

Технология нанесения многослойных тонкопленочных покрытий на имплантатах с высоким риском для пациента в период их использования.

Наши технологии позволяют формировать тонкопленочные (от 20 до 150 нм) функциональные покрытия с заданными свойствами на поверхности имплантируемых конструкциях, существенно улучшая их свойства.

Основные особенности технологии.

Мы можем формировать покрытия с разной модификацией углерода алмазная sp^3 - фаза или метастабильная модификация линейно-цепочечного углерода sp^1 - фаза, при минимальной концентрации малых кластеров sp^2 -углерода, относящиеся к ряду ароматических углеводородов и обладающим сильным канцерогенным действием. Технология позволяет получение слоистых структур с хорошей адгезией и сплошным закрытием поверхности имплантата.

Покрытия можно делать гидрофобные (препятствующие адгезии клеток к поверхности имплантата) или гидрофильные (адгезионные).

Для всех типов имплантатов данные покрытия обеспечивают:

✓ **Многokrатное снижение бактериальной обсемененности**

Изучение процесса бактериальной колонизации углеродных покрытий (1)

Индекс адгезии тест-культур *S. haemolyticus* и *S. saprophyticus* на образцах, модифицированных углеродным покрытием №1, немного выше (на 0,19 и 0,69 lg единицы), чем на контрольных образцах. Для культуры золотистого стафилококка наблюдается противоположный эффект: снижение ИА на 0,28 lg единицы для образцов с углеродным покрытием №1 в сравнении с контролем. Для грамотрицательных тест-культур *Ps. aeruginosa* и *Acinetobacter* также отмечается снижение показателей адгезии на 0,29 lg единицы, а для культуры *Kl. pneumoniae* на 2,89 lg единицы на модифицированных образцах. В то же время ИА кишечной палочки для опытных и контрольных образцов практически одинаковы: 3,15 и 3,17 lg единицы соответственно. Индекс адгезии *C. albicans* на образцах с углеродным покрытием №1 также на 0,85 lg единицы ниже соответствующего показателя для контроля.

Результаты по оценке выживаемости тест-культур, адгезированных на поверхности биопротезов, углеродным покрытием №1. После суточной экспозиции искусственно инокулированных тест-образцов наблюдается сплошной рост штаммов стафилококковых тест-культур на поверхности контроля – аллогенной ткани и отсутствие роста этих же культур на поверхности образцов, модифицированных углеродным покрытием №1, за исключением штамма культуры *S. saprophyticus*, единичный рост которого отмечается на поверхности опытных образцов. Количество жизнеспособных клеток *C. albicans* после суточной экспозиции уменьшилось, но незначительно - на 0,2 lg единицы, при положительной динамике на контроле. Результаты, полученные для грамотрицательных культур – неоднозначны. Штаммы синегнойной палочки и ацинетобактера сохранили свою жизнеспособность через 24 часа инкубирования при оптимальных температурных режимах и влажности: на модифицированных образцах наблюдается сплошной рост штаммов *Ps. aeruginosa* и *A. baumannii*, соответственно на аллогенной ткани – сливной рост. В то же время количество жизнеспособных клеток *E. coli*, адгезированных на поверхности образцов с покрытием углеродным покрытием №1, после суточной инкубации снизилось на 0,64 lg единицы, при сплошном росте кишечной палочки на контрольных образцах. Культура *Kl. pneumoniae* не выжила на образцах с покрытием из углеродного покрытия №1 в отличие от контрольных образцов, на которых этот же штамм дал сливной рост.

Таблица. Адгезия и выживаемость грамположительных тест-культур, на поверхности модифицированных биопротезов

Образцы	Грамположительные тест-культуры, lg ИА							
	<i>S. aureus</i> n=15		<i>S. haemolyticus</i> n=15		<i>S. saprophyticus</i> n=15		<i>C. albicans</i> n=15	
	адг.	выж.	адг.	выж.	адг.	выж.	адг.	выж.
Модифицированные углеродным покрытием №1	2,98	0	3,14	0	3,43	0,6	2,15	1,95
Контроль, аллогенная ткань	3,26	4	2,95	5	2,74	5	3,3	4

$p < 0,001$

Таблица. Адгезия и выживаемость грамотрицательных тест-культур на поверхности модифицированных биопротезов

