

УДК 54.057, 573.6
EDN: SZMPWP

PACS: 87.85.jj

Получение кальцийсодержащих оксидных покрытий на титановых мембранах для задач челюстно-лицевой хирургии и стоматологии

А. С. Скрябин, В. Р. Веснин, А. В. Шакуров, Е. С. Скрябина, Ю. С. Лукина,
Л. Л. Бионышев-Абрамов, Н. Б. Серезникова

В работе представлены результаты исследования процесса микродугового оксидирования с добавкой фосфатов кальция для стимуляции эффективности интеграции в кость титановых мембран. Образцы покрытий были проанализированы с использованием рентгенофазового анализа и рентгеновской флуоресценции. In vivo оценка эффективности интеграции проведена с применением лабораторных животных, путём микрокомпьютерной томографии и гистологии. В результате продемонстрировано, что использованная методика имела положительный эффект по сравнению с необработанными мембранами, что выражалось в стимуляции образования костного регенерата от краев дефекта при практически полном отсутствии воспаления.

Ключевые слова: микродуговое оксидирование, анатаз, биосовместимость, in vivo испытания.

DOI: 10.51368/1996-0948-2024-4-63-69

Введение

Титановые мембраны активно применяются для протезирования в области челюстно-лицевой хирургии, стоматологии и пр. [1]. При этом имеется необходимость стимуляции эффективности их интеграции в кость путём нанесения специальных биоактивных керамических покрытий, среди которых могут применяться гидроксипатит и оксиды, а также их сочетания [2]. Важно отметить, что металлические мембраны, будучи имплантированы в

ротовую полость, неминуемо подвергаются существенным и аperiodическим механическим нагрузкам, что ограничивает применение таких методов как плазмоструйное [3] и детонационное [4] напыление к осаждению кальций фосфатных покрытий, которые при эксплуатации на гибких металлических подложках будут склонны к выкрашиванию.

Альтернативой указанным выше подходам может являться микродуговое оксидирование (МДО), которое приводит к формированию пористых керамических покрытий на

Скрябин Андрей Станиславович¹, доцент, к.т.н.
E-mail: terra107@yandex.ru

Веснин Владимир Романович¹, инженер.

Шакуров Алексей Валерьевич¹, зав. отделом, к.т.н.

Скрябина Елизавета Сергеевна¹, инженер.

Лукина Юлия Сергеевна^{1,2}, инженер, к.т.н.

Бионышев-Абрамов Леонид Львович², лаборант-исследователь.

Серезникова Наталья Борисовна³, с.н.с., к.б.н.

¹ МГТУ им. Н. Э. Баумана.

Россия, 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., 5/1.

² ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н. Н. Приорова».

Россия, 127299, Москва, Приорова ул., 10.

³ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова

Минздрава России (Сеченовский Университет).

Россия, 119991, Москва, Трубецкая ул., 8.

Статья поступила в редакцию 8.04.2024

После доработки 22.04.2024

Принята к публикации 14.05.2024

Шифр научной специальности: 1.3.8

© Скрябин А. С., Веснин В. Р., Шакуров А. В.,
Скрябина Е. С., Лукина Ю. С., Бионышев-Абрамов Л. Л.,
Серезникова Н. Б., 2024

основе TiO_2 (в виде анатаза), которые стимулируют клеточную пролиферацию, адгезию и нуклеацию биологического апатита [5], что в итоге потенциально может повысить эффективность интеграции в костную ткань. Важно также отметить, что различные варианты МДО [6] позволяют организовать насыщение формирующегося оксидного слоя атомами кальция и фосфора, которые в дальнейшем по мере пребывания в организме будут входить в состав нарастающей костной ткани. МДО в целом по сравнению с другими электрохимическими методами, например анодированием [7], способствует формированию на поверхности развитой и пористой оксидированной поверхности, что наряду с наличием биосовместимой фазы TiO_2 анатаза дополнительно стимулирует интеграцию имплантов в костную ткань. Кроме того, МДО не приводит к изменению формы импланта, что упрощает хирургические процедуры и предотвращает разрушению интерфейса «кость-имплант» при эксплуатации.

