

# Исследование покрытий имплантационных материалов на биосовместимость

**В. И. Зеленский**, аспирант кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии  
**Ал. Ал. Долгалева**, д.м.н., доцент кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии  
**Н. Н. Диденко**, аспирант кафедры патологической физиологии  
**А. В. Дмитриенко**, студент стоматологического факультета  
**Ю. Р. Есеев**, студент стоматологического факультета  
**У. Р. Курбанова**, студент стоматологического факультета

ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
 г. Ставрополь

## Research of coatings of implantation materials for biocompatibility

V.I. Zelensky, N.N. Didenko, Al. Al. Dolgalev, A.V. Dmitrienko, Yu.R. Eseneev, U.R. Kurbanova  
 Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia

### Резюме

Показаны достоверные различия биосовместимости фибробластов, культивированных в присутствии образцов титановых сплавов, поверхность которых была обработана различными способами.

**Ключевые слова:** имплантат, остеоинтеграция, клеточные культуры, куриные эмбрионы, биосовместимость, магнетронная обработка.

### Summary

Significant differences in the biocompatibility of fibroblasts cultured in the presence of samples of titanium alloys, the surface of which was processed in various ways, are shown.

**Key words:** implant, osseointegration, cell cultures, chicken embryos, biocompatibility, magnetron processing.

### Введение

Изменение микро- и наноструктуры поверхности имплантата является ключом к оптимальной остеоинтеграции [1]. При этом в доступной литературе практически отсутствуют исследования по изучению влияния различных видов поверхности для имплантата на клетки и ткани, с которыми контактирует та или иная поверхность данного имплантата [2].

**Целью нашего исследования** было изучение жизнеспособности и уровня АТФ фибробластов, культивированных в присутствии образцов титановых сплавов, поверхность которых была обработана различными способами, а также предварительная оценка эмбриотоксичности на модели развивающегося куриного эмбриона.

### Материалы и методы

В работе использован метод магнетронного напыления, который широко применяется в вакуумной технологии для нанесения покрытий из различных материалов. Установка магнетронного распыления позволяет получать покрытия практически из любых металлов, сплавов и полупроводниковых материалов

без нарушения стехиометрического состава. В качестве рабочего газа мы использовали высокочистый аргон 99,999 %. Источником материала покрытия являлась мишень, представляющая собой конструкцию из особо чистого титана (99,99 %).

Нанесение титановых покрытий проводилось при температуре титановых шайб 150 °С и мощности магнетронного напыления 200–300 Вт. После нанесения титановых покрытий образцы подвергались вакуумной термообработке при температуре 450 °С в течение 2 часов.

Исследования морфологии поверхности титана проводились с использованием атомно-силовой микроскопии на установке компании NT-MDT Solver Next.

Первичные культуры фибробластов, полученные из 9-дневных куриных эмбрионов, культивировали в стандартных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Multitron Cell (INFORS HT) при температуре 37 °С в среде DMEM с 5 %-ной эмбриональной телячьей сывороткой в пластиковых культуральных флаконах 25 см<sup>2</sup>. На третьем пассаже клетки высевались в 24-луночные планшеты по 3 × 10<sup>4</sup> клеток на лунку. По достижению

70–80 %-ной конfluenceности моно-слоя в лунки помещали образцы исследуемых материалов.

Оценку жизнеспособности и уровня АТФ проводили через 24 и 48 часов культивирования в присутствии исследуемого образца. Проводился люминесцентный анализ АТФ с использованием ATPlite 1 step (Perkin Elmer) при помощи Cytation 1 (BioTek). Подсчет клеток и уровня их жизнеспособности проводился при помощи автоматического счетчика клеток Louna.

Исследование проводилось согласно методике Ercan Durmus *et al.* (2004) в некоторой ее модификации. Для исследования предварительно обеззараженные в сухожаре FD 115 (Binder, Германия) образцы в асептических условиях были помещены в стерильные пробирки (эппендорфы), содержащие 0,5 мл стерильного физиологического раствора с добавлением пенициллина (125 МЕ/мл), стрептомицина (125 мкг/мл) и гентамицина (10 мкг/мл) (рис. 1). Образцы подвергались воздействию растворов в течение 172 часов при 37 °С в шейкер-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия).

