

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
профессионального образования

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

«МОСКОВСКИЙ ИНСТИТУТ СТАЛИ И СПЛАВОВ»

На правах рукописи

Сухорукова Ирина Викторовна

**СОЗДАНИЕ БИОАКТИВНЫХ ПОКРЫТИЙ TiCaP/CON/Ag , АУГМЕНТИН) С
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЭФФЕКТОМ**

Специальность 05.16.06 - Порошковая металлургия и композиционные материалы

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:

Доктор физико-математических наук, профессор

Д.В. Штанский

Москва 2015

Содержание

Введение.....	
Глава 1. Аналитический обзор литературы.....	
1.1 Влияние характеристик поверхности имплантата на его биологические свойства.....	
1.1.1 Влияние химического состава поверхности.....	
1.1.2 Роль шероховатости и топографии поверхности имплантата.....	
1.2 Методы и подходы к получению материалов с антибактериальной активностью.....	
1.2.1 Антиадгезивные материалы.....	
1.2.2 Фотоиндуцированные материалы.....	
1.2.3 Материалы с развитым рельефом поверхности для локальной доставки лекарственных препаратов.....	
1.2.4 Металлические материалы с антибактериальным эффектом.....	
1.3 Серебросодержащие покрытия, обладающие антибактериальной активностью.....	
1.3.1 Методы получения серебросодержащих покрытий.....	
1.3.2 Влияние серебра на структуру, механические и трибологические свойства покрытий.....	
1.3.3 Факторы, определяющие антибактериальную активность и биоактивность серебросодержащих материалов.....	
1.3.4 Постановка задачи исследования.....	
Глава 2. Методы получения и исследования свойств материалов.....	
2.1. Материалы подложек и их подготовка.....	
2.2. Получение покрытий в системе TiCaPCON-Ag.....	
2.3. Получение титановых покрытий с ячеистой структурой методом селективного лазерного спекания.....	
2.4 Получение покрытий с развитым рельефом поверхности.....	
2.5. Методы изучения состава и структуры покрытий.....	
2.6 Методы изучения физико-механических и трибологических свойств покрытий.....	
2.7 Методика проведения циклических, ударно-динамических испытаний.....	
2.8 Методика электрохимических испытаний покрытий.....	
2.9 Методика изучения смачиваемости поверхности покрытий.....	
2.10 Методика изучения кинетики выхода ионов серебра с поверхности покрытий в физиологический раствор	
2.11 Методика насыщения поверхности покрытий Ti/TiCaPCON Аугментином.....	
2.12 Методика исследования биоактивности покрытий в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма.....	
2.13 Подготовка образцов для биологических испытаний.....	

Глава 3. Разработка покрытий TiCaPCON-Ag.....	
3.1 Оптимизация технологических параметров осаждения покрытий.....	
3.2. Исследование влияния серебра на состав и структуру покрытий.....	
3.3 Исследования влияния серебра на трибо-механические свойства покрытий.....	
3.4 Исследования влияния серебра на электрохимические свойства покрытий.....	
3.5 Исследование смачиваемости поверхности покрытий TiCaPCON-Ag	
3.6 Исследование биоактивности покрытий TiCaPCON-Ag в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма.....	
Глава 4. Кинетика выхода бактерицидного компонента.....	
4.1 Исследование влияния элементного состава поверхности на кинетику выхода серебра.....	
4.2 Исследование влияния шероховатости поверхности на кинетику выхода серебра.....	
4.3 Исследование влияния наночастиц серебра на кинетику выхода серебра.....	
Глава 5. Разработка гибридных покрытий Ti/TiCaPCON/Аугментин.....	
5.1. Оптимизация технологических параметров формирования покрытий с ячеистой структурой поверхности.....	
5.2. Исследование топографии поверхности покрытий.....	
5.3. Оценка распределения Аугментина по поверхности покрытий.....	
Глава 6. Биологические испытания.....	
6.1. Антибактериальные свойства покрытий.....	
6.1.1 Методика исследования антибактериальных свойств.....	
6.1.2 Покрытия TiCaPCON-Ag.....	
6.1.3 Гибридные покрытия Ti/TiCaPCON/Аугментин.....	
6.2. Биосовместимость и биоактивность покрытий.....	
6.2.1 Методика исследования биосовместимости.....	
6.2.2 Результаты исследования биосовместимости.....	
6.2.3 Методика исследования биоактивности.....	
6.2.4 Результаты исследования биоактивности.....	
Общие выводы по работе.....	
Список использованных источников.....	
Приложение А. Акт испытаний бактериостатического эффекта имплантатов с покрытием TiCaPCON-Ag.....	
Приложение Б. Акт испытаний биосовместимости и биоактивности имплантатов с покрытием TiCaPCON-Ag.....	
Приложение В. Акт испытаний бактериостатического эффекта имплантатов с покрытием Ti/TiCaPCON/Аугментин.....	
Приложение Г. Акт испытаний биоактивности имплантатов с покрытием Ti/TiCaPCON/ Аугментин.....	
Приложение Д. Лабораторный регламент на процесс получения	

покрытий методами селективного лазерного спекания, газодинамического напыления, электроискрового легирования и магнетронного распыления, наноструктурированных биосовместимых покрытий с заданным составом, топографией и пористостью для модификации костных имплантатов.....

Приложение Е. Лабораторный регламент на процесс получения экспериментальных образцов имплантатов с покрытием, описывающий технологические режимы нанесения биоактивных и биосовместимых наноструктурных покрытий TiCaPCON/Ag на титановые имплантаты....

Введение

Возникновение бактериальной инфекции при оперативном хирургическом вмешательстве, связанном с установкой имплантата, остается актуальной проблемой современной медицины. Проблема заключается в том, что в результате адгезии бактерий и грибковых микроорганизмов на поверхности имплантата образуется плотная биопленка, устойчивая к действию ультрафиолетового излучения и лекарственных препаратов.

Одним из способов придания поверхности имплантата антибактериальных характеристик, является введение антибиотиков в созданный на его поверхности рельеф. Данные материалы способны оказывать сильный антибактериальный эффект, который, однако, ограничен несколькими часами, что связано с быстрым высвобождением лекарственного препарата. Альтернативой использования антибиотиков является введение в поверхность имплантата серебра, используемого в качестве антибактериального агента в различных медицинских изделиях. Несмотря на большое количество исследований серебросодержащих материалов, до сих пор не определена оптимальная концентрация серебра, обеспечивающая высокий антибактериальный эффект при сохранении биосовместимых характеристик. Анализ литературных данных показывает, что бактерицидные свойства подобных материалов зависят не только от концентрации серебра, но и от состояния, в котором оно присутствует в материале (металлическая или оксидная фаза, твердый раствор, частицы или кластеры), а также от природы окружающей матрицы. Использование материалов с высоким содержанием серебра, заведомо обладающих сильной антибактериальной активностью, ограничено возможным токсическим действием ионов серебра на здоровые клетки организма.