Образцы	Грамотрицательные тест-культуры, lg ИА							
	<i>E. coli</i> n=15		<i>Ps. aeruginosa</i> n=15		<i>A. baumannii</i> n=15		<i>Kl. pneumoniae</i>	
	адг.	выж.	адг.	выж.	адг.	выж.	адг.	выж.
Модифицированные углеродным покрытием №1	3,15	2,51	4,71	5	3,23	5	2,11	0
Контроль, аллогенная ткань	3,17	5	5	6	3,52	6	5	6

$p < 0,001$

Изучение процесса бактериальной колонизации углеродных покрытий типа №2, показало, что происходит прерывание адгезии и колонизации тест-культур. На поверхности биопротезов, модифицированных углеродным покрытием, наблюдается отсутствие роста представителей грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, кроме культуры *C. albicans*. Индекс адгезии *C. albicans* составил 2,04 lg единицы, и практически не изменился (2 lg ед.) после суточной экспозиции при оптимальных условиях.

Образцы	Грамположительные тест-культуры, Ig IA					
	S. aureus n=15		S. epidermidis n=15		C. albicans n=15	
	адгез.	выжив.	адгез.	выжив.	адгез.	выжив.
Модифицированные углеродным покрытием №2	0	0	0	0	2,04	2
Контроль, аллогенная ткань	3,26	4	2,79	5	3,3	4

p < 0,001

Адгезия и выживаемость грамотрицательных тест-культур на поверхности биопротезов, модифицированных углеродным покрытием

Образцы	Грамотрицательные тест-культуры, Ig IA					
	E. coli n=15		Kl. pneumoniae n=15		Ps. aeruginosa n=15	
	адгез.	выжив.	адгез.	выжив.	адгез.	выжив.
Модифицированные углеродным покрытием №2	0	0	0	0	0	0
Контроль, аллогенная ткань	3,1	5	5	6	4	6

Результаты, полученные в нашей работе, свидетельствуют о том, что углеродное покрытие не вызывает прерывание адгезии стафилококковых культур. Однако в дальнейшем адгезированные культуры стафилококков не сохраняют свою жизнеспособность, и наблюдается отсутствие роста грамположительных тест-культур (включая метициллин-резистентные штаммы золотистого стафилококка) на поверхности модифицированных биопротезов.

Наличие перитрихально расположенных фимбрий (пили) у бактериальной клетки E. coli обеспечивает другой механизм взаимодействия бактерий с углеродным покрытием. Пили представляют собой белковые цилиндры длиной от 0,2 до 2,0 микрон; диаметр фимбрий 5 – 10 нм, а диаметр отверстий внутри цилиндра – 2-2,5 нм. Пили являются факторами колонизации и обеспечивают прикрепление бактериальной клетки к различным поверхностям. Взаимодействие полых структур фимбрий с кристаллической решеткой углеродных цепочек покрытия, может быть основным фактором, влияющим на выживаемость адгезированных бактерий E. coli.

Способность к капсулообразованию или к продукции капсулоподобной экстрацеллюлярной слизи обеспечивает устойчивость бактериальной клетки к воздействию различных неблагоприятных условий окружающей среды. Видимо этим фактором можно объяснить выживаемость культур Ps. aeruginosa и Ac. baumannii на поверхности нано-покрытия из двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода.

Способность C. albicans колонизировать углеродные покрытия может быть связана со способностью вида C. albicans образовывать хламидоспоры (споры с плотной двойной оболочкой) и таким образом адаптироваться к неблагоприятным условиям.

Вывод

Было установлено, что углеродное покрытие вызывает снижение выживаемости микроорганизмов на поверхности имплантата на 2-3 порядка, хотя при этом индекс адгезии микроорганизмов не изменялся.

✓ Идеальные клеточные и иммунные реакции (2)

Целью исследования (2)

Экспериментальное изучение закономерностей формирования ответной реакции тканей при имплантации с нано размерным алмаз подобным углеродным покрытием.

Результаты исследований и их обсуждение

Оценили характер тканевой реакции при имплантации образцов без покрытия. Совокупность наблюдаемых реакций отражала типичную последовательность изменений в зоне введения инородного тела. При этом воспалительные изменения сохранялись достаточно долго - на 21-е сутки грануляционная ткань с признаками неполной зрелости, очаги воспалительной реакции присутствовали даже через 6 месяцев. На ранних сроках выявлялась гигантоклеточная реакция макрофагов на инородное тело - имплантат, которая нарастала в интервале с 7 до 21-х суток. Через 6 месяцев имплантат полностью инкапсулировался. Однако сформированная соединительно-тканная капсула была неоднородной: участки преобладающего фиброза (даже с очагами гиалиноза) сочетались с зонами воспалительной инфильтрации. На внутренней поверхности определялись клетки типа эпителиоидных гистиоцитов. Не наблюдалось полной интеграции структур капсулы в окружающую соединительную ткань - между ними четко прослеживалась граница.

