференция «Современные методы диагностики, лечения и профилактики стоматологических заболеваний» в рамках XVIII форума «СТОМАТОЛОГИЯ СТАВРОПОЛЬЯ» (Ставрополь, 2018).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 15 научных работ, из них: 6 в изданиях из перечня ВАК РФ, 2 в журналах, индексируемых в международных базах данных (WOS, Scopus).

Личный вклад автора. Диссертантом определены основные идеи и дизайн исследования, проведен анализ современной литературы касаемых покрытий дентальных имплантатов. Разработаны методологические и методические основы исследования, лично выполнен анализ первичной документации. Автором проведено хирургическое вмешательство по установке дентальных имплантатов экспериментальным животным. Диссертантом самостоятельно осуществлен анализ и интерпретация биохимических и инструментальных данных. Проведено участие в выполнении забора материала для микротомографического исследования; разработана и запатентована формула изобретения нового покрытия для дентальных имплантатов. Выполнена статистическая обработка данных. Сформулированы выводы и практические рекомендации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена в соответствии с требованиями ГОСТ Р7.0.11-2011 на 102 страницах машинописного текста. Рукопись диссертации состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована 45 рисунками, 18 таблицами. Библиографический список включает 152 источник, из них 99 кириллицей и 53 латиницей.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

В данном исследовании для выращивания модифицированных покрытий применялся метод магнетронного распыления, широко используемый для нанесения пленок различных материалов: металлов, полупроводников и диэлектриков. Магнетронное распыление проводилось на установке NSC-3500 компании NANO-MASTER. Inc. Модифицирующие покрытия выращивались из высокочистого титана (99,99%) на поверхности заготовок изготовленных из сплава марки ВТ6.

Для исследования структуры модифицированных покрытий в работе использовался метод растровой электронной микроскопии. Растровая электронная микроскопия проводилась на сканирующем электронном микроскопе Tescan MIRA3LMH (Рисунок 3), с системой определения энергодисперсионной спектроскопии, расположенном в научно-лабораторном комплексе чистых зон СКФУ.

Для исследования микротвёрдости, нанотвёрдости и модуля Юнга покрытий использовался наноиндентометр NanoTest 600 Platform 3, установленный в Ресурсном центре коллективного пользования НОЦ «Материалы» ДГТУ.

Биосовместимость и токсичность покрытий исследовались на клеточных культурах. Оценку жизнеспособности и уровня АТФ проводили через 24 ч и 48 ч культивирования в присутствии исследуемого образца. Проводился люминесцентный анализ АТФ с использованием ATPlite 1 step (PerkinElmer) при помощи Cytation 1 (BioTek). Подсчет клеток и уровня их жизнеспособности проводился при помощи автоматического счетчика клеток Louna.

Исследование эмбриотоксичности на модели развивающегося куриного эмбриона проводили согласно методике Ercan Durmus et al. (2004) в некоторой ее модификации.

Также был проведен эксперимент по установке имплантатов овцам и дальнейшее исследование уровня остеointegrации при помощи метода микротомографии. Доклиническое исследование дентальных имплантатов проводили в виварии опытной станции Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. В эксперименте *in vivo* использовали 8 половозрелых овец Северо-Кавказской мясошерстной породы в возрасте от 1.5 до 2 лет с полностью сформированными корнями зубов. Масса тела животных составляла 35-40 кг. Через наружные разрезы в поднижнечелюстных областях длиной 6 - 7 см осуществляли доступ к поверхности правой стороны тела нижней челюсти. Проводилась установка имплантатов по отсроченному протоколу 8 животным.

Овец выводили из эксперимента через 90 суток. Забор материала для морфологических методов исследования проводили с помощью остеотомов, дисковой пилы, костных кусачек. Всего было получено 8 фрагментов нижней челюсти. Затем проводили микротомографическое исследование полученных фрагментов с установленными имплантатами.

Микротомографическое исследование реакций костной ткани на модифицированные покрытия дентальных имплантатов выполнялась на базе межкафедальной научно-образовательной лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии Института живых систем СКФУ.

Параметры сканирования в программе Skyscan 1176 control program (10.0.0.0, Bruker-microCT, Бельгия): X-ray voltage 90 kV, X-ray current 270 μ A, filter Cu 0,1 mm, image pixel size 17,74 μ m, tomographic rotation 360°, rotation step 0,2, frame averaging 4. Сканированные объекты реконструировались в программе Nrecon (1.7.4.2, Bruker-microCT, Бельгия) со следующими основными параметрами реконструкции: smoothing 2, ring reduction 10, beam hardening 41. Ориентация в пространстве (x, y, z) и выделение отдельных областей реконструированных материалов проводилась в программе DataViewer (1.5.6.2, Bruker-microCT, Бельгия). Визуализация, анализ данных и получение 3D моделей проводилось в программах CT-analyser (1.18.4.0, Bruker-microCT, Бельгия), CTvox (3.3.0r1403, Bruker-microCT, Бельгия) и CTvol (2.3.2.0, Bruker-microCT, Бельгия).

Анализ данных осуществлялся как с использованием пакета прикладных программ для обработки статистической информации Statistica 12.0, так и стандартных средств электронных таблиц Microsoft Excel.

Результаты исследования

На Рисунках 1, 2 представлены микрофотографии РЭМ поверхности изделий из сплавов ВТ1-0 и ВТ6 без модифицирующих покрытий

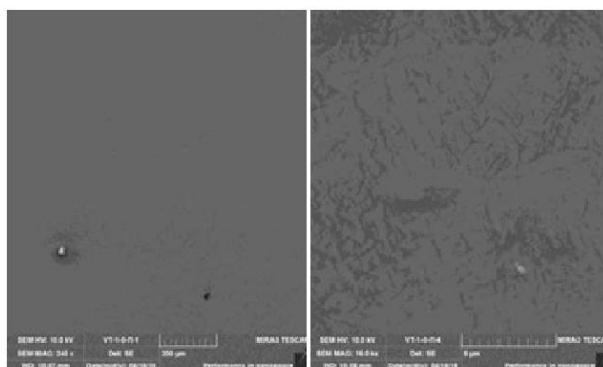


Рисунок 1 – РЭМ – микрофотографии образцов изделий из сплава ВТ1-0

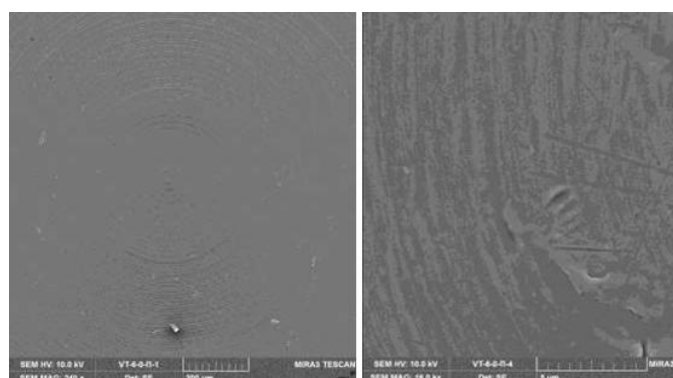


Рисунок 2 – РЭМ - микрофотографии образцов изделий из сплава ВТ-6

Поверхность изделия из сплава марки ВТ1-0 визуально гладкая при увеличении. При увеличении $\times 16000$ видны неровности поверхности. На поверхности изделия из сплава ВТ6 виден рельеф поверхности в виде концентрических окружностей. При увеличении $\times 16000$ видны неровности поверхности.