Несмотря на существенный накопленный опыт в области данных исследований, отметим, что в настоящий момент недостаточно информации об эффективности подобных систем для протезирования краниодефектов, весьма чувствительных для качества интерфейса «кость/имплант» и качества покрытий. Получению первичной информации о связи метода МДО и отдельных параметров покрытий с помощью *in vivo* моделей посвящена данная работа.

Материалы и методы

В качестве исходных мембран в экспериментах использованы стандартные медицинские изделия (ООО «ЭНДОКАРБОН», Россия) толщиной 0,1 мм и с размером сквозных пор 0,5 мм из ВТ1-00 при удельном весе мембран $\approx 1,9 \times 10^{-2}$ г/см². Процесс МДО проводился в электролите на основе КОН (5,9 г на 13 л дистиллированной воды) при напряжении ≈ 380 В в течение 30 мин. Схема эксперимента представлена на рисунке 1. В качестве датчика тока 1 использован LEM LA 77p сенсор, а в качестве датчика напряжения 2 – измеритель, переделанный из СТ 0.2-Р сенсора.

Характерные значения плотности тока в оксидируемый имплант $\approx 70\text{--}100$ А/дм².

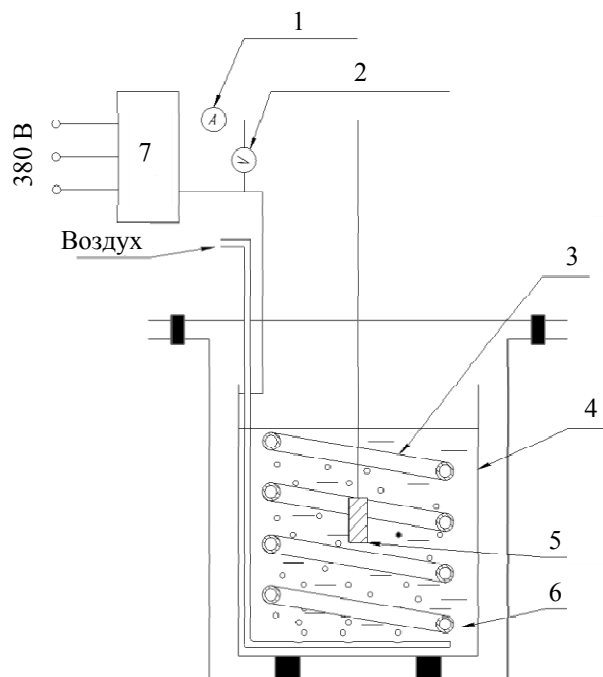


Рис. 1. Схема МДО импланта: 1 – датчик тока LEM LA 77p, 2 – датчик напряжения, 3 – теплообменник, 4 – корпус, 5 – обрабатываемая деталь, 6 – электролит, 7 – источник питания

Для поддержания необходимого теплового режима использован теплообменник 3, соединенный с водопроводом лаборатории. Подача напряжения производилось на корпус (бак) из нержавеющей стали 4 и титановый образец 5. Сам бак заполнен электролитом 6. Питание реализовано от источника 7 на основе накопителя с емкостью 70 мкФ. Для организации барботажки использован сжатый воздух, подаваемый от компрессора через шланг.

В качестве прекурсора для насыщения поверхности атомами кальция и фосфора использован нестехиометрический ГАп (ООО «Битека», Россия) с концентрацией 15 г/л. Предварительно электролит подвергался ультразвуковому (УЗ) диспергированию при мощности 60 Вт в течение 25 мин. Мембраны после МДО подвергались резке и шлифовке поверхности на мелкозернистом шлифовальном листе для удаления верхних слоев покрытия и раскрытия внутренних пор с последующей УЗ обработкой в ацетоне.

Исследования фазового состава покрытий выполнено с помощью рентгеновского

дифрактометра ДРОН-3М в диапазоне углов 2θ от 10 до 50° с шагом $0,1^\circ$ с использованием характеристического излучения $\text{CuK}\alpha$ $\lambda = 0,154$ нм. Интерпретация полученных дифрактограмм была проведена с помощью базы ICDD PDF2 [8]. Исследование элементного состава покрытий проведено с помощью рентгеновского флуоресцентного микроспектрометра M4 Tornado Bruker, который имеет две измерительные трубки с Rh и Mo анодами при напряжении на них 50 кВ и мощности 30 Вт. Указанный спектрометр благодаря особенностям коллимации позволяет организовать исследование элементного состава с размерами целевой области исследования $25\text{--}1000$ мкм.