Таким образом, актуальность работы определяется необходимостью разработки новых составов покрытий с высоким уровнем антибактериальной активности при сохранении биосовместимости и биоактивности для повышения надежности и долговечности работы имплантата за счет уменьшения риска

бактериального инфицирования. В данной работе в качестве основы выбрано покрытие состава TiCaPCON, которое характеризуется комплексом химических, механических, трибологических и биологических свойств, необходимым для имплантатов, работающих под нагрузкой и рекомендовано для использования на территории РФ. Для придания ему антибактериальных характеристик было использовано два подхода. В первом случае серебро в количестве 0,4-4% вводилось в состав наноструктурного биоактивного покрытия TiCaPCON. Во втором случае покрытие TiCaPCON было нанесено на подложку с ячеистой структурой поверхности и впоследствии заполнено антибиотиком. Актуальность работы подтверждается тем, что работа выполнялась в соответствии с тематическими планами университета на НИР по следующим проектам:

1. Государственный контракт № 16.513.11.3092 от «10» мая 2011 г. по теме «Разработка экспериментальных образцов наноструктурированных биосовместимых покрытий с контролируемой топографией, пористостью и составом поверхности на основе металлических и металлокерамических материалов для создания костных имплантатов» в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы».
2. Грант РФФИ №13-03-12081 от 1 января 2014 г по теме «Разработка нового поколения биоактивных градиентных материалов с контролируемой шероховатостью поверхности и наноструктурированным антибактериальным покрытием для металлических трехмерных био-конструкций, полученных по технологии быстрого прототипирования».
3. Проект № K2-2014-012 «Разработка перспективных функциональных неорганических материалов и покрытий» с участием ведущих ученых» в рамках программы повышения конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров исследований.

4. Соглашение о субсидии №14.578.21.0086 от «24» ноября 2014 г. по теме «Создание имплантируемых трехмерных биоконструкций из титановых сплавов с развитым рельефом поверхности и биоактивным наноструктурным покрытием с антибактериальным эффектом», выполняемому в рамках реализации федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы».

ЦЕЛЬ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ:

Создание биоактивных наноструктурированных покрытий с антибактериальным эффектом для костных имплантатов за счет обеспечения контролируемого выхода бактерицидного компонента.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

- разработать методы введения бактерицидного агента (Ag) в состав покрытий TiCaPCON с целью придания им антибактериальных характеристик при сохранении биосовместимости и биоактивности;
- установить связь между технологическими параметрами осаждения покрытий TiCaPCON-Ag, содержанием и распределением Ag, а также фазовым составом, морфологией и топографией поверхности покрытий;
- исследовать закономерности влияния параметров селективного лазерного спекания на формирование ячеистой структуры на поверхности титанового имплантата и оценка эффективности насыщения антибиотиком;
- изучить физические, механические, трибологические и электрохимические свойства покрытий TiCaPCON-Ag;
- исследовать кинетику выхода бактерицидного агента в зависимости от содержания серебра в покрытии, их морфологии и шероховатости поверхности;
- провести биологические испытания покрытий, включая оценку антибактериальной активности, биосовместимости и биоактивности.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА:

1. Разработаны нанокompозиционные биоактивные покрытия TiCaPCON-Ag и установлена оптимальная концентрация Ag в покрытии и важная роль наночастиц Ag на их поверхности в обеспечении длительного антибактериального эффекта.
2. Получены гибридные биоактивные покрытия Ti/TiCaPCON с ячеистой структурой поверхности, обеспечивающей высокую эффективность насыщения поверхности антибиотиком.
3. Установлено влияние различных структурных факторов (содержание серебра, шероховатость поверхности и наличие наночастиц Ag на поверхности покрытия) на кинетику выхода серебра в физиологический раствор. Показано, что с ростом концентрации серебра и удельной площади поверхности покрытия увеличивается скорость выхода ионов серебра.
4. Методами СЭМ, РФА, ИК обнаружено образование сплошного слоя апатита при выдержке покрытий TiCaPCON-Ag в физиологическом растворе в течение 14-28 суток, что свидетельствует об их высокой биоактивности.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ:

Практическая значимость

1. Разработан лабораторный регламент на процесс получения методами селективного лазерного спекания, газодинамического напыления, электроискрового легирования и магнетронного распыления, наноструктурированных биосовместимых покрытий с заданным составом, топографией и пористостью для модификации костных имплантатов.
2. Разработан лабораторный регламент на процесс получения экспериментальных образцов имплантатов с покрытием, описывающий технологические режимы нанесения биоактивных и биосовместимых наноструктурных покрытий TiCaPCON/Ag на титановые имплантаты.
3. В депозитарии НИТУ «МИСиС» под № 11-164-2012 ОИС от 16 апреля 2012 г. зарегистрировано ноу-хау «Процесс получения металлокерамических материалов

с контролируемыми топографией, открытой пористостью и составом поверхности».

4. Получен патент РФ №2524654 от 21.06.2013 «Многокомпонентное биоактивное наноконпозиционное покрытие с антибактериальным эффектом».

5. В Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» проведены биологические испытания титановых имплантатов с покрытием TiCaPCON-Ag. Показано, что имплантаты с покрытием TiCaPCON-Ag обладают 100% антибактериальным эффектом в отношении E.coli.

6. В Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» проведены биологические испытания титановых имплантатов с покрытием TiCaPCON-Ag. Показано, что покрытия обладают высоким уровнем биосовместимости и биоактивности.

НА ЗАЩИТУ ВЫНОСЯТСЯ:

1. Установленные закономерности влияния содержания серебра на структуру, физико-механические и электрохимические свойства покрытий TiCaPCON-Ag;
2. Установленные зависимости кинетики выхода серебра от его содержания в покрытии, наличия или отсутствия наночастиц Ag на поверхности, а также шероховатости поверхности подложки.
3. Закономерности формирования ячеистой структуры поверхности титанового имплантата методом селективного лазерного спекания;
4. Зависимость биологических характеристик покрытий (антибактериальная активность, биосовместимость, биоактивность) от состава, структуры и содержания бактерицидного компонента (серебра или Аугментина).