На Рисунке 3 представлена микрофотография РЭМ образцов изделия из сплава ВТ6 с модифицированным покрытием Ti, нанесенным методом магнетронного распыления при мощности 200Вт.

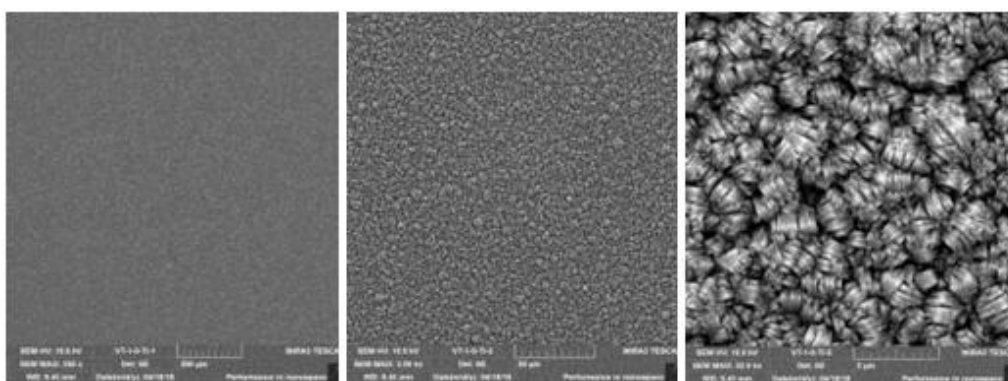


Рисунок 3 - ВТ6 с модифицированным покрытием Ti 200W

Данное покрытие равномерно покрывает все изделие. При увеличении $\times 3000$ покрытие является текстурированным. При увеличении $\times 32000$ пленка титана образована частицами, имеющими пластинчатую морфологию. Частицы собраны в образования из нескольких пластин. Размер агломератов варьируется от ~ 80 до 600 нм. Агломераты расположены на поверхности изделия неупорядоченно. Покрытие Ti может быть образовано наночастицами пластинчатой либо сферической формы, имеющими кристаллическую структуру.

Представлена микрофотография РЭМ образцов изделия из сплава ВТ6 с модифицированным покрытием Ti, нанесенным методом магнетронного распыления при мощности 300Вт (Рисунок 4).

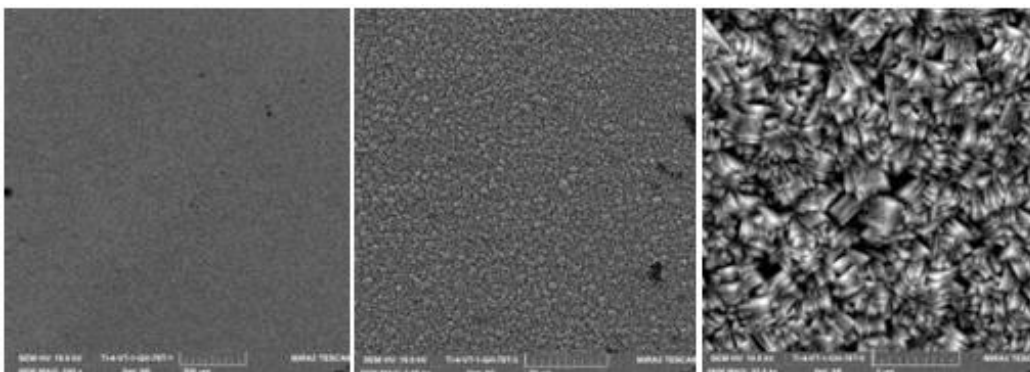


Рисунок 4 - ВТ6 с модифицированным покрытием Ti 300W

Поверхность изделий равномерно покрыта пленкой. Присутствуют единичные дефекты, представляющие собой непокрытую поверхность изделия (черные точки). При увеличении x3000 покрытие является текстурированным. При увеличении x32000 покрытие исследованного образца образовано нанокристаллическими частицами, имеющими форму пластин. Частицы собраны в агломераты, имеющие форму треугольной призмы. Агломераты имеют размеры от ~ 90 до 900 нм. Агрегаты расположены на поверхности изделия неупорядоченно.

Так же при растровой электронной микроскопии, был исследован элементный состав покрытий сплава ВТ6. На рисунке 5 и в таблице 1 представлен результат элементного анализа ВТ6 без покрытия.

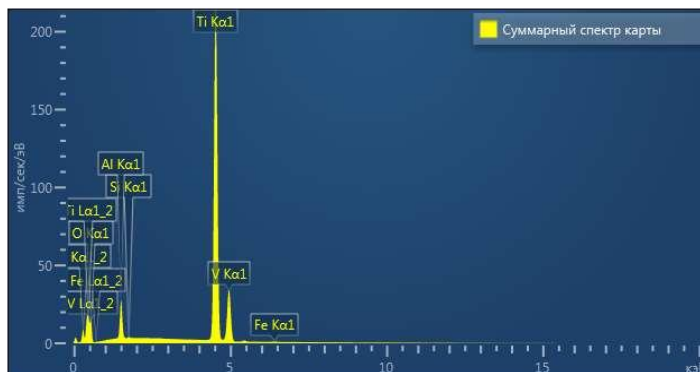


Рисунок 5 - Результаты EDX-спектроскопии образца из сплава ВТ6 без покрытия

Таблица 1 - элементный анализ образца из сплава ВТ-6 без покрытия

Элемент	Тип линии	Вес. %	Сигма Вес. %	Атом. %
O	К серия	21.56	0.10	44.17
Al	К серия	4.21	0.01	5.11
Si	К серия	0.12	0.00	0.14
Ti	К серия	70.92	0.09	48.53
V	К серия	3.04	0.02	1.96
Fe	К серия	0.16	0.01	0.09
Сумма:		100.00		100.00

На рисунке 6 и в таблице 2 результат элементного анализа ВТ6 с модифицированным покрытием.