Полученные образцы мембран (контроль без покрытий и опыт с покрытиями) обрезались до кругов с диаметром ≈ 8 мм и имплантировались в краниодефект самцов лабораторных крыс Вистар массой $250\text{--}300$ гр. Срок наблюдения составлял 3 месяца. После выведения из эксперимента образцы подвергались микрокомпьютерной рентгеновской томографии (КТ) (Bruker SkyScan 1178; размер матрицы 1024×1024 пикселей, размер пикселя 84 мкм), а также гистологической оценке. Для этого образцы фиксировали в нейтральном формалине, декальцинировали, удаляли

сетку из вырезанного фрагмента, обезжировали в изопропанол, заливали в парафин, получали срезы толщиной 4 микрона, окрашивали гематоксилин-эозином. Их изучали при светлорольной световой микроскопии в микроскопе Leica DM 4000 B LED с камерой Leica DFC 7000 T.

Результаты экспериментов и их обсуждение

Предоставлены результаты рентгенофазового анализа контрольной мембраны и мембраны с покрытием (рис. 2). Продемонстрировано, что в спектре исходной мембраны обнаружены характерные рефлексы кристаллического Ti (PDF № 44-1294). При этом в случае покрытия регистрируется также (101) и (112) рефлекс TiO_2 , соответствующий анатазу (PDF № 21-1272) тетрагональной сингонии. В этом случае не обнаружено никаких кальцийсодержащих фаз в покрытии. С другой стороны, небольшое наличие атомов кальция, а также фосфора, импрегнированных в покрытие, было подтверждено с помощью рентгенофлуоресценции. Наличие слабых линий железа обусловлено влиянием подложки, а также техпроцесса их подготовки. На рисунке 3 изображен соответствующий спектр, полученный с поверхности мембраны.

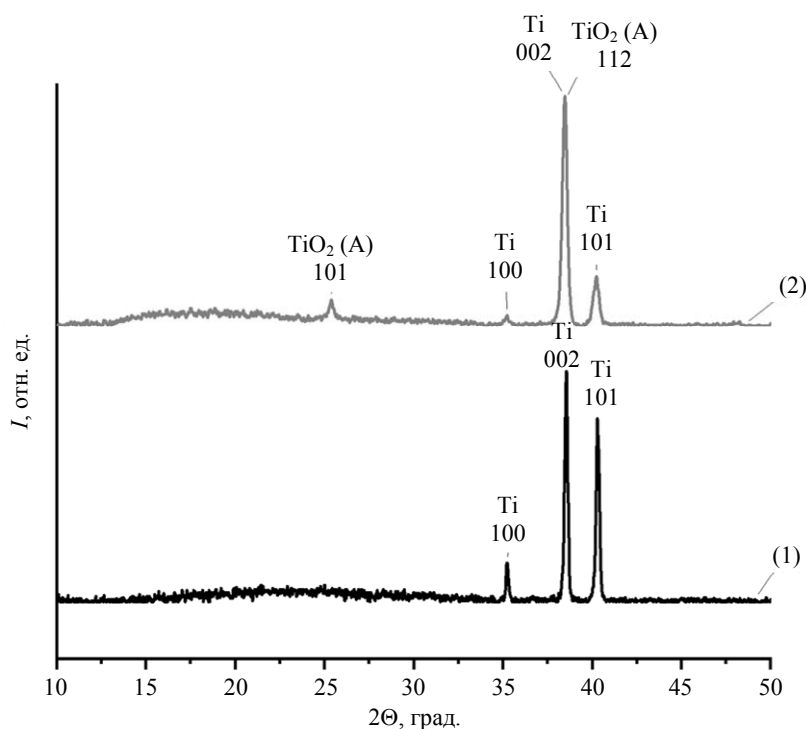


Рис. 2. Рентгеновская дифрактограмма: контроль (1) и опыт (2), с указанием основных рефлексов Ti и TiO_2 (A) – анатаза (анализирующее излучение $\text{CuK}\alpha$)