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ:

Основные положения и результаты работы докладывались на следующих конференциях:

Международная магистерская школа «Тонкие пленки», Севилья, 2012; Международная конференция «Технологии модификации поверхности», Лион, 20-22 июня 2012; 3 Мировой конгресс «Тканевая инженерия и регенеративная медицина», Вена, 5-8 сентября, 2012; 13-ая международная конференция по плазменным технологиям и инженерии поверхности (Гармиш-Партенкирхен, Германия, 10 – 14 сентября, 2012); 9 Конференция «Нанотехнологии в онкологии», 17 декабря 2011, Москва, Россия; 10 Конференция «Нанотехнологии в онкологии», 15 декабря 2012, Москва, Россия; 25 Европейская конференция по биоматериалам, Мадрид, Испания, 8-12 сентября 2013; V Всероссийская конференция по наноматериалам «НАНО 2013».(Звенигород, Россия, 23 – 27 сентября 2013 г); Bioceramics 25, November 07-10, 2013, Bucharest, Romania; E-COST Meeting, Patras, Greece, 2013; Биоматериалы в медицине, декабрь 2013, Москва, Россия; Конференция Европейского сообщества по биоматериалам, Ливерпуль, Великобритания, 31 августа-3 сентября 2014; бая Международная конференция «Кристаллофизика и деформационное поведение перспективных материалов» " 26 - 28 мая 2015 г., НИТУ «МИСиС», Москва; Конференция «ФНМ», Октябрь 6-10, 2014, г. Суздаль; XXV Российская конференция по электронной микроскопии, июнь 2-7, 2014, Дом ученых, Черноголовка; Конференция «ECNF 3 & Al-Nanofunc», 7-11 июля 2014, Севилья, Испания; Конференция «ICMSTF 2014», Сан-Диего, США, 28 апреля – 2 мая, 2014; Конференция «SIMTEC», Монтекатини, Италия. 8-13 июня 2014; 13 Международный симпозиум по многофункциональным и функционально-градиентным материалам, Сан-паулу, Бразилия, 19-22 октября 2014; IX Международная конференция по неравновесным процессам в соплах и струях. NPNJ'2012, 25-31 мая, 2012, Алушта, Крым, Украина,

Опубликованные монографии по теме диссертации:

1. Д.В. Штанский, Е.А. Левашов, И.В. Батенина. Глава 12 «Многокомпонентные биоактивные наноструктурированные покрытия». **«Нanomатериалы: свойства и перспективные приложения»**, Издательство: "Научный мир", 2014, стр. 355-383.
2. D.V. Shtansky, E.A. Levashov, I.V. Sukhorukova. Chapter 8. Multifunctional bioactive nanostructured films. **Hydroxyapatite (HAP) for biomedical applications**, Ed.: M.R. Mucalo, Woodhead Publishing, 2015, 404 p. pp. 159-188.

Публикации по теме диссертации:

1. D.V. Shtansky, I.V. Batenina, I.A. Yadroitcev, N.S. Ryashin, F.V. Kiryukhantsev-Korneev, A.E. Kudryashov, A.N. Sheveyko, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova, I.Y. Smurov, E.A. Levashov. A new combined approach to metal-ceramic implants with controllable surface topography, chemistry, blind porosity, and wettability. **Surface and Coatings Technology**, 208 (2012) 14-23 (IF=2,199)
2. D.V. Shtansky, I.V. Batenina, I.A. Yadroitcev, N.S. Ryashin, F.V. Kiryukhantsev-Korneev, A.E. Kudryashov, A.N. Sheveyko, N.A. Gloushankova, I.Y. Smurov, E.A. Levashov. Fabrication of the functionally graded metal-ceramic materials with controlled surface topography, chemistry, and wettability for bone substitution. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 6 (Suppl. 1) (2012) 236 (IF=2,826)
3. Dmitry V. Shtansky, Evgeny A. Levashov, Irina V. Batenina, Natalia A. Gloushankova Natalia Y. Anisimova, Mikhail V. Kiselevsky, and Igor V. Reshetov. Recent progress in the field of multicomponent bioactive nanostructured films, **RCS Advances**, 2013, 3, 11107-11115 (IF=3,84)
4. D.V. Shtansky, I.V. Batenina, F.V. Kiryukhantsev-Korneev, A.N. Sheveyko, K.A. Kuptsov, N.Y. Anisimova, I. Zhitnyak, N.A. Gloushankova. Ag- and Cu-

- doped multifunctional bioactive nanostructured TiCaPCON films. **Applied Surface Science** 285P (2013) 331-343 (IF=2,538)
5. Dmitry V. Shtansky, Evgeny A. Levashov, Irina V. Batenina, Natalia A. Gloushankova, Natalia Y. Anisimova, Mikhail V. Kiselewski, and Igor V. Reshetov. Recent Progress in the Field of Multicomponent Biocompatible Nanostructured Films. **Key Engineering Materials** Vol. 587 (2014) pp 263-268 (IF=0,19)
 6. I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev, N.Yu. Anisimova, N.A. Gloushankova, I.V. Zhitnyak, J. Benesova, E. Amler, D.V. Shtansky. Two approaches to form antibacterial surface: doping with bactericidal element vs drug loading. **Applied Surface Science**, 330 (2015) 339-350 (IF=2,538)
 7. А.Н. Шевейко, И.В. Сухорукова, Ф.В. Кирюханцев-Корнеев, Д. В. Штанский. Сравнительные исследования структуры и химических свойств нанокomпозиционных покрытий TiCaPCON-Ag. **Физикохимия поверхности и защита материалов**, 2015, том 51, № 3, с. 416-426 (IF=0,638)
 8. I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova, E.A. Denisenko, S. Yu. Filipovich, S.G. Ignatov, D.V. Shtansky. Towards bioactive yet antibacterial surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 135 (2015) 158-165 (IF=4,287)
 9. И.В. Сухорукова, А.Н. Шевейко, Д.В. Штанский. Влияние состава и шероховатости поверхности покрытий TiCaPCON-Ag на кинетику выхода Ag в физиологический раствор. **Известия вузов. Порошковая металлургия и функциональные покрытия**, 2015 (IF=0,304)
 10. I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev, D.V. Shtansky. Ag ion release kinetics depending on surface chemistry and roughness. **Advanced Biomaterials and Devices in Medicine**, 1 (2015) 37-43

Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, общих выводов, списка использованных источников и 6 приложений. Диссертация имеет объем 144 страницы, включая 18 таблиц, 53 рисунка, список использованных источников из 216 наименований.

Глава 1. Аналитический обзор литературы

1. Влияние параметров поверхности имплантата на его биологические свойства

1.1 Влияние химического состава поверхности

Несмотря на значительный прогресс в области разработки новых видов биоматериалов для замены поврежденных участков костной ткани, сохраняется проблема снижения негативных последствий хирургического вмешательства, улучшения качества и увеличения срока службы имплантатов. Например, титан и его сплавы на протяжении многих лет известны как одни из лучших материалов для изготовления имплантатов, работающих под нагрузкой, что объясняется их высокой прочностью в сочетании с превосходными пластическими характеристиками, а также высокой химической стабильностью и хорошей биосовместимостью [1]. Поэтому в рамках настоящей работы в качестве материала основы имплантата будет использован титан. Однако титановые сплавы демонстрируют недостаточно высокую износостойкость и устойчивость к коррозии, обладают высоким коэффициентом трения и низкой биоактивностью, что свидетельствует о необходимости дополнительного модифицирования их поверхности. Кроме того, интенсивное истирание металлического имплантата и попадание ионов металлов в среду организма может приводить как к ослаблению фиксации имплантата, так и возникновению токсической реакции.