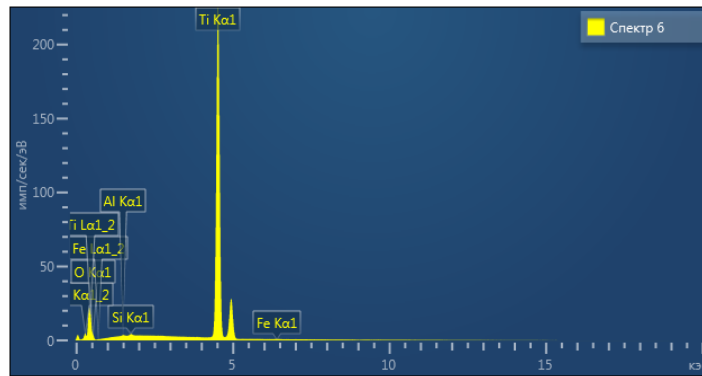


Рисунок 6 - Результаты EDX-спектроскопии образца из сплава ВТ6 с модифицированным покрытием

Таблица 2 - элементный анализ ВТ6 с модифицированным покрытием

Элемент	Тип линии	Вес. %	Сигма Вес. %	Атом. %
C	К серия	3.38	0.06	10.71
O	К серия	7.83	0.15	18.61
Al	К серия	0.13	0.01	0.19
Si	К серия	0.18	0.01	0.24
Ti	К серия	88.36	0.16	70.17
Fe	К серия	0.12	0.02	0.08
Сумма:		100.00		100.00

На основании полученных результатов спектрального анализа установлено, что имеют место статистически значимые различия ($p < 0,05$) изделия из сплава ВТ6 с модифицирующим покрытием Ti, нанесенным методом магнетронного распыления, имеют на своей поверхности Al (0,19 ат.%), по сравнению с контролем – сплав ВТ6 без покрытия (5,11 ат.%), что доказывает высокое изолирующее свойство покрытия.

Результаты нанoidентификации образцов ВТ6 с модифицированным покрытием, полученным при мощности магнетронного распыления 200Вт и 300Вт. Оптическая и электронная микроскопия показывает, что образец ВТ6 с модифицированным покрытием, полученным при мощности магнетронного распыления 200Вт имеет развитую поверхностную микроструктуру. По краям образца, где ранее фиксаторы удерживали прототип в магнетроне, покрытие отсутствовало. Измеренная на одном из участков на краю образца толщина покрытия составила 2,9 мкм (Рисунок 7).

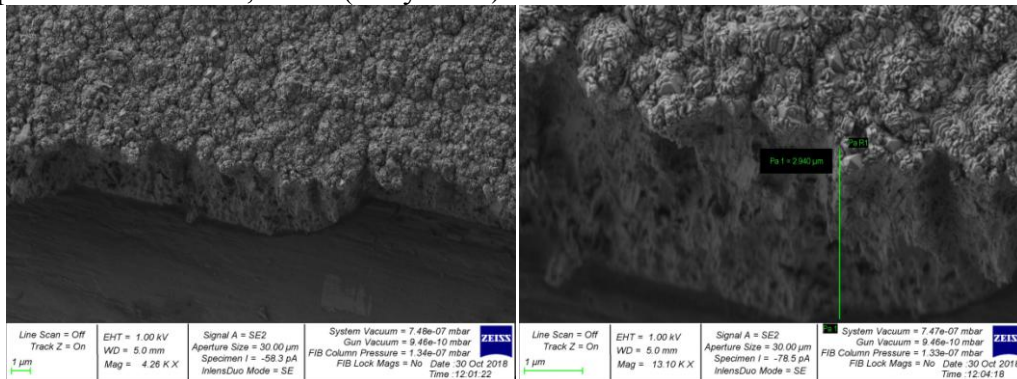


Рисунок 7 — модифицированное покрытие над поверхностью образца из сплава ВТ6

Было проделано несколько серий индентирований, параметры приведены в таблице 3 и на рисунках 8-10.

Таблица 3 — Параметры серий экспериментов на образец ВТ6 с модифицированным покрытием

№ серии	Испытательная нагрузка, мН	Скорость нагружения, мН/с	Количество
1	25 – 200	1	4
2	250 – 500	10	6
3	2 – 10	0,1	32
4	5	0,2	32
5	5	0,2	32

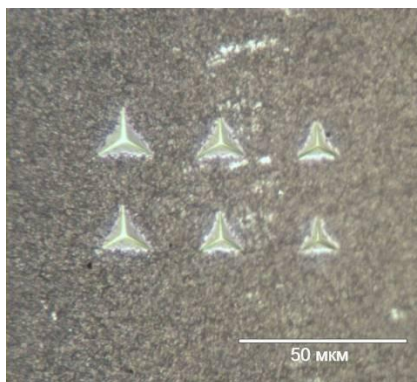


Рисунок 8 — Отпечатки серии Ti200W(250–500 мН) (вид в оптический микроскоп)

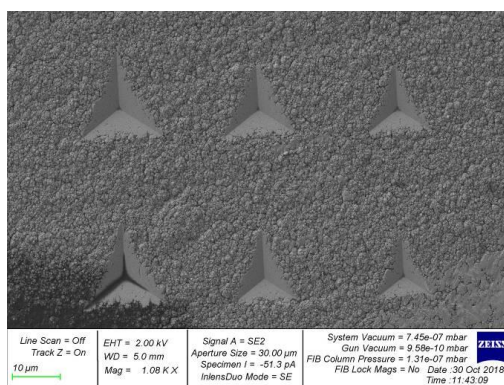


Рисунок 9 — Отпечатки серии Ti200W (при нагрузке 250–500 мН)

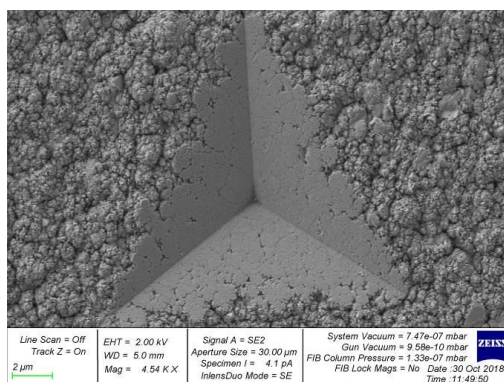


Рисунок 10 — Отпечаток серии Ti200W

Исследование отпечатков на электронном микроскопе показывает, что при нагрузке 400 мН боковые поверхности отпечатка сглаженные, трещины в углах и вокруг отпечатка отсутствуют, что говорит о развитой пластической деформации (Рисунок 10).

Для того, чтобы изучить механические свойства покрытия, было решено провести серию 32 индентирований при одинаковой нагрузке 5 мН в каждом эксперименте. Серия Ti200W 1-5 проводилась ночью для уменьшения влияния вибрационного шума на результаты измерений.

По результатам обработки экспериментальных результатов получены следующие значения механических характеристик покрытия Ti200W-1: твердость — $12,87 \pm 3,00$ ГПа, приведенный модуль упругости — $241,04 \pm 43,82$ ГПа (Таблица 4).