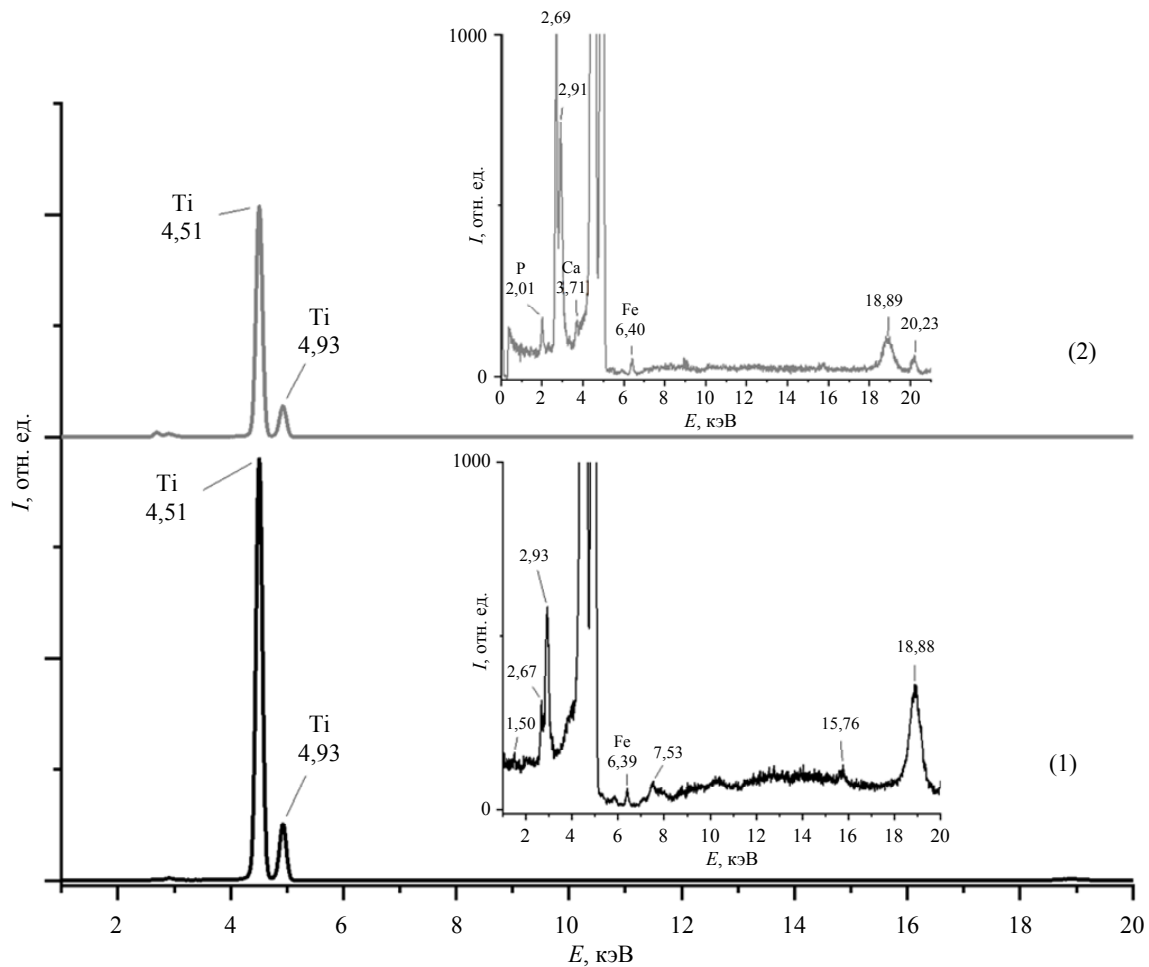


Рис. 3. Рентгенофлуоресцентный спектр: контроль (1) и опыт (2)

Полученные образцы покрытий не содержат зарегистрированных цитотоксических компонент. При этом как было показано ранее, кристаллический анатаз может стимулировать нуклеацию биологического апатита и костную регенерацию в области дефекта. Как показал анализ дифрактограммы, полученное оксидное покрытие характеризуется размером кристаллитов z , который приближенно можно оценить по уравнению Шеррера [9] как

$$z \approx \frac{0,9\lambda}{\beta_{101} \cos \theta_{101}},$$

где β_{101} – полная ширина рефлекса (101) на полувысоте и θ_{101} – угловая координата рефлекса (101). В исследованном случае $z \approx 92$ нм.