Затем проводилась оценка эмбриотоксичности полученных растворов. Использовались оплодотворенные

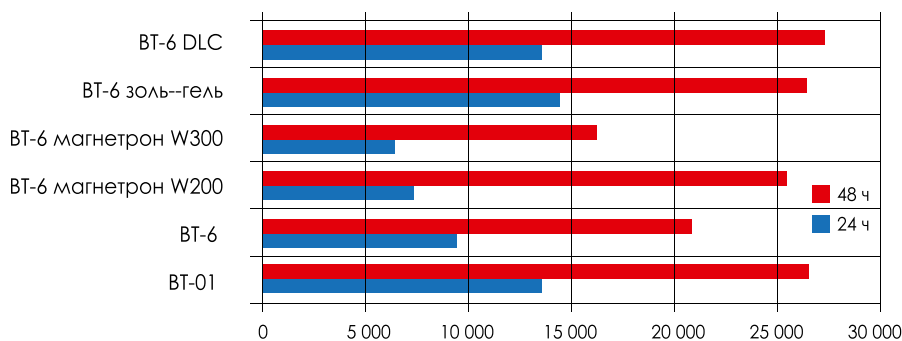


Рисунок 1. Динамика уровня АТФ в культивируемых клетках в течение 48 часов после внесения образцов исследуемых материалов (в относительных единицах люминесценции).



Рисунок 2. Введение исследуемого раствора в воздушный мешок яйца.

куриные яйца беспородных кур, закупленные в местном птицеводческом хозяйстве.

Яйца взвешивались и делились на семь групп, каждая из которых содержала 10 яиц.

Введение исследуемых растворов осуществляли непосредственно перед закладкой яиц в инкубатор в стерильном боксе в ламинарно-поточном шкафу LVC-6A (ESCO) с соблюдением правил асептики.

Инъекции растворов проводили в воздушный мешок яйца после предварительной обработки скорлупы раствором спирт-йода. Отверстие для инъекции просверливалось с помощью минидрели и набора предварительно дезинфицированных сверл диаметром 0,6 мм. Введение растворов в количестве 40 мкл осуществляли с помощью инсулинового шприца (рис. 2).

После инъекции отверстия запечатывались расплавленным парафином. Затем яйца помещались в инкубатор ИЛБ-0,5 (Россия). Поддерживались стандартные условия инкубирования (65% относительной влажности, 38,0 °C). Развитие эмбрионов кон-

**Таблица 1**  
Результаты люминесцентного анализа уровня АТФ в культивируемых клетках через 24 часа после внесения образцов исследуемых материалов (в относительных единицах люминесценции)

|                     |       |
|---------------------|-------|
| BT 1-0              | 13573 |
| BT-6                | 9517  |
| BT-6 магнетрон W200 | 7352  |
| BT-6 магнетрон W300 | 6401  |
| BT-6 золь-гель      | 14444 |
| BT-6 DLC            | 13568 |

**Таблица 2**  
Результаты люминесцентного анализа уровня АТФ в культивируемых клетках через 48 часов после внесения образцов исследуемых материалов (в относительных единицах люминесценции)

|                     |       |
|---------------------|-------|
| BT 1-0              | 26648 |
| BT-6                | 20915 |
| BT-6 магнетрон W200 | 25482 |
| BT-6 магнетрон W300 | 16291 |
| BT-6 золь-гель      | 26473 |
| BT-6 DLC            | 27308 |

тролировалось при помощи овоскопа ПКЯ-10 («Ветзоотехника», Россия).

Инкубируемые яйца вскрывались на 12-й и 38-й дни инкубации.

С помощью лабораторных весов ВЛТЭ-150 («Госметр», Россия) определялась масса яиц и эмбрионов. Рассчитывалась относительная масса эмбрионов.

Эмбриональные стадии развития определяли по шкале Гамбургера-Гамильтона (V. Hamburger, H. L. Hamilton, 1951). Учитывали число мертвых, живых эмбрионов, с задержкой развития.