Эффективным способом улучшения поверхностных свойств объемных биоматериалов и стимулирования взаимодействия между поверхностью имплантата и окружающей костной тканью является нанесение multifunctional биосовместимых покрытий (далее покрытий). Керамические материалы на основе гидроксиапатита (ГАП), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ и фосфата кальция (ФК) широко используются в качестве биоактивной границы раздела между поверхностью металлического имплантата и окружающей тканью благодаря их близкому сходству с органическими и минеральными компонентами

зубной и костной тканей. Однако в чистом виде данные вещества не могут использоваться в качестве функциональных покрытий на поверхности имплантатов, работающих под нагрузкой, вследствие их низких механических свойств [2]. Для улучшения механических свойств ГАП и ФК легируют дополнительными элементами, например, Ti [3-4], Si [5-6], и Mg [7]. Эти легирующие элементы могут оказывать положительный эффект как на механические свойства покрытия (адгезионную прочность (Ti) или вязкость (Mg)), так и на биологические характеристики материала (Si)). Другим перспективным применением материалов на основе ФК является получение композиционных покрытий, состоящих из CaP основы и биodeградируемой полимерной связки [8-10]. Эти композиционные биodeградируемые материалы имеют ряд преимуществ по сравнению с чистым CaP, обусловленных присутствием биоактивной компоненты с рН-стабилизирующим эффектом, что препятствует разрушению окружающей костной ткани [9].

Плазменные методы получения покрытий на основе ФК недавно рассматривались в обзоре Р.А. Сурmeneва [11]. В работе показано, что различные плазменные методы, например, плазменное распыление, радиочастотное магнетронное распыление, импульсное лазерное напыление и напыление при ассистировании ионным лучом активно используются для нанесения плотных гомогенных беспористых биосовместимых покрытий с высокой адгезией к подложке. Сочетание методов осаждения и дополнительной ионной имплантации в плазме является еще одним эффективным способом получения биоактивных поверхностей [12-14].

Возможности ионно-плазменной технологии могут быть существенно расширены посредством использования композиционных мишеней, получаемых методом самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) [15]. СВС-технология позволяет получать широкий спектр мишеней на основе керамик, металлокерамик и интерметаллидов [16]. СВС является альтернативой известным методам порошковой металлургии (таких как горячее прессование, горячая экструзия, горячее изостатическое прессование и т.д.) и обеспечивает

получение высокоплотной однородной структуры, обладающей механическими, термическими и электрическими свойствами, необходимыми для использования данных видов материалов в технологии физического осаждения из паровой фазы (PVD) [17]. С использованием одиночной композиционной СВС-мишени возможно осаждение различных видов многокомпонентных покрытий (к настоящему времени - до 6 элементов), что существенно упрощает конструкцию установки и схему напыления. При магнетронном распылении композиционных мишеней реализуется одновременный перенос материала мишени-катода (атомов и ионов элементов, входящих в состав мишени) на подложку, что особенно важно для получения покрытий, в состав которых входит большое количество металлических (Ca, Ti, Ta, Zr) и неметаллических (C, N, O, Si, P) элементов [18].

За последние 10 лет для напыления покрытий были разработаны и синтезированы композиционные мишени различных составов на основе TiC и (Ti,Ta)C [19-20]. Изменение типа и количества различных неорганических добавок в составе композиционных мишеней на основе TiC и (Ti,Ta)C позволило улучшить биологические характеристики покрытий без ухудшения их механических и трибологических свойств. С целью увеличения прочности и термостойкости (термической стойкости к циклическому нагреву в ходе высокоэнергетического магнетронного распыления) мишеней также были разработаны функционально-градиентные материалы.

Для получения покрытий использовались различные составы композиционных мишеней с добавками CaO, ZrO₂, TiO₂, Ca₃(PO₄)₂, и ГА (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) [20-24]. Покрытия обладали комплексом механических и трибологических свойств, превосходящим как объемные материалы на основе Ti, Ni и Co сплавов, широко используемых в ортопедии и стоматологии, так и свойства бинарных покрытий TiC и TiN, TiO₂. Покрытия характеризуются высокой твердостью в сочетании с высокой величиной упругого восстановления и относительно низким модулем Юнга. Преимущества пониженной величины модуля упругости для имплантатов хорошо известны: (i) лучшая передача кости динамической нагрузки и (ii) уменьшение величины напряжений на границе

раздела покрытие-подложка. Покрытия также характеризуются высокими величинами сопротивления упругой и пластической деформации, что является хорошими индикаторами долговечности и износостойкости покрытий [25]. Среди других улучшенных механических характеристик покрытий можно отметить высокий предел усталостной прочности, высокую адгезионную прочность и превосходную стойкость к циклическим, ударно-динамическим нагрузкам. Кроме того, покрытия обладают гидрофильными свойствами, имеют отрицательный заряд поверхности при кислотности среды pH 5-8,5 и положительные значения потенциала свободной коррозии при низкой плотности тока в различных биологических жидких средах. Также следует отметить, что в случае легирования покрытий TiCON кальцием и фосфором, пролиферация остеобластов MC3T3-E1 была статистически более высокой, чем для контрольных образцов [21]. Кроме того, остеобласты MC3T3-E1, культивировавшиеся на поверхности пленок TiCaCON, продемонстрировали в два раза более высокую активность щелочной фосфатазы по сравнению с контрольным образцом, что свидетельствует о биоактивных характеристиках поверхности покрытий. Биологические испытания показали наличие ранних признаков образования костной ткани на поверхности титановых имплантатов с покрытиями. Биосовместимость покрытий также была подтверждена в биологических тестах на более крупных животных (кроликах и свиньях) [26]. Одной из задач данной работы было придание нового качества покрытию состава TiCaPCON – антибактериальной активности.

1.2 Роль шероховатости и топографии поверхности имплантата

Различные виды поверхностной обработки оказывают влияние не только на химический состав, но и топографию поверхности. Например, ионное травление поверхности полимера (ПТФЭ) ионами аргона приводит к образованию структуры типа «цветная капуста» с размером трехмерных островков 2-3 мкм, в то время как ИИ приводит к формированию более развитой структуры поверхности с размером структурных элементов 2-20 мкм и высокой открытой

пористостью с размерами пор 8-10 мкм [27]. В результате обработки поверхности ПТФЭ ионами титана с энергией 60 кэВ и дозой 10^{17} ион/см² площадь поверхности увеличивается почти в 100 раз. Отметим, что получение развитой поверхности является важным фактором с точки зрения улучшения механического контакта с окружающими тканями, за счет врастания костной ткани в сформированный рельеф.