Проведенные исследования аутопсийного препарата с помощью микро-КТ позволили установить особенности тканей вокруг имплантированной структуры в зависимости от

наличия или отсутствия покрытия на них. Обнаружено, что через три месяца после имплантации положение контрольного имплантата осталось без изменений. Относительно массивный регенерат по переднему краю дефекта структурировался, обладает плотностью кортикальной кости, утончен к трепанационному отверстию, но значительного сокращения площади дефекта не произошло. С противоположной стороны костный край структурировался в месте контакта с имплантатом. Других рентгенопозитивных маркеров не обнаружено. В случае мембраны с покрытием относительно массивный регенерат по переднему краю дефекта структурировался, обладает плотностью кортикальной кости, утончен к трепанационному отверстию, но значительного сокращения площади дефекта не произошло. С противоположной стороны костный край утолщился в месте контакта с имплантатом, предположительно по естественным регенераторным процессам. Участки уплотнения окружающей ткани сократились и расположе-

ны в основном на наружной стороне имплантата. Для иллюстрации (рис. 4) предоставлены трехмерная реконструкция черепа крысы с имплантированной мембраной с покрытием и двумерная рентгенологическая картина в области контакта мембраны с костью. В целом, полученная микро КТ картина демонстрировала отсутствие воспаления, а также каких-либо следов бактериального поражения.

Проведенные гистологические исследования позволили уточнить некоторые особенности биологических реакций на интерфейсе «кость/имплант» и оценить степень интегративных процессов. В контрольной группе на месте удаленной сетки были видны остатки соединительнотканной капсулы и фрагменты мозговой оболочки (с остатками шовного материала, как показано на рис. 5). Капсула была плотной структуры и состояла из продольно расположенных коллагеновых волокон и редких фибробластов между ними с минимальным количеством сосудов и незначительной лимфо-макрофагальной инфильтрацией. Во внутреннем слое капсулы сохранялся тонкий макрофагальный слой, что могло свидетель-

ствовать о меньшей зрелости капсулы. Краевые участки кости на границе дефекта регенерировали, в этих участках выявлялась молодая кость с большим количеством остеоцитов. На границе с молодой костью наблюдались дистрофия и перестройка старой кости. В опытной группе (рис. 5) на месте удаленной сетки также были видны остатки соединительнотканной капсулы и фрагменты мозговой оболочки (с остатками шовного материала). Капсула была значительно тоньше по сравнению с контролем и имела более зрелую структуру без внутреннего макрофагального слоя. Она состояла из продольно и плотно расположенных коллагеновых волокон с единичными фибробластами между ними, с минимальной васкуляризацией и лимфо-макрофагальной инфильтрацией. Зоны костной регенерации по краям дефекта были большего размера, чем в контроле, и формирующаяся молодая кость была более зрелой с формированием в некоторых участках Гаверсовой системы. На границе с молодой костью отмечались незначительная дистрофия и перестройка старой кости.

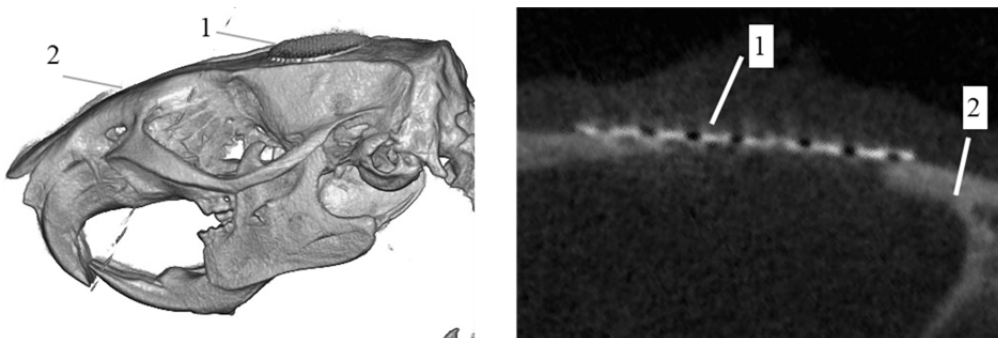


Рис. 4. Слева – трехмерная реконструкция черепа крысы с имплантированной мембраной (1) с покрытием в череп крысы (2). Правее – двумерная рентгенологическая картина области контакта мембраны (1) и черепа (2)