Таблица 4 - Результаты серий экспериментов на образце Ti200W

№ серии	Нагрузка F_{\max} , мН	Глубина внедрения h_{\max} , нм	Приведенный модуль Юнга индентирования E_r , ГПа	Твердость индентирования H_{IT} , ГПа
1	25 – 200	378 – 1533	$154,13 \pm 19,13$	$6,62 \pm 1,65$
2	250 – 500	1473 – 2368	$149,74 \pm 8,88$	$5,75 \pm 0,96$
3	2 – 10	40 – 233	$198,64 \pm 71,32$	$9,01 \pm 4,11$
4	5	64 – 132	$232,65 \pm 78,98$	$12,94 \pm 5,05$
5	5	67 – 181	$241,04 \pm 43,82$	$12,87 \pm 3,00$

Высокие значения среднеквадратического отклонения являются следствием неоднородности свойств на поверхности образца и высоким уровнем шероховатости, препятствующим корректному определению площади области контакта индентора и образца. Стоит отметить, что значения приведенного модуля Юнга индентирования E_r и твердости индентирования H_{IT} в сериях 4,5 в среднем в 1,5 раза больше, чем в сериях 1,2, что говорит о наличии упрочненного слоя на поверхности покрытия.

Оптическая и электронная микроскопия показывает, что образец с модифицированным покрытием, полученным при мощности магнетронного распыления 300Вт, имеет развитую микроструктуру покрытия, отличающейся от микроструктуры покрытия Ti200W (Рисунок 11).

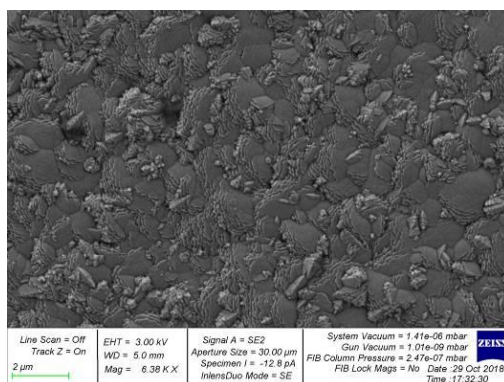


Рисунок 11— Электронная микрофотография поверхности образца Ti300W, увеличение 6000х

Толщина покрытия, измеренная на одном из участков на краю образца, составила 5,8 мкм (Рисунок 12).

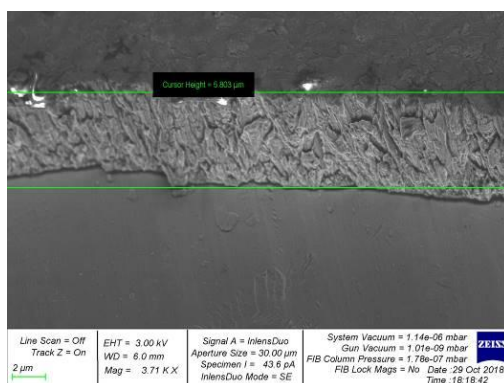


Рисунок 12 — модифицирующее покрытие Ti300W над поверхностью образца VT6

На образце было проведено 5 серий экспериментов (Таблица 5). Расположение серий индентирований на поверхности образца приведено на Рисунке 13.

Таблица 5 — Параметры серий экспериментов на образце Ti300W

№ серии	Нагрузка F_{\max} , мН	Количество
1	250 – 500	12
2	25 – 200	16
3	5	32
4	5	32
5	5	32

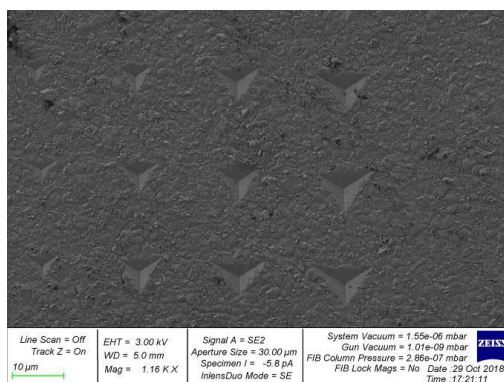


Рисунок 13 — Изображение отпечатков серии индентирований Ti300W при нагрузках от 25 до 200 мН (вид с электронного микроскопа)

Образец ВТ6 с модифицированным покрытием, полученным при мощности 300Вт имеет ярко выраженную пластинчатую структуру. По сравнению с покрытием Ti200W, покрытие Ti300W не имеет сложной иерархии (Рисунок 14). Доминирующий механизм деформирования при нагрузках 25-200 мН также пластический.

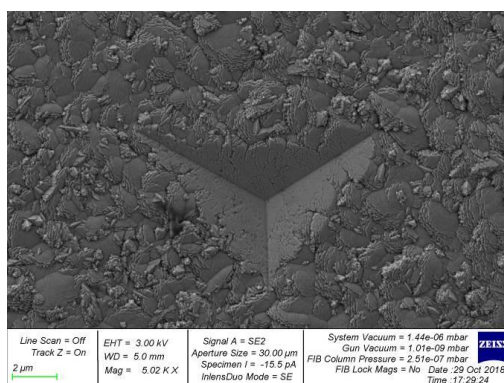


Рисунок 14 — Изображение отпечатка индентирования образца Ti300W (вид с электронного микроскопа)

Для изучения деформационного отклика покрытия было проделано несколько серий из 32 индентирований при нагрузке 5 мН (Таблица 6).

Таблица 6 — Результаты серий экспериментов 1–5 на образце Ti300W

№ серии	Нагрузка F_{max} , мН	Глубина внедрения h_{max} , нм	Приведенный модуль Юнга индентирования E_T , ГПа	Твердость индентирования H_{IT} , ГПа
1	250 – 500	1445 – 2470	113,39±11,41	3,30±0,54
2	25 – 200	357 – 1362	118,39±14,70	4,17±0,99
3	5	49 – 136	223,98±55,40	11,02±3,93
4	5	52 – 99	250,43±47,30	13,17±4,23
5	5	75 – 353	66,77±43,36	4,71±2,94

Высокие значения среднеквадратического отклонения являются следствием неоднородности свойств на поверхности образца и высоким уровнем шероховатости, препятствующим корректному определению площади области контакта индентора и образца. Отличие результатов серий 3,4,5 свидетельствует о высокой неоднородности свойств по поверхности образца. Кроме того, если принять результаты серий 1,2 за свойства подложки, то высокие значения приведенного модуля Юнга индентирования E_T , отличающиеся от свойств в сериях 1,2, говорят о наличии упрочненного слоя на поверхности покрытия.

Результаты исследования механических характеристик по всем образцам (Таблица 6).