Взаимодействие между имплантатом и окружающими тканями – это сложный динамический процесс, интенсивность которого существенно зависит не только от химического состава поверхности имплантата, но также и от рельефа и шероховатости поверхности. Одним из первых результатов, в котором отмечалось положительное влияние микрошероховатости на процессы остеогенеза по сравнению с контрольной полированной поверхностью была работа Буссера [28]. Наблюдалось, что поверхность с микронной шероховатостью, полученной дробеструйной обработкой и последующим кислотным травлением, способствует более быстрому росту костной ткани. Эти результаты показали, что поверхность имплантата может быть целенаправленно модифицирована с целью не только улучшения механического контакта, но и придания ей биоактивных характеристик, т.е. повышенной клеточной активности и ускоренного остеогенеза. Для объяснения влияния микротопографии на площадь контакта кость-имплантат были разработаны биомеханическая теория Ханссона и Нортон [29], концепция контактного остеогенеза [30], и гипотеза поверхностного сигнализирования [31].

На основе теоретических расчетов Ханссон установил оптимальные геометрические параметры поверхности (лунки 1,5 мкм в глубину и 3-5 мкм в диаметре), обеспечивающие контактный остеогенез, то есть образование костной ткани непосредственно на поверхности имплантата (в отличие от дистанционного остеогенеза, при котором регенерации костной ткани происходит вокруг имплантата). Экспериментальные результаты показали, что модифицированная поверхность имеет больший предел прочности на границе раздела имплантат-кость, а площадь контакта возрастает в 2-3 раза [29].

Существуют многочисленные исследования, свидетельствующие о том, что топография поверхности воздействует на самоорганизацию [30], миграцию [31], адгезию [32-33], морфологию [34] и дифференцировку клеток [35]. Топография поверхности имплантата определяет площадь контакта костной ткани с поверхностью имплантата [36], и может влиять на скорость формирования костной ткани, а также природу химической связи кость-имплантат [37]. В то же время, имеющиеся литературные данные не дают четкого представления об оптимальных характеристиках поверхности с точки зрения протекания ускоренного процесса остеогенеза. Так, в интервале значений шероховатости 1-100 мкм имеются противоречивые данные, свидетельствующие как об улучшении скорости и качества формирующегося костной ткани [38-40], так и об отсутствии влияния топографии на процесс остеогенеза [41-43].

Нанорельеф поверхности также может оказывать влияние на поведение клеток, однако каких либо определенных закономерностей обнаружено не было. Например, было показано, что формирование нанорельефа (нанорешетки с шириной 350 нм) приводит к увеличению количества нейронных ответов мезенхимальных стволовых клеток [44]; создание шероховатости в диапазоне 11-85 нм увеличивало адгезию и дифференциацию остеобластов [45]; увеличивалось интенсивности образования новой костной ткани при наличии нанотрубок размером 8 нм в диаметре и 100 нм длиной [46]. Также было установлено, что остеобласты распластываются активнее на поверхностях с меньшей глубиной впадин (14-25 нм) по сравнению с более грубой поверхностью (впадины глубиной 49 нм) [47]. В то же время, низкая активность клеток наблюдались в случае наноостровков размером около 10 нм [48]; пролиферация остеобластов снижалась на поверхности с шероховатостью 0,5-13 нм [49].

Для улучшения микромеханической интеграции и обеспечения плотного врастания костной ткани внутрь имплантата широко используются объемные пористые материалы [50-52]. Наличие пор влияет на процесс образования костной ткани, способствует миграции и пролиферации остеобластов и мезенхимальных клеток, а также васкуляризации. Кроме того, пористость улучшает механическое

сцепление имплантата с окружающей костной тканью [53] и может приводить к более быстрому выздоровлению пациентов за счет формирования кости не только в краевой области, но и по всей области контакта [54]. Высокая объемная доля и большой размер пор, как правило, повышают степень остеоинтеграции и способствуют образованию капиллярных сосудов [55-58]. Оптимальным считается средний размер пор порядка 200 мкм [58]. В то же время, имеются результаты, демонстрирующие отсутствие влияния пористости на процесс остеогенеза [59] и снижение механических характеристик имплантата при повышении объемной доли пор [60]. Изменение шероховатости поверхности биоматериала может приводить к изменению его смачиваемости биологической средой. Как правило, на гидрофильных поверхностях наблюдается активное прикрепление, распластывание и пролиферация клеток [61-62].

Для изменения рельефа поверхности могут быть использованы механические методы (пескоструйная обработка), химические методы (анодное окисление, золь-гель процессы), физические методы (термическое напыление, плазменная обработка), однако только часть из них применима к работе с имплантатами. Традиционные прецизионные технологии, используемые для формирования рельефа на поверхности титана, такие как кислотное травление [63], осаждение кластеров [64], послойное изготовление [65] и анодирование [66], не имеют прецизионного контроля и возможности создания специфической топографии. По-прежнему трудно выявить роль шероховатости при наличии хаотически расположенных неровностей поверхности, поскольку рельеф поверхности может в большей степени влиять на osteoconductive характеристики материала чем уровень шероховатости.

В отличие от ряда других методов, применение метода импульсной эрозионной обработки (ИЭО) позволяет решить несколько актуальных проблем одновременно: формообразование контролируемого рельефа, формы и размера ячеек (в том числе участков с различной шероховатостью), создание необходимой толщины (от 1-2 мкм до 100 мкм), получение требуемого химического состава и заданных свойств.

В медицине технологические возможности ИЭО были востребованы в меньшей степени, чем машиностроении и металлургии, и служили, главным образом, для упрочнения различного медицинского инструмента. В медико-инструментальной отрасли метод электроискрового легирования (ЭИ) был внедрён на МИЗе им. Горького для упрочнения губок хирургических иглодержателей. В результате срок службы иглодержателей повысился с 3 до 5 лет. В дальнейшем номенклатура медицинских инструментов, упрочнённых методом ИЭ, расширилась. В частности, были внедрены процессы легирования зубных элеваторов и стоматологических щипцов.

В работе [67] на обычные стальные спицы Киршнера наносили титан технической чистоты, формируя поверхностный слой с различной шероховатостью, тем самым достигая жёсткой первичной и вторичной фиксации обломков кости на весь период лечения, а также предупреждая развитие воспалительной реакции тканей в области спицевого канала. Также описана потенциальная возможность осуществления электроискрового поверхностного легирования непосредственно во время операции дентальной имплантации. Легирование протезов можно произвести даже в полости рта при хорошем орошении протеза охлажденной дистиллированной водой. Это обосновано в тех случаях, когда имеется несколько имплантатов и протезов большой протяженности и наблюдаются явления гальваноза [67].

Как показывают испытания *in vivo* и *in vitro*, размер пор и пористость биоматериалов оказывают большое влияние на их остеоинтеграцию. Поры необходимы для образования костной ткани, поскольку они способствуют миграции и пролиферации остеобластов и мезенхимальных клеток и васкуляризации. Кроме того, пористость улучшает механическое сцепление имплантата с окружающей костной тканью, обеспечивая большую механическую стабильность [68].