Далее мы оценили характер тканевой реакции при имплантации экспериментальных образцов с нано размерным алмаз подобным углеродным покрытием. На 7-е сутки эксперимента вокруг образца определялась равномерная зона грануляционной ткани с визуальной меньшей плотностью клеточного состава в сравнении с контролем. Наружная граница инфильтрата также была нечеткой, но определяемая ширина была значительно меньше и составляла 100-150 мкм (p < 0,05). Существенно отличался и клеточный состав - преобладали незрелые фибробласты, составившие 55-70 % (p < 0,05), а лейкоциты и гистиоцитарные элементы составили 30-45 % (p < 0,05). Инфильтрат имел рыхлое строение, не содержал характерных для грануляционной ткани капиллярных структур. Гигантские клетки инородных тел отсутствовали. Поверхность экспериментального образца имплантата в гистологических препаратах содержала непрерывный серо-коричневый слой покрытия толщиной 1,5-2 мкм. Контакт покрытой наружной поверхности с окружающими реактивными тканями был плотный, без проникновения элементов инфильтрата в толщу имплантата (рис. 1).

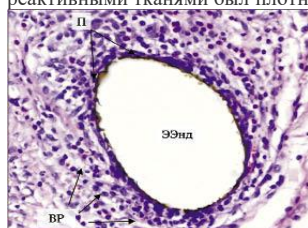


Рис. 1. Реакция соединительной ткани на экспериментальный образец с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием (ЭЭнд) на 7-е сутки эксперимента: на поверхности имплантата непрерывный слой покрытия серо-коричневого цвета (П), зона воспалительной реакции (ВР) узкая, диффузного характера с умеренной плотностью клеточного состава, заметным количеством молодых фибробластов. На 21-е сутки после имплантации вокруг материала сформировался непрерывный слой грануляционной ткани шириной 100-160 мкм (p < 0,05). Определялись единичные радиально ориентированные капилляры, в клеточном составе преобладали фибробласты, составившие 60-70 % (p < 0,05), лейкоциты в равной пропорции (10-15 %, p < 0,05) представлены полиморфноядерными элементами и малыми лимфоцитами, на гистиоциты пришлось в разных участках 5-10 % (p < 0,05). На этом сроке уже были заметны процессы созревания грануляционной ткани в фиброзную, что проявлялось наличием четко

различных равномерно распределенных участков тонковолокнистого строения и зон гомогенного оксифильного межклеточного матрикса. Гигантские клетки инородных тел отсутствовали (рис. 2).

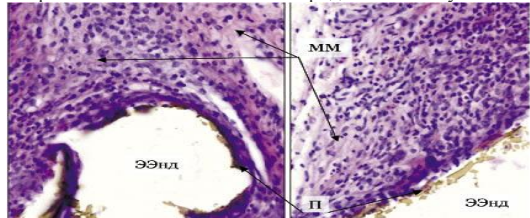


Рис. 2. Морфологические изменения в зоне имплантации экспериментального образца с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием (ЭЭнд) на 21-е сутки: в клеточном составе преобладают фибробластические элементы (Ф), лейкоцитарный компонент выражен умеренно, четко определяются зоны формирования межклеточного матрикса (ММ), покрытие имплантата (П) участками фрагментировано, но определяется по всей площади. Через 180 суток после имплантации выявлены существенные особенности в сравнении с группой контроля. Общая картина имела вид полной инкапсуляции протеза с капсулой, структурно полностью интегрированной в окружающую соединительную ткань. Структура капсулы была представлена 5-10 компактными слоями коллагеновых волокон, участками, имеющими гиалинизированный вид, между которыми равномерно распределено небольшое число фиброцитов. Элементы воспалительного инфильтрата, эпителиоидные гистиоциты на внутренней поверхности капсулы, гигантские клетки инородных тел отсутствовали. Практически отсутствовали и кровеносные сосуды. Внутренние слои капсулы имели концентрическую ориентацию вокруг сетчатых структур имплантата, снаружи плавно переходили в пучки коллагеновых волокон подкожной соединительной ткани. Толщина капсулы была меньше и составила 60-70 мкм ($p < 0,05$) (рис. 3).