Таблица 6 — Сводные результаты исследований по всем образцам

Образец	Нагрузка F_{\max} , мН	Приведенный модуль Юнга инден-тирования E_r , ГПа	Твердость инден-тирования H_{IT} , ГПа
Ti200W	250 – 500	149,74±8,88	5,75±0,96
Ti200W	5	241,04±43,82	12,87±3,00
Ti300W	250 – 500	113,39±11,41	3,30±0,54
Ti300W	5	223,98±55,40	11,02±3,93

Значения на поверхности для покрытий Ti–200W, Ti–300W модуля Юнга 220 ГПа не соответствуют титану β фазы. Для определения причины повышения модуля Юнга было произведено исследование химического элементного состава покрытий Ti200W1 (Рисунок 15, Таблица 7) и Ti300W (Рисунок 16, Таблица 8) по глубине. Анализ показывает, что содержание кислорода на поверхности значительно выше (19,4% у Ti200W, 18,5% у Ti300W), чем на глубине (4% у Ti200W, 5% у Ti300W), а в подложке кислород не обнаружен. Таким образом, локальное повышение модуля Юнга на поверхности образца можно объяснить образованием тонкого (<100нм) слоя оксида титана, который сложно обнаружить с помощью методов рентгеновской дифракции.

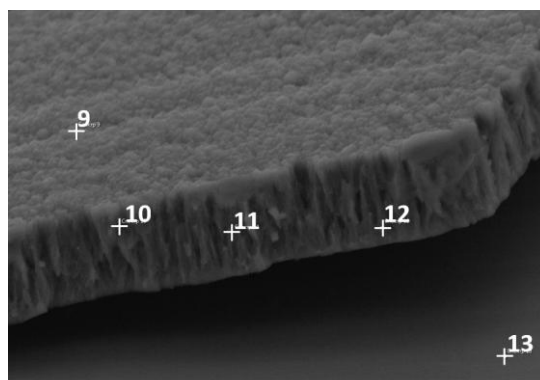


Рисунок 15 — Расположение точек измерения спектра рентгеновского излучения на образце Ti200W

Таблица 7 — Содержание химических элементов в точке (без учета С) на основании ЭДС анализа

Название спектра	O	Al	Si	Ti	V	Fe	Сумма (weight %)
Спектр 9	7,45			92,55			100
Спектр 10	1,4	0,27		98,33			100
Спектр 11	1,19	0,24		98,38		0,18	100
Спектр 12	1,38	0,3	0,08	98,1		0,14	100
Спектр 13		5,1		90,86	3,81	0,22	100

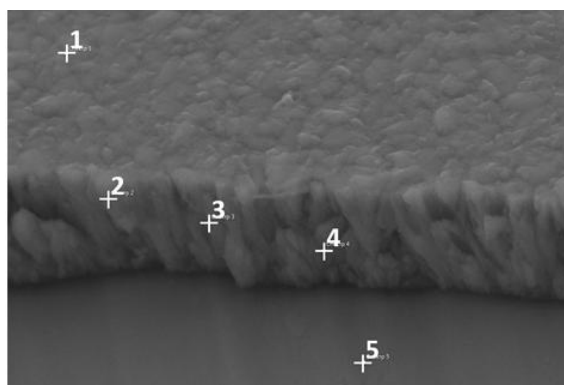


Рисунок 16 — Расположение точек измерения спектра рентгеновского излучения на образце Ti300W

Таблица 8 — Содержание химических элементов в точке (без учета С) на основании ЭДС анализа

Название спектра	O	Na	Al	Si	S	K	Ti	V	Fe	Сумма (weight %)
Спектр 1	7,07			0,15			92,63		0,15	100
Спектр 2	5,59	0,29	1,38	0,19	0,09	0,09	91,27	0,94	0,16	100
Спектр 3	5,1		1,1	0,1			93,69			100
Спектр 4	1,82		1,02	0,08			96,89		0,19	100
Спектр 5			4,85				92,06	2,91	0,18	100

Результаты оценки уровня АТФ через 24 и 48 часов приведены в таблице 9 и 10.

Таблица 9 - результаты люминесцентного анализа уровня аденозинтрифосфата в культивируемых клетках через 1 сутки после внесения образцов исследуемых материалов (в относительных единицах люминесценции)

Образцы	Относительные единицы люминесценции
BT1-0	13573
BT6	9517
BT6 магнетрон W 200 Вт	7352
BT6 магнетрон W300 Вт	6401

Таблица 10 - Результаты люминесцентного анализа уровня аденозинтрифосфата в культивируемых клетках через двое суток после внесения образцов исследуемых материалов (в относительных единицах люминесценции)

Образцы	Относительные единицы люминесценции
BT1-0	26648
BT6	20915
BT6 магнетрон W 200	25482
BT6 магнетрон W300	16291

При исследовании биосовместимости на клеточных культурах (фибробластах) модифицированных покрытий дентальных имплантатов выявлены по истечении 48 часов статистически значимые различия ($p < 0,05$) результатов люминесцентного анализа уровня аденозинтрифосфата в культивируемых клетках. Наибольший уровень отмечается в присутствии образца материала BT1-0, в то время как самые высокие темпы динамических изменений – в присутствии образца марки BT6, с модифицированным покрытием полученным при распылении магнетрона мощностью 200 Вт (+4567).

При анализе жизнеспособности клеток наибольший ее уровень также показан у клеток, культивируемых в присутствии образца материала BT1-0, вторым был результат материала BT-6, модифицированным при распылении магнетрона мощностью 300 Вт (таблица 11, Рисунок 17).

Таблица 11 - результаты анализа жизнеспособности культивируемых клеток через 24 часа и 48 часов после внесения образцов исследуемых материалов

Образцы	через 24 часа	через 48 часов
BT1-0	83%	82%
BT-6	65%	62%

BT-6 магнетрон W 200 Вт	51%	60%
BT-6 магнетрон W 300 Вт	54%	63%

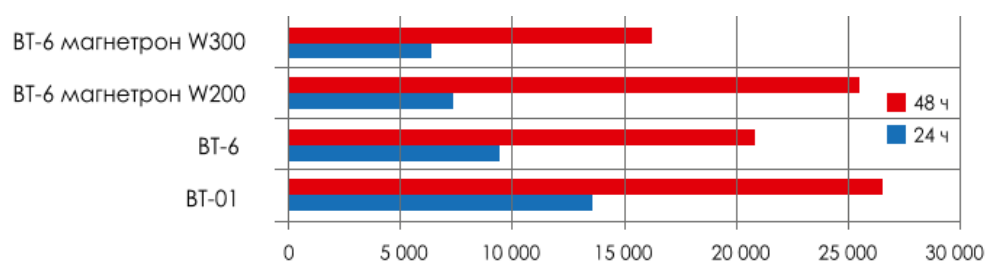


Рисунок 17 - динамика уровня АТФ в культивируемых клетках в течение 48 ч после внесения образцов исследуемых материалов (в относительных единицах люминесценции).