Необходимость пористости для костной регенерации показана в работе Kuboki, где выявлено, что на твердых частицах новой кости не образуется, а при использовании пористых подложек наблюдается прямой остеогенез [69]. Эти

выводы подтверждаются рядом исследований, в которых проводилось сравнение имплантатов с пористым металлическим и плотным керамическим покрытием. Создание на поверхности имплантата из титанового сплава покрытия в виде титановых шариков привело к увеличению прочности на сдвиг, в то время как покрытие из частиц ГАП не привело к значительному улучшению [70]. Наличие толстой (600-1400 нм) пористой (13-24% пористости, поры менее 8 мкм) оксидной пленки на поверхности титановых имплантатов приводит к более интенсивному образованию кости по сравнению с группой безпористых оксидных слоев толщиной 17-200 нм [71].

Пористость и размер пор как на макро- так и на микроскопическом уровне являются важными морфологическими факторами. С одной стороны, высокая пористость и больший размер пор повышают вероятность врастания кости и эффективной остеоинтеграции имплантата после операции. Так, минимальный размер пор для образования жизнеспособных остеонов (структурная единица кости) составляет 140-200 мкм. Существенное врастание костной ткани наблюдалось для пор размером >200 мкм [72]. Высокая пористость способствует транспорту кислорода и питательных веществ, что приводит к увеличению пролиферации клеток [73].

В то же время имеются результаты, свидетельствующие об отсутствии разницы в остеоинтеграции при использовании подложек с различной пористостью. Так, например, при исследовании титановых пластин с размером пор 50, 75, 100 и 125 мкм, полученных лазерной обработкой, было установлено, что для всех размеров пор кость врастает одинаково [74].

Следует отметить, что не все типы лекарственных средств могут быть использованы в качестве наполнителей контейнеров. Например, высокая растворимость в воде многих антибиотиков, короткий период их полураспада (время, в течение которого концентрация препарата уменьшается наполовину за счет выведения из организма), может ограничивать их применение [75]. Принимая во внимание, что эффективность антибиотиков не всегда

пропорциональна их дозе [76], снижение их концентрации особенно важно с точки зрения уменьшения побочных эффектов на организм.

При разработке новых видов биоматериалов с контейнерами для лекарств основная проблема состоит в том, что лекарственный препарат слишком быстро вымывается с поверхности материала, обычно в течение нескольких часов [77-78]. В зависимости от используемых концентраций (200, 400 и 600 мг) весь объем лекарственного препарата выходит за 45, 90 и 150 минут соответственно [79]. Выход лекарственного препарата из пористого покрытия оксида алюминия наблюдался в течение двух часов [80]. Другим недостатком лекарств является быстрая адаптация бактерий к конкретному антибиотику [81].

Существует большое количество методов получения металлических имплантатов с развитой поверхностью, таких как кислотное травление, пескоструйная обработка, плазменное напыление, распыление через полимерную сетку, диффузионный метод и др [82]. Методом лазерной обработки можно формировать поры заданной геометрии в металлическом имплантате [83-85]. Селективное лазерное спекание является относительно новой технологией, позволяющей изготавливать имплантаты на основе металлических и металлокерамических материалов. Данная технология позволяет изготавливать имплантаты сложной геометрии, соответствующей индивидуальным потребностям пациентов, которые не могут быть получены другими традиционными методами. Методом СЛС можно получать изделия с плотностью 2-100%, что чрезвычайно актуально для медицинского применения в силу того, что позволяет получать высокопористые металлические имплантаты, способствующие росту костной ткани и имеющие пониженную жесткость [86].

2 Методы и подходы к получению материалов с антибактериальной активностью

Бактериальное инфицирование в области хирургического вмешательства до настоящего времени остается одним из наиболее серьезных осложнений эндопротезирования суставов, спондилосинтеза и других ортопедических

операций, несмотря на активное использование антибиотикопрофилактики и современных методов хирургической антисептики. По данным отечественных и зарубежных авторов, случаи глубокой инфекции в области хирургического вмешательства составляют от 0,3% до 1% при первичном вмешательстве, и более 40 % - при ревизионном [87].

Трудность лечения многих бактериальных инфекций связана с формированием на поверхности имплантата микробных биоплёнок. Проблема заключается в том, что бактерии в виде биопленки обладают повышенной устойчивостью к действию иммунной системы, антибиотикам и дезинфектантам по сравнению с микробами, находящимися в планктонной (не связанной с образованием биоплёнок) форме [88-90]. Биоплёночные бактерии способны выживать при воздействии антибиотиков в таких высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты в организме человека при стандартных терапевтических дозировках [91]. Более того, известен факт ускорения роста бактериальной биоплёнки в присутствии высоких терапевтических концентраций антибиотиков [92]. В клинических условиях образование биопленки приводит к острым воспалительным процессам, а в ряде случаев – к летальному исходу. В связи с этим возникает потребность в разработке новых подходов к профилактике и лечению бактериального инфицирования.

Перспективным методом предотвращения образования биопленки является использование имплантатов, поверхность которых проявляет антибактериальную активность [93-95]. В последнее время разработано много подходов к модифицированию имплантатов с целью придания его поверхности антибактериальных характеристик. В зависимости от механизма антибактериального действия можно выделить следующие типы материалов: антиадгезивные покрытия, фотоиндуцированные материалы, материалы с антибиотиком, материалы, допированные металлическими элементами (медь, серебро, цинк). Ниже приводится краткое описание перечисленных выше типов антибактериальных материалов.

2.1 Анти-адгезивные покрытия

Первый этап патогенеза, связанного с инфекциями при имплантации инородного тела, это адгезия бактерий. При отсутствии адгезии бактерий к поверхности твердого тела (имплантата) колонизации бактерий не происходит, поскольку, будучи в свободном состоянии бактерии легко поражаются иммунной системой организма или антибиотиками [96]. Существуют общие и индивидуальные механизмы адгезии бактерий к поверхности твердых тел, присущие определенному типу бактерий. К общим механизмам относят электростатическое взаимодействие между бактериями и поверхностью имплантата. Управлять адгезией бактерий можно с помощью параметров поверхности имплантата, например смачиваемостью [97]. Поскольку бактерии эффективней адсорбируются на гидрофобных поверхностях, то создание гидрофильной поверхности может уменьшить вероятность бактериального инфицирования. В настоящее время в клинической практике широко используются катетеры Hydrocath (полиуретановый катетер с тонким гидрофильным покрытием из поли-Н-винил-пирролидона), эффективно снижающие бактериальную адгезию [98-100]. Стоит отметить, что концепция использования гидрофильных поверхностей часто подвергается критике в силу сложных биохимических процессов на поверхности имплантата [101-105]. Другим методом уменьшения адгезии бактерий является создание поверхности с отрицательным зарядом, приводящим к электростатическому отталкиванию с отрицательно заряженной клеточной стенкой микроорганизма [106].