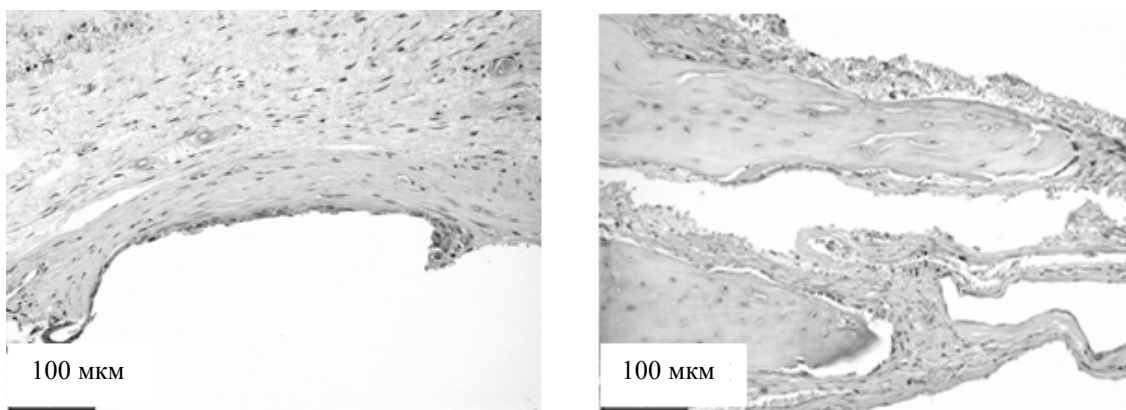


Рис. 5. Гистологическая картина тканей вблизи импланта: контроль (слева) и опыт (справа)

Таким образом, нанесенное покрытие стимулировало эффективность интеграции мембраны в костную ткань на сроке 3 месяца. Отметим, что полученные данные лежат в фарватере передовых исследований [10] современного медицинского материаловедения и подтверждают актуальность и перспективность применения МДО для нанесения биокерамических покрытий, которые стимулируют формирование прочной функциональной связи между имплантом и организмом. Проведенные ранее исследования касаются, в основном, дентальных винтовых имплантов [11]. Поэтому полученные данные имеют новизну в части расширения номенклатуры медицинских изделий и понимания способов повышения эффективности их интеграции.

Заключение

Современные тенденции развития медицинского материаловедения требуют создания перспективных имплантов, поверхность которых может быть модифицирована путём нанесения специальных покрытий, например, неорганических оксидных слоёв на титановых хирургических протезах. МДО процедура (или плазменная электролитическая обработка) позволяет получать покрытия на основе биоактивной фазы оксида титана – анатаза. В настоящем исследовании мы использовали МДО в сложном электролите, содержащем мелкодисперсный ГАП. С помощью рентгенофазового анализа и рентгеновской флуоресценции показано, что обнаруживаются рефлексы анатаза. При этом атомы кальция и фосфора в некотором количестве оказались импрегнированы в покрытие.

С использованием микро-КТ и гистологических исследований, которые были проведены с применением модели имплантации в дефект черепа крыс линии Вистар, было про-

демонстрировано, что нанесенные покрытия стимулировали образование костного регенерата на поверхности импланта. При этом структура регенерата была более зрелая, чем в случае контрольных мембран без покрытия. В целом, полученные данные позволяют рассматривать реализованную стратегию как перспективную для материаловедения и медицинской практики.

Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 20-79-10190
<https://rscf.ru/project/23-79-50005/>