Результаты исследования и статистические данные биосовместимости на куриных эмбрионах (Таблица 12).

Таблица 12 – Проявление основных характеристик эмбриотоксичности в исследуемых группах.

Группа (n=10)	Количество неоплодотворенных яиц	Количество мертвых эмбрионов	Относительная масса эмбрионов на 12-е сутки инкубации, %	Абсолютная масса эмбрионов на 12-е сутки инкубации, г	Средняя масса яиц, г
1	1	2	7,20±1,08	3,89±0,17	53,88±1,31
2	1	2	6,91±1,43	3,98 ±0,57	56,98±1,48
3	-	-	6,98±0,96	3,76±0,34	54,31±1,36
4	-	1	6,93±0,99	3,88±0,36	55,86±1,39
5	1	-	7,28±0,87	3,94±0,18	53,97±1,34

Средние значения абсолютной и относительной масс эмбрионов на 12-е сутки инкубации не претерпели статистически значимых отличий между экспериментальными группами. На 18-е сутки инкубации названные параметры также не имели достоверных отличий.

Извлеченные на 18-е сутки эмбрионы во всех экспериментальных группах соответствовали этапу развития НН-44 по шкале Hamburger–Hamilton. Однако следует отметить, что в группе №2 отмечался случай задержки роста эмбриона (Рисунок 18).

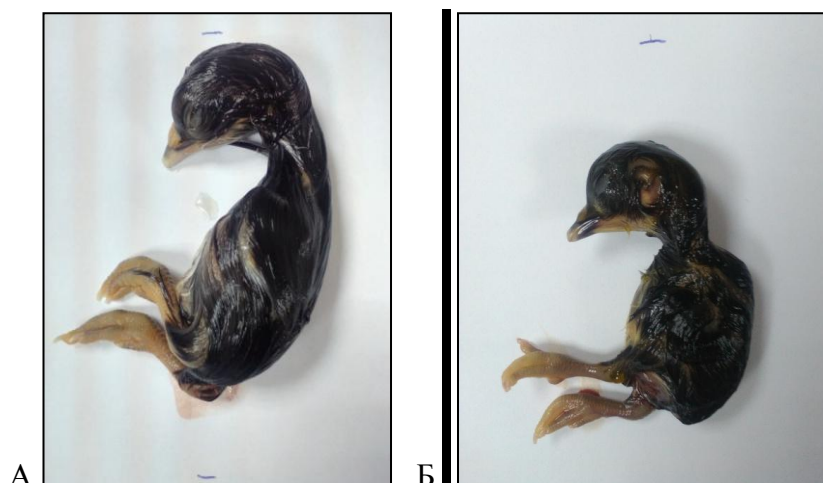


Рисунок 18 — Куриный эмбрион на 18-е сутки развития

А – нормальное развитие (группа № 5); Б – задержка развития (группа №2)

Группы №1 и №2 характеризовались некоторой тенденцией к увеличению смертности эмбрионов. В отличие от других групп, в группах 1 и 2 в соответствии со шкалой Hamburger–Hamilton встречались замершие эмбрионы, соответствующие уровню развития НН 32-37 (Таблице 13, Рисунок 19).

Таблица 13 – Характеристика смертности эмбрионов в соответствии со сроком инкубации.

Группа (n=10)	Количество мертвых эмбрионов	Этапы развития по шкале Hamburger–Hamilton							
		НН 1-6	НН 7-13	НН 14-19	НН 20-25	НН 26-31	НН 32-37	НН 38-43	НН 44-46
1	2	1	-	-	-	-	1	-	-
2	2	1	-	-	-	-	1	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1	1	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Рисунок 19 — Случаи замерших куриных эмбрионов в группах №1 (А) и группы №2 (Б) на этапах развития НН 32-37

Представленные результаты показали, что данные экспериментальные образцы нетоксичны для куриных эмбрионов.

Микротомографическое исследование.

В исследовании уровня остеоинтеграции проанализирован костно-имплантатный контакт в процентах и объем кости по отношению к общему объему с использованием методики "лучших трех последовательных потоков". Были проанализированы две секции на имплантат. Изображения гистологических разрезов были оцифрованы при двукратном и четырехкратном увеличении, а костно-имплантатный контакт был количественно определен гистоморфометрически с использованием программного обеспечения NIH Image Analysis, ImageJ (Таблица 14, 15).

Таблица 14 - Уровень имплантации исследуемых изделий (костно-имплантатный контакт - ВИС)

Характеристика имплантата	ВИС, %											
	По всей поверхности имплантата				Со стороны корональной части имплантата (микрорезьба)				Со стороны апикальной части имплантата			
	Normal 05551	Normal 05495	Σ Normal	Modeling osteoporosis 07911	Normal 05551	Normal 05551	Σ Normal	Modeling osteoporosis 07911	Normal 05551	Normal 05495	Σ Normal	Modeling osteoporosis 07911
1.ВТ1-0 (Grade 4)	51,9	53,1	52,5	49,2	67,1	65,4	66,3	79,6	50,6	50,0	50,3	38,6
2.ВТ6 с модифицированным покрытием	46,7	55,1	50,9	40,0	71,5	24,4	48,0	63,6	38,6	68,4	53,5	31,4
3.ВТ6 (Grade 5)	17,5	-	17,5	34,5	6,9	-	6,9	10,0	23,7	-	23,7	46,3

Таблица 15 - 3D анализ костной ткани вокруг имплантатов (≈ 700 мкм от пограничного слоя имплантата; объем кости по отношению к общему объему - BV/TV)

Характеристика имплантата	BV/TV, %											
	По всей поверхности имплантата				Со стороны корональной части имплантата (микрорезьба)				Со стороны апикальной части имплантата			
	Normal 05551	Normal 05495	Σ Normal	Modeling osteoporosis 07911	Normal 05551	Normal 05551	Σ Normal	Modeling osteoporosis 07911	Normal 05551	Normal 05495	Σ Normal	Modeling osteoporosis 07911
1. BT1-0 (Grade 4)	43,9	38,8	41,4	30,4	78,5	64,2	71,4	73,9	29,8	28,6	29,2	12,3
2. BT6 с модифицированным покрытием	49,0	39,9	44,5	39,5	81,3	15,8	48,6	80,6	35,5	49,8	42,7	22,8
3. BT6 (Grade 5)	14,6	-	14,6	18,7	2,6	-	2,6	3,0	19,6	-	19,6	23,7

3D модель, визуализация вновь образованной костной ткани (≈ 700 мкм от пограничного слоя по всей области имплантата) в программе CTVol (Рисунок 20 – 22).