Также управлять адгезией бактерий можно с помощью шероховатости поверхности. Существует мнение, что имплантаты с шероховатой и пористой структурой поверхности склонны к большей бактериальной адгезии по сравнению с гладкими поверхностями ввиду большей площади поверхности, доступной для адгезии [107]. В нанометровом масштабе, при увеличении шероховатости наблюдалось формирование более плотного слоя адсорбированных белков, что, в свою очередь, может препятствовать адгезии бактерий [108].

2.2 Фотоиндуцированные материалы

Фотокаталитические оксиды, например оксид титана, имеют энергетический интервал между валентной и зоной проводимости. При облучении ультрафиолетом электроны переходят в зону проводимости, образуя в валентной зоне носители положительного заряда – дырки. Как правило, дырки имеет сильную склонность к окислению за счет компенсации электронов. В результате ионы гидроксила вблизи поверхности оксида становятся гидроксильными радикалами, подавляя рост и размножение бактерий [109].

2.3 Материалы с развитым рельефом поверхности для локализации лекарственных препаратов

Впервые локальное применение антибиотиков использовал Bucholz при эндопротезировании за счет добавления антибиотика в полиметилметакрилатовый (ПММА) цемент [110]. Позднее, в 1974 году Klemm использовал шарики ПМАА для доставки сульфата гентамицина (антибактериальное средство) [111]. После имплантации водорастворимый антибиотик вымывается с поверхности имплантата жидкостями организма. Эффективное применение данных систем показано во многих работах [112-114].

Также локальная доставка антибиотиков при эндопротезировании, осуществлялась с помощью различных материалов: коллагеновых волокон, пропитанных антибиотиком; кость замещающих материалов, таких как сульфат кальция или фосфаты кальция, с добавлением антибиотиков; полиуретановых штифтов [115].

Недостатком перечисленных материалов является то, что для доставки антибиотика требуется дополнительный носитель помимо ортопедического имплантата. Долгое время это ограничивало широкое использование локальной доставки антибиотиков. Однако с появлением и развитием различных технологий, позволяющих модифицировать поверхность имплантата и создавать на его

поверхности рельеф любой геометрии для последующего заполнения лекарственным препаратом, локальная доставка антибиотиков стала перспективной областью исследования.

Также известны имплантаты на основе резорбируемых полимерных покрытий. Преимущество этих материалов заключается в возможности точно управлять кинетикой высвобождения антибактериального компонента за счет широкого спектра состава полимерных покрытий [116]. Одним из первых сообщений по изучению полностью резорбируемого антибактериального покрытия для имплантатов была работа Price, в которой пластина для остеосинтеза, нагруженная гентамицином, эффективно использовалась в качестве остеокондуктивного материала с антибактериальной активностью [117]. В работе Lusche покрытие на основе полиакриламида с гентамицином предотвратило развитие инфекции при испытании *In vivo* (интермедуллярная модель) в отличие от широкого инфицирования животных контрольной группы [118]. К недостаткам данного типа материалов можно отнести неконтролируемую деградацию полимеров с образованием токсичных продуктов разложения.

Еще одним интересным подходом для борьбы с инфекцией в области хирургического вмешательства является использование имплантатов с высокой пористостью, которую используют для насыщения лекарственным препаратом [119-123]. Основным преимуществом данного метода является возможность достижения оптимальной концентрации лекарственного препарата в зоне воспаления при которой лекарственная доза является достаточной для поражения бактерий, однако безопасной для организма в целом [124-126]. Например, была достигнута высокая концентрация антибиотика в костно-мозговом канале за счет его локальной доставки, что привело к высокой антибактериальной эффективности даже против устойчивых к антибиотикам микроорганизмов [127-128].

Изменением размера и распределения пор можно тщательно контролировать количество лекарственного средства, загруженного в поверхность имплантата. Например, было показано, что количество введенного лекарства

прямо пропорционален размеру пор и обратно пропорциональна глубине пор [129]. Также размер пор влияет не только на количество, но и на скорость выхода лекарственного препарата [130].

2.4 Металлические материалы с антибактериальным эффектом

Антибактериальное действие таких металлов как серебро, медь, цинк связано с их растворением и связыванием с белками, что приводит к изменению структуры более высокого порядка. 3-D структура белков, как правило, состоит из относительно слабой связи между аминокислотами, например водородных связей, ионных связей, гидрофобных связей, и S-S связей. Связь между металлическими ионами и белками ослабляет связи между аминокислотами, а иногда и нарушает их. Структура высокого порядка обычно имеет близкое отношение к функциям белков. Таким образом, изменение структуры высокого порядка будет нарушать активность микробов и препятствовать их метаболизму [91]. На поверхности клеток присутствуют много пор (каналов), по которым металлические ионы могут проникать внутрь клетки.

В наибольшей степени антибактериальные свойства проявляет серебро. Согласно основной гипотезе, бактерицидный эффект достигается за счет повреждения клеточных мембран вследствие адсорбции ионов Ag на клетках [131]. Другая гипотеза утверждает, что при реагировании ионов серебра с отрицательно заряженными азотом, кислородом, серой, присутствующие в виде фосфат-, amino-, карбоксил-, тиол-групп в клеточных белках и ДНК бактерии, происходит нарушение в функциях ферментов и/или нуклеиновых кислот. Ионы серебра инактивируют дыхательную цепь и цикл трикарбоновых кислот, вызывая образование гидроксильных радикалов, что приводит к повреждению ДНК бактерии [132]. В отличие от антибиотиков, ингибирующих метаболические процессы в бактериях, ионы серебра разрушают бактериальную стенку, что исключает привыкание бактерий к данному бактерицидному агенту [133].

3 Серебросодержащие покрытия с антибактериальной активностью

3.1 Методы получения серебросодержащих покрытий

Введение серебра в состав покрытий может осуществляться напылением металлического серебра на подложку (магнетронное распыление, ионная имплантация), электрохимическим осаждением, лазерной абляцией, химическим осаждением из газовой фазы, золь-гель методом.

Золь-гель процесс заключается в образовании золя с последующим его переводением в гель. Для получения золя – высокодисперсной коллоидной системы в жидкой дисперсионной среде с размерами частиц 1-1000 нм – используют конденсационный или диспергационный методы. Увеличение концентрации дисперсной фазы приводит к появлению коагуляционных контактов между частицами и началу гелеобразования. При удалении дисперсионной среды гель переводится в покрытие. Данный метод был использован для получения материалов на основе ГАП-Ag [134], TiO_2 [135]; SiO_2 -Ag [136], фенилтриэтоксисилан-Ag [137] обладающих высокой антибактериальной активностью. Особенностью данного метода является возможность достаточно просто в одностадийном процессе получать многокомпонентные материалы. Однако, применение золь-гель метода для получения материалов медицинского назначения ограничено в связи с низкой химической чистотой продуктов реакции. Существенно более чистые материалы можно получить методом химического осаждения из газовой фазы, поскольку вещества, используемые в качестве прекурсоров, очищаются от примесей при переходе в газовую фазу [138].