ЛИТЕРАТУРА

1. Aprile P., Letourneur D. et al. / Adv. Healthcare Mater. 2020. Vol. 9. P. 2000707. doi: 10.1002/adhm.202000707.
2. Skriabin A. S., Shakurov A. V. et al. / ACS Omega. 2022. Vol. 7. P. 47880–47891. doi: 10.1021/acsomega.2c05718.
3. Khor K. A., Cheang P. / J. Mater. Process. Technol. 1997. Vol. 63. P. 271–276. doi: 10.1016/S0924-0136(96)02634-9.
4. Skryabin A. S., Tsygankov P. A. et al. / Inorg. Mater. 2022. Vol. 58. P. 71–77. doi: 10.1134/S0020168522010113.
5. Kasuga T., Kondo H., Nogami M. / J. Cryst. Growth. 2002. Vol. 1-4. P. 235–240. doi: 10.1016/S0022-0248(01)01782-1.
6. Легостаева Е. В. Закономерности формирования структуры и свойств кальцийфосфатных покрытий на поверхности биоинертных сплавов титана и ниобия: Дисс. д-ра физ.-мат. наук. – Томск: ТПУ, 2014.
7. Traini T., Murmura G., et al. / Coatings. 2018. Vol. 8. P. 252. doi: 10.3390/coatings8070252.
8. ICDD PDF2. <https://www.icdd.com/pdf-2/>.
9. Reyes-Gasga J., Martínez-Piñero E. L. et al. / Mater. Sci. Eng.: C. 2013. Vol. 33. P. 4568–4574. doi: 10.1016/j.msec.2013.07.014.
10. Xie Y., Li S. et al. / Int. J. Oral Sci. 2020. Vol. 12. P. 37. doi: 10.1038/s41368-020-00107-z.
11. Li X., Xu H. et al. / Int. J. Oral Sci. 2018. Vol. 10. P. 11. doi: 10.1038/s41368-018-0008-z.

Preparation of calcium-containing oxide coatings on titanium membranes for maxillofacial surgery and dentistry

A. S. Skriabin¹, V. R. Vesnin¹, A. V. Shakurov¹, E. S. Skriabina¹, Yu. S. Lukina^{1,2},
L. L. Bionyshev-Abramov² and N. B. Serejnikova³

¹ Bauman Moscow State Technical University
5/1 2^{ya} Baumanskaya st., Moscow, 105005, Russia
E-mail: terra107@yandex.ru

² Priorov Central Institute for Trauma and Orthopedics
10 Priorova st., Moscow, 127299, Russia

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University Institute of Regenerative Medicine
8 Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russia

Received 8.04.2024; revised 22.04.2024; accepted 14.05.2024

Titanium membranes are widely used in dentistry and oral surgery for prosthetic applications. Currently, there is a need to stimulate the efficiency of their integration into the bone. The paper presents results on the study of microarc oxidation with the addition of calcium phosphates. The coating samples were characterized with X-ray phase analysis and X-ray fluorescence. In vivo assessment of the effectiveness of integration was carried out with laboratory Wistar rats, as well as by microcomputed tomography and histology. As a result, it was demonstrated that the treatment used had a positive effect compared to untreated membranes, which was expressed in stimulating the formation of bone regenerate from the edges of the defect with an almost complete absence of inflammation.

Keywords: microarc oxidation, anatase, biocompatibility, *in vivo* testing.

REFERENCES

1. Aprile P., Letourneur D. et al., *Adv. Healthcare Mater.* **9**, 2000707 (2020). doi: 10.1002/adhm.202000707.
2. Skriabin A. S., Shakurov A. V. et al., *ACS Omega* **7**, 47880–47891 (2022). doi: 10.1021/acsomega.2c05718.
3. Khor K. A. and Cheang P., *J. Mater. Process. Technol.* **63**, 271–276 (1997). doi: 10.1016/S0924-0136(96)02634-9.
4. Skryabin A. S., Tsygankov P. A. et al., *Inorg. Mater.* **58**, 71–77 (2022). doi: 10.1134/S0020168522010113.
5. Kasuga T., Kondo H. and Nogami M., *J. Cryst. Growth* **1-4**, 235–240 (2002). doi: 10.1016/S0022-0248(01)01782-1.
6. Legostaeva E. V. Features of formation of the structure and properties of calcium phosphate coatings on the surface of bioinert titanium and niobium alloys: Diss. Doctor of Physical and Mathematical Science. Tomsk, TPU, 2014 [in Russian].
7. Traini T., Murmura G. et al., *Coatings* **8**, 252 (2018). doi: 10.3390/coatings8070252.
8. ICDD PDF2. <https://www.icdd.com/pdf-2/>.
9. Reyes-Gasga J., Martínez-Piñeiro E. L. et al., *Mater. Sci. Eng.: C* **33**, 4568–4574 (2013). doi: 10.1016/j.msec.2013.07.014.
10. Xie Y., Li S. et al., *Int. J. Oral Sci.* **12**, 37 (2020). doi: 10.1038/s41368-020-00107-z.
11. Li X., Xu H. et al., *Int. J. Oral Sci.* **10**, 11 (2018). doi: 10.1038/s41368-018-0008-z.