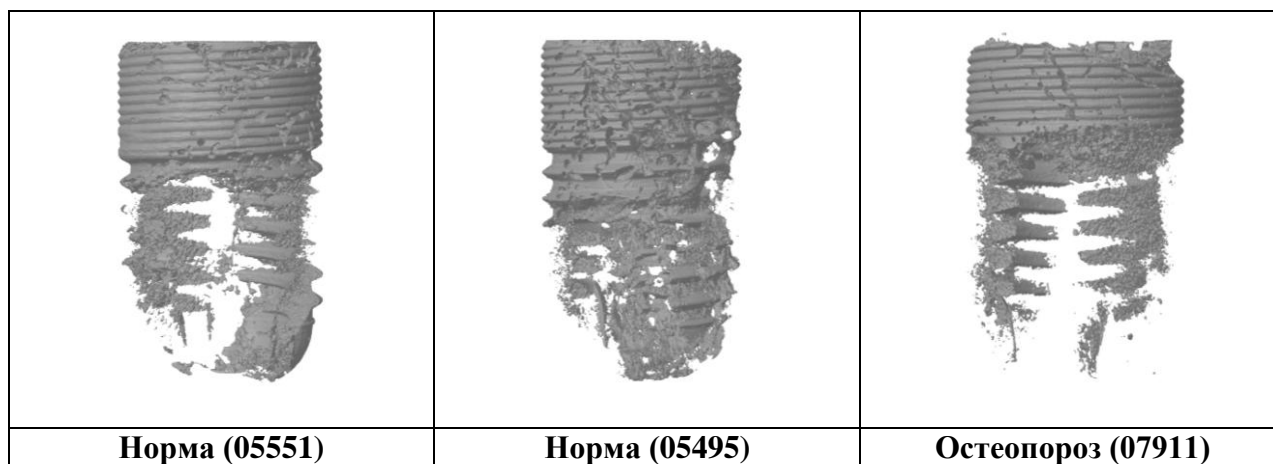


Рисунок 20 - Образцы из сплава BT1-0 (Grade 4)

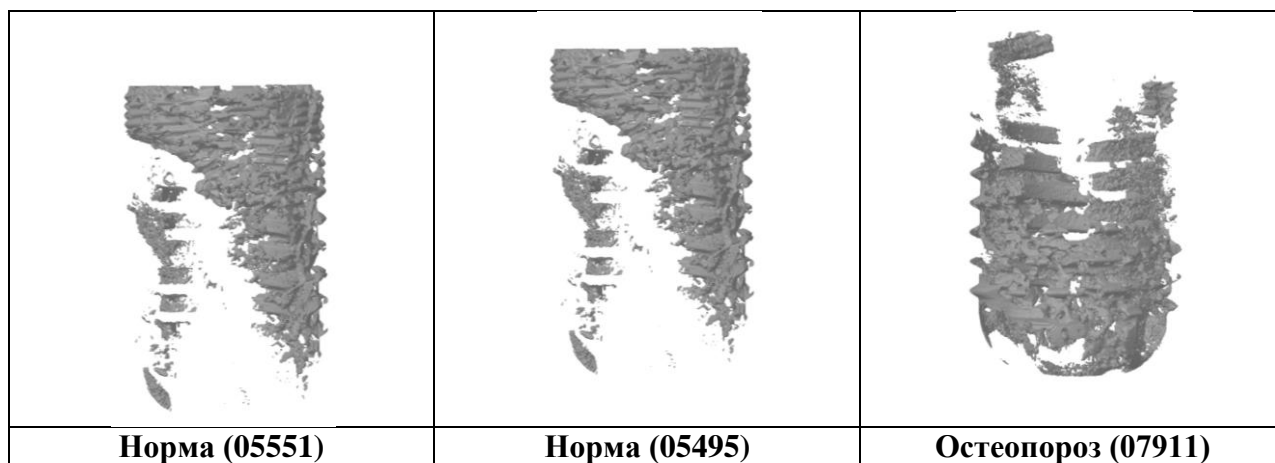


Рисунок 21 – Образцы из сплава ВТ6 без покрытия



Рисунок 22 – Образцы из сплава ВТ6 с модифицированным покрытием

В результате обработки данных в ходе исследования тканевого ответа со стороны корональной части на установку имплантатов из сплава ВТ1-0, ВТ6 и ВТ6 с модифицированным покрытием выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами. Так, показатель ВИС % у здорового животного составил 71,5%, у животного с моделью остеопроза – 63,6%, что указывает на высокий уровень остеоинтеграции экспериментальной модели модифицированного покрытия, полученного методом магнетронного распыления при мощности 200 Вт.

Учитывая вышеизложенное, выполненные экспериментальные исследования сформулированы нижеизложенные выводы и практические рекомендации.

ВЫВОДЫ

1. Модифицированные покрытия, полученные методом магнетронного распыления чистого Ti, обладают защитным свойством, блокируют Al и V в составе сплава ВТ6. Покрытия имеют нанокристаллическую структуру. Размеры структурных единиц титанового покрытия составляют менее 100 нм. Покрытия полностью повторяют рельеф поверхности изделий. Толщина покрытий от 2,9 до 5,8 мкм.

2. Высокий уровень метаболизма и жизнеспособности (+4567), отмечен у клеточных структур культивируемых в контакте со сплавом ВТ6 с модифицированным покрытием, по-

лученным при магнетронном распылении мощностью 200 Вт, сравнимыми с показателями сплава ВТ1-0.

3. В группе образца сплава ВТ1-0 отмечался случай задержки роста эмбриона. Группы сплавов ВТ1-0 и ВТ6 характеризовались некоторой тенденцией к увеличению смертности эмбрионов. В отличие от групп образцов сплава ВТ6, с модифицированными покрытиями 200Вт и 300Вт, в группах сплавов ВТ1-0 и ВТ6 в соответствии со шкалой HamburgerHamilton встречались замершие эмбрионы, соответствующие уровню развития НН 32–37.

4. Дентальные имплантаты из сплава марки ВТ6 с новым биосовместимым покрытием, полученным методом магнетронного распыления при мощности 200 Вт, не уступают по уровню остеоинтеграции имплантатам из сплава ВТ1-0, как у здоровых животных, так и у животных с моделированным остеопорозом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложенный способ получения модифицированных покрытий для поверхности внутрикостных дентальных имплантатов функционально обоснован и может быть использован при изготовлении дентальных имплантатов.