Все полученные результаты НИР подвергались статистической обра-

ботке с помощью критерия Стьюдента. Вычисления производили с использованием программы Biostat 4.03.

Исследование осуществлено в рамках государственного задания Минздрава России для Ставропольского государственного медицинского университета по осуществлению научных исследований и разработок по теме: «Разработка наноструктурированных поверхностей внутрикостных дентальных имплантатов».

## Результаты и обсуждение

Исследовано влияние технологических режимов напыления на морфологию и шероховатость поверхности полученных титановых покрытий. Обнаружено, что увеличение мощности распыления (от 200 до 300 Вт) приводит к значительному изменению структуры, что сопровождается изменением размера зерен и, как результат, шероховатости поверхности титановых покрытий.

Результаты исследований показали, что магнетронная обработка изделия химически чистым титаном позволяет создать наноструктурированную поверхность, связанную с подложкой на атомарном уровне, морфология которой на наноуровне изменяется в зависимости от мощности излучения; Последующая термическая обработка (до 450 °C) не приводит к существенным изменениям морфологии поверхности образца, профиля неоднородности и ее гранулярности. При магнетронной обработке поверхности алюминиево-ванадиевого сплава титана BT6 химически чистым титаном элементный состав модифицированной поверхности соответствовал составу титана BT1-0 (отмечаются полное отсутствие ванадия и незначительные примеси алюминия).

Результаты оценки уровня АТФ через 24 и 48 часов представлены в табл. 1 и 2 соответственно.

По истечении 48 часов наибольшим уровнем АТФ обладали клетки, культивированные в присутствии образца материала BT-6 DLC. При этом уровень АТФ в клетках, культивированных в присутствии образца материала BT-6 DLC, достоверно не отличался от уровня АТФ в клетках, культивированных в присутствии образца материала BT-01 ( $t = 0,07$ ;  $p > 0,5$ ).

Наибольшая положительная динамика уровня АТФ за вторые сутки показана у клеток, культивированных в присутствии образца материала ВТ-6, магнетрон W200 (+246,6).

При анализе жизнеспособности клеток наибольший ее уровень также показан у клеток, культивированных в присутствии образца материала ВТ-6 DLC (табл. 3).

Полученные результаты и их статистический анализ приведены в табл. 4.

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 (рис. 3).

Группы № 1 и 2 характеризовались некоторой тенденцией к увеличению смертности эмбрионов. Причем в от-

**Таблица 3**  
**Результаты анализа жизнеспособности культивируемых клеток через 24 и 48 часов после внесения образцов исследуемых материалов**

|                     | Через 24 часов, % | Через 48 часов, % |
|---------------------|-------------------|-------------------|
| ВТ-1-0              | 83                | 82                |
| ВТ-6                | 65                | 62                |
| ВТ-6 магнетрон W200 | 51                | 60                |
| ВТ-6 магнетрон W300 | 54                | 63                |
| ВТ-6 золь-гель      | 74                | 77                |
| ВТ-6 DLC            | 83                | 85                |



А



Б

Рисунок 3. Куриный эмбрион на 18-е сутки развития. А — нормальное развитие (группа № 7); Б — задержка развития (группа № 2).

**Таблица 4**  
**Проявление основных характеристик эмбриотоксичности в исследуемых группах**

| Группа (n = 10) | Количество неоплодотворенных яиц | Количество мертвых эмбрионов | Средняя масса яиц, г | Абсолютная масса эмбрионов на 12-е сутки инкубации, г | Относительная масса эмбрионов на 12-е сутки инкубации, % |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 1               | 1                                | 2                            | 53,88 ± 1,31         | 3,89 ± 0,17                                           | 7,20 ± 1,08                                              |
| 2               | 1                                | 2                            | 56,98 ± 1,48         | 3,98 ± 0,57                                           | 6,91 ± 1,43                                              |
| 3               | 1                                | 1                            | 52,76 ± 1,39         | 3,66 ± 0,46                                           | 7,01 ± 0,87                                              |
| 4               | 1                                | 1                            | 53,28 ± 1,33         | 3,75 ± 0,38                                           | 7,15 ± 1,11                                              |
| 5               | –                                | –                            | 54,31 ± 1,36         | 3,76 ± 0,34                                           | 6,98 ± 0,96                                              |
| 6               | –                                | 1                            | 55,86 ± 1,39         | 3,88 ± 0,36                                           | 6,93 ± 0,99                                              |
| 7               | 1                                | –                            | 53,97 ± 1,34         | 3,94 ± 0,18                                           | 7,28 ± 0,87                                              |