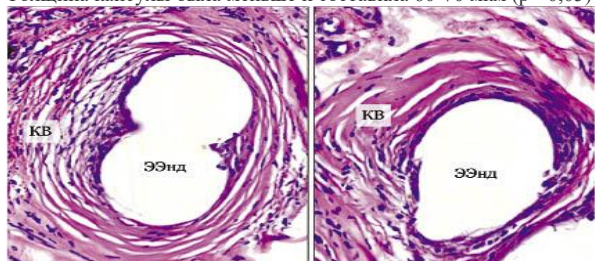


Рис. 3. Структура соединительно-тканной капсулы вокруг экспериментального образца: концентрические малоклеточные слои коллагеновых волокон (КВ) с плавным переходом в окружающую соединительную ткань, отсутствие воспалительных изменений и гигантоклеточной реакции на имплантат. Таким образом, заметные отличия в характере тканевой реакции при имплантации экспериментальных образцов с наноразмерным углеродным покрытием определялись уже к 7-м суткам эксперимента. Происходило более раннее формирование фибробластического компонента в грануляционной ткани, что отражали результаты подсчета относительного количества клеточных элементов в составе инфильтратов. На 21-е сутки фибробласты с морфологическими признаками функционально активных форм составляли 60-70 %, на этом сроке явно определялись зоны формирования аморфного и волокнистого компонентов межклеточного вещества. В отдаленные сроки (180 суток) выявлена полная биоинтеграция имплантата в подкожную соединительную ткань в виде ареактивной инкапсуляции соединительной тканью, непосредственно связанной с окружающими структурами. Воспалительных и других реактивных изменений не выявлено. При этом одним из самых существенных отличий от группы контроля явилось отсутствие на всех сроках эксперимента гигантоклеточной трансформации макрофагов и формирования клеток инородных тел.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что экспериментальные образцы с наноразмерным алмазоподобным углеродным покрытием, в сопоставлении с аналогичным образцом без покрытия, обладают большей биосовместимостью и лучшей биоинтеграцией в окружающую соединительную ткань в процессе инкапсуляции в отдаленные сроки. Выраженное отсутствие образования фиброзной ткани, приводящее к отторжению имплантата.

✓ Покрытие препятствует химико-биологическому и механическому разрушению имплантата и как следствие попадания частиц износа имплантата, в том числе ионов металлов в прилегающие ткани (3)

ТЕСТ на выделение частиц титана (3)

Испытания дентальных имплантатов без покрытия и имплантатов с покрытием методом динамического светорассеяния (ДСР).

Проведены испытания дентальных имплантатов на выход nano частиц с их поверхности, а именно исследованы супернатанты после инкубации имплантатов методом динамического рассеяния света (ДСР).

Имплантаты инкубировали в воде для инъекций объемом 1 мл в течение 5 суток, после этого отбирали супернатанты, добавляли 1 мл воды (суммарный объем пробы 2 мл) и проводили измерения. Эксперименты проводили на приборе фирмы 90 Plus Partical Size Analyzer Brookhaven instruments corporation (США) в мультимодальном режиме. Измерения регистрировали при температуре 25°C, фиксированном угле рассеяния света 90° лазера 661 нм. Для определения размера частиц использовали автоматическую функцию 90Plus/BI-MAS.

Результаты ДСР

Образец	Молекулярно-массовые параметры супернатантов после инкубации дентальных имплантатов		
	D, nm	ACR, kcps	PD, %
Имплантаты			
Без покрытия	221	5.3	0.005
С покрытием Sp3 фазы углерода	0	0	0

где, D – средний диаметр частиц;

ACR – интенсивность сигнала (average count rate, kilo counts per second);

PD – полидисперсность образца, %

Вывод: в результате инкубации в течение 5 суток в воде для инъекций образцов дентальных имплантатов без механического и физического воздействия в супернатанте образца С ПОКРЫТИЕМ частиц обнаружено не было (ACR и PD = 0), в то время как в супернатанте образца БЕЗ ПОКРЫТИЯ (ГОЛЫЙ ТИТАН) присутствуют частицы со средним диаметром 221 нм (ACR=5.3 kcps).