2. Полученные данные презентуют, что исследуемое покрытие обладает барьерным свойством и применимо в лечении больных с сопутствующей патологией.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зеленский В.И. Влияние способа обработки поверхности имплантационных материалов на уровень АТФ МСК пульпы зуба человека / Долгалев А.А, Бобрышев Д.В., Диденко Н.Н., Зеленский В.И. // Гены и клетки. Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине.-2019.-Том XIV, Приложение.- С.78-79.
2. Зеленский В.И. Влияние различных режимов магнетронного распыления на структуру и химический состав поверхностей имплантируемых титановых сплавов/ Зеленский В.И., Геворкян В.А., Тарала В.А., Зеленский В.А., Бобрышев Д.В., Коновалов Е.А., Амхадова М.А., Грызунов С.А., Долгалев А.А. // Современные технологии в медицине. 2019.-Том 11.-№4.- С.120-125 DOI: 10.17691/stm2019.11.4.14.
3. Зеленский В.И. Исследование покрытий имплантационных материалов на биосовместимость / Долгалев А. А., Диденко Н.Н., Дмитриенко А.В., Ерсенев Ю.Р., Курбанова У.Р. // Медицинский алфавит. 2019.-Том 2.- №11(386). - С.29-32. DOI: 10.33667/2078–5631–2019–2–11(386)–29–32.
4. Зеленский В.И. Титановые имплантаты с наноструктурированной поверхностью как материал-носитель для трансплантации стволовых клеток производных нервного гребня (NCSC) на модели стандартизированного костного дефекта / Долгалев А.А., Зеленский В.И., Ржепаковский И.В., Диденко Н.Н. // Гены и клетки. Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине.-2019.-Том XIV, Приложение.- С.79.
5. Зеленский В.И. Исследование наноструктурированных поверхностей имплантатов сплава ВТ-6 in-vivo / Зеленский В.И., Долгалев А.А., Елдашев Д.С.-А., Ешкулов У.Э. // Медицинский алфавит. 2020.- №12 (426). - С.12-14. DOI: 10.33667/2078–5631–2020–12–12–14.

6. Зеленский В.И. Эффективность применения никотинамидадениннуклеотид гидрида в комплексном лечении пациентов с периимплантитом / Амхадова М.А., Амхадов И.С., Алескеров Э.Ш., Зеленский В.И., и др. // Российский стоматологический журнал. - 2020. - Т. 24. - №3. - С. 146-153. doi: **10.17816/1728-2802-2020-24-3-146-153**.
7. Зеленский В. И. Локализация эпюлиса в области имплантатов. Клинический случай / Зеленский В.И., Долгалев А.А., Юсупов Р.Д., Чагаров А.А., Юсупов Х.Р., Лежава Н.Л. // Медицинский алфавит. 2021.- №12 (464). - С.38-41. DOI: 10.33667/2078-5631-2021-12-38-41.
8. Зеленский В. И. Модифицированные методы межкортикальной остеотомии и расщепления альвеолярного гребня / Мураев А. А., Полевой В. В., Иванов С. Ю., Долгалев А. А., Мухаметшин Р. Ф., Гажва С. И., Бойко Е. М., Зеленский В. И. // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2021;16(2):176-180.
9. Зеленский В.И. Лечение осложнений, возникающих при операции удаления зуба/ Долгалев А.А., Зеленский В.И. // Актуальные аспекты стоматологии. Сборник научных работ том VI (под редакцией д.м.н., профессора В.А. Зеленского) - Ставрополь. Изд- во СтГМУ, 2017. С.46-52.
10. Зеленский В.И. Организация рентгенологического обследования пациентов с использованием конусно-лучевой компьютерной томографии / Долгалев А.А., Нечаева Н.К., Зеленский В.И., Бедрик Е.В., // Актуальные вопросы клинической стоматологии. Сборник научных работ (под редакцией д.м.н., профессора В.А. Зеленского) - Ставрополь. Изд- во СтГМУ, 2017. С.26-30.
11. Зеленский В.И. Применение цифровых технологий при планировании операций по костной аугментации в области верхней челюсти / Долгалев А.А., Зеленский В.А., Куценко А.П., Зеленский В.И., Бедрик Е.В. // Актуальные вопросы клинической стоматологии. Сборник научных работ (под редакцией д.м.н., профессора В.А. Зеленского) - Ставрополь. Изд- во СтГМУ, 2017. С.172-175.
12. Зеленский В. И. Исследование морфологии поверхности титановых покрытий, полученных способом магнетронного распыления, методом атомно-силовой микроскопии / Геворкян В.А., Мангасарян Н.Р., Долгалев А.А., Зеленский В.И., Мухорамов Ф.Ф., Бухалов Б.В. // Современные методы диагностики, лечения и профилактики стоматологических заболеваний. Сборник научных работ (под редакцией д.м.н., профессора В.А. Зеленского) - Ставрополь. Изд- во СтГМУ, 2018. С.260-262.
13. Зеленский В.И. Наноструктурированное покрытие поверхностей внутрикостных дентальных имплантатов / Долгалев А.А., Зеленский В.И., Мухорамов Ф.Ф. // Современные методы диагностики, лечения и профилактики стоматологических заболеваний. Сборник научных работ (под редакцией д.м.н., профессора В.А. Зеленского) - Ставрополь. Изд- во СтГМУ, 2018. -С. 269-271.
14. Зеленский В.И. Создание и изучение наноструктурированных поверхностей дентальных имплантатов/ Долгалев А.А., Зеленский В.И., Дмитриенко Н.В.// Материалы Всероссийской научной конференции Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей. – Рязань, 2018.- С.48-50.
15. Патент на изобретение: Способ изготовления имплантатов различной конфигурации из сплава марки ВТ-6 с алмазоподобным диэлектрическим защитным нанопокрытием. 04.02.2020г./ Зеленский В.И., Долгалев А.А., Долгалева А.А., Зеленский В.А.

**Зеленский Виктор Иванович
Россия**

**Разработка наноструктурированных покрытий для поверхностей
внутрикостных дентальных имплантатов. Экспериментальное исследование.**

В данной исследовательской работе проведен анализ модифицированных покрытий, полученных методом магнетронного распыления чистого титана, для дентальных имплантатов из сплава VT6.

Полученные результаты, подтвердили наличие у модифицированного покрытия защитных свойств. На клеточных культурах и модели развивающегося куриного эмбриона изучены биосовместимость и уровень токсичности модифицированного покрытия. В эксперименте на здоровых животных и животных с моделированным остеопорозом выявлено, что дентальные имплантаты из сплава VT6 с модифицированным покрытием по своим характеристикам не уступают изделиям из сплава VT1-0.

Разработанное покрытие может использоваться при изготовлении дентальных имплантатов.

**Zelenskii Viktor Ivanovich
Russia**

Development of nanostructured coatings of intraosseous dental implants. Pilot study.

In this research work, an analysis of modified coatings obtained by magnetron sputtering of pure titanium which was carried out for dental implants made of VT6 alloy.

The obtained results confirmed the protective properties of the modified coating. The biocompatibility and toxicity level of the modified coating was studied on cell cultures and a model of a developing chick embryo. During the experiment on healthy animals and animals with simulated osteoporosis, it was revealed that dental implants made of VT6 alloy with a modified coating are not inferior in their characteristics to products made of VT1-0 alloy. The developed coating can be used in the manufacture of dental implants.