**Таблица 5**  
**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               | 1                            | 1                                          | –       | –        | –        | –        | –        | –        | –        |
| 4               | 1                            | 1                                          | –       | –        | –        | –        | –        | –        | –        |
| 5               | –                            | –                                          | –       | –        | –        | –        | –        | –        | –        |
| 6               | 1                            | 1                                          | –       | –        | –        | –        | –        | –        | –        |
| 7               | –                            | –                                          | –       | –        | –        | –        | –        | –        | –        |



А



Б

Рисунок 4. Случаи замерших куриных эмбрионов в группах № 1 (А) и № 2 (Б) на этапах развития НН 32–37.

личие от других групп, в названных в соответствии со шкалой Hamburger-Hamilton встречались замершие эмбрионы, соответствующие уровню развития НН 32–37 (табл. 5; рис. 4).

#### Заключение

Таким образом, клетки, культивированные в присутствии об-

разца титано-ванадиевого сплава ВТ-6 с поверхностью, полученной при магнетронной обработке W200, обладают вторым по показателям уровнем метаболизма и жизнеспособности, сравнимыми с показателями, полученными для образцов титановых сплавов ВТ1–0. Исследовались растворы (экстракты) ма-

териалов на модели развивающегося куриного эмбриона. Согласно полученным данным выявлена некоторая тенденция к увеличению смертности эмбрионов под влиянием образцов № 1 и 2. Под влиянием образцов № 2 зарегистрированы также единичные случаи задержки развития.

#### Список литературы

1. Долгалева А. А., Зеленский В. А., Амхадова М. А., Бойко Е. М., Брусничин Д. А. Опыт применения отечественных ксеноматериалов для направленной костной регенерации в дентальной имплантации. Медицинский алфавит. 2017; 11 (308): 13–17.
2. Smeets R., Stadlinger B., Schwarz F., Beck-Broichsitter B., Jung O., Precht C., Kloss F., Gröbe A., Heiland M., Ebker T. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. Biomed Res Int. 2016; 2016: 6285620. doi.org/10.1155/2016/6285620.
3. Durmus E., Inan Ö., Çelik I., Sur E., Özkan Y., Acar A. & Aydın M. F. (2004). Use of the fertilized hen's egg in the evaluation of embryotoxicity of dental alloys. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 72B (2), 322–327. doi: 10.1002/jbm.b.30154.
4. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 1951; 88: 49–92.

**Для цитирования.** Зеленский В. И., Долгалева А. А., Диденко Н. Н., Дмитриенко А. В., Есенева Ю. Р., Курбанова У. Р. Исследование покрытий имплантационных материалов на биосовместимость // Медицинский алфавит. Серия «Стоматология». — 2019. — Т. 2. — 11 (386). — С. 29–32.



**СТОМАТОЛОГИЧЕСКАЯ  
ВЫСТАВКА**

РЕСПУБЛИКА КРЫМ | Г. СИМФЕРОПОЛЬ  
УЛ. НАБЕРЕЖНАЯ, 75В | МФК «ГАГАРИНСКИЙ»

**10-12  
октября  
2019**

**КРЫМ  
Стоматология**

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ПАРТНЕР

**Н.СЕЛЛА**  
THE DENTAL COMPANY

ОРГАНИЗАТОР

**РОСТ ЭКСПО**  
ТЕРРИТОРИЯ ВАШЕГО РОСТА

**CRIMEASTOMATOLOGIYA | EXPO@CTAKK.RU**  
**7 (978) 742-11-92 | WWW.CTAKK.RU**