Метод химического осаждения из газовой фазы состоит в том, что конечный продукт образуется в результате взаимодействия газообразных веществ-прекурсоров в горячей зоне или термолиза пара вещества-прекурсора [139]. В основном данный метод используется для получения серебросодержащих покрытий на основе TiO_2 -Ag [140-141] и SiO_x -Ag [142-143], а также покрытий из

чистого Ag [144]. Основным преимуществом метода является возможность нанесения однородных по составу и толщине пленок на детали сложной конфигурации. Однако для создания заданной морфологии покрытия, необходимо поддерживать значения большого количества технологических параметров в узком интервале, что является крайне трудной задачей. Также метод химического осаждения из газовой фазы требует подбора специальных легкоиспаряемых прекурсоров, что усложняет получение многокомпонентных покрытий.

Еще одним методом получения плотных и однородных покрытий является электрохимическое осаждение. За счет низкой температуры процесса, данный метод позволяет осаждать покрытия на любые типы подложек. Методом электрохимического осаждения были получены покрытия с добавками серебра на основе Al_2O_3 [145], хитозан [146] и ГАП [147]. Данные материалы обладали высокой антибактериальной активностью. Однако в данных работах (как и в большинстве других работ, посвященных разработке биоматериалов с антибактериальной активностью) отсутствуют исследования биосовместимости покрытий. Для метода электрохимического осаждения эта задача особенно актуальна в связи с наличием токсических веществ в составе электролитов и растворов солей.

Среди вакуумных методов получения серебросодержащих покрытий стоит отметить катодно-дуговое осаждение, заключающееся в нанесении покрытий путем осаждения на подложку материала из плазменных потоков, генерируемых на катоде-мишени в катодном пятне вакуумной дуги. Данным методом были получены покрытия DLC-Ag, обладающие сильным бактерицидным эффектом против различных типов бактерий (золотистого стафилококка, кишечной палочки), при этом являющиеся биосовместимыми [148-149]. Наряду с высокой скоростью напыления и высокой степенью ионизации распыленного вещества дуговой метод имеет существенный недостаток, ограничивающий его применения в технологиях нанесения антибактериальных покрытий – наличие микрокапельной фазы в плазменном потоке.

Выше было отмечено, что крайне важно обеспечить высокую эффективность в первые часы после имплантации для подавления очага бактериального заражения, и более низкую концентрацию в последующие часы для исключения влияния бактерицидного компонента на процесс остеоинтеграции. Это можно обеспечить, например, за счет введения серебра в тонкий приповерхностный слой покрытия, получаемого методом магнетронного распыления. Суть метода состоит в переносе распыляемого материала с поверхности мишени при ее бомбардировке ионами рабочего газа, образующимися в плазме аномального тлеющего разряда [150]. При работе установки магнетронного распыления в систему анод-катод подается постоянный электрический ток (от 2 до 5 А), который приводит к возникновению между мишенью (отрицательный потенциал) и анодом (положительный или нулевой потенциал) неоднородного электрического поля и возбуждению аномального тлеющего разряда. Электроны, выбитые из катода под действием ионной бомбардировки, подвергаются воздействию магнитного поля. Это приводит к тому, что электроны совершают сложное циклическое движение у поверхности катода. При движении электроны многократно сталкиваются с атомами аргона, что приводит к высокой степени ионизации и возрастанию интенсивности ионной бомбардировки мишени, а следовательно, и к возрастанию скорости распыления. Преимуществами магнетронного распыления являются: высокая скорость распыления при низких рабочих напряжениях и при небольших давлениях рабочего газа; низкая температура подложки; высокая чистота пленок; возможность получения равномерных по толщине пленок на большой площади подложек; возможность получения покрытий сложного состава за счет использования композиционных мишеней [151]. Магнетронное распыление позволяет получать покрытия практически из любых металлов, сплавов и полупроводниковых материалов [152]. Часто покрытия получают методом магнетронного распыления при одновременной ионной имплантации (ИИ) [153-154], с использованием гибридного процесса, включающего магнетронное распыление, объединенное либо с индуктивно-связанной плазмой (ИСП), [155-

157] либо с радиочастотной (РЧ) обработкой с целью дополнительной ионизации [158]. Метод МР при одновременной ИИ используется для повышения адгезии покрытия к металлической или полимерной подложке посредством бомбардировки высокоэнергетическими ионами в течение нескольких минут до и после начала напыления. В PVD-процессах с дополнительной ионизацией при помощи ИСП или РЧ систем, за счет увеличения энергии осаждаемых ионов, удается получать высокоплотные покрытия. Плотная однородная структура также достигается при подаче высокого напряжения смещения на подложку (-250 V) в процессе осаждения покрытия [153].

К настоящему времени получены и исследованы различные Ag-содержащие покрытия: ГАП-Ag [159]; TiO_2 -Ag [160]; Ag-Au-ПТФЭ [161]; TiN-Ag [162]; CrN-Ag, ZrN-Ag [163]; TaN-Ag [164]; DLC-Ag [165].

В данной работе будет использовано два метода введения серебра в состав покрытия, а именно путем одновременного магнетронного распыления композиционной СВС-мишени $\text{TiC}_{0.5}\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и мишени Ag, а также путем ионной имплантации ионов Ag в ранее сформированное покрытие TiCaPCON.

3.2 Влияние серебра на структуру, механические и трибологические свойства материалов

Состав, структура и свойства покрытий определяются большим количеством факторов, в том числе составом и типом распыляемой мишени, способом ее распыления и параметрами осаждения [166]. В частности, при введении Ag в Me-(C,N) наблюдалось уплотнение структуры, при этом частицы Ag находились на границах зерен (колонн). При превышении определенного содержания серебра наблюдается образование отдельной металлической фазы [167].

При добавлении серебра, как правило, происходит уплотнение структуры покрытий, что должно обеспечивать улучшение их механических свойств. Так, при увеличении содержания серебра в покрытии TiCN-Ag с 0 до 4%, твердость покрытий увеличивалась с 12 до 18, 2 ГПа. Однако в некоторых случаях для наблюдается снижение твердости при увеличении содержания серебра в покрытиях типа Me-Ag-N. Например, для системы Ti-Ag-N при увеличении количества серебра от 0 до 16,7% твердость снижалась с 27,3 ГПа до 10,6 ГПа [167], в системе TiCN-Ag при увеличении от 4 до 26, 7 снижение твердости от 18,2 ГПа до 8 ГПа. Уменьшение твердости может быть связано с образованием неупорядоченных обогащенных (C, N)-областей, снижением остаточных напряжений, образованием наночастиц серебра [169].

В ряде экспериментов по изучению трибологических характеристик покрытий Me-(C,N)-(Ag), показано, что при увеличении концентрации Ag, коэффициент трения падает, что обусловлено действием серебра как твердой смазки. Величина снижения коэффициента трения сильно зависела от типа матрицы. Например, в случае системы ZrN характерно наибольшее падение коэффициента трения с 0,19 (для ZrN) до 0,11 (для ZrN-25,9%Ag) [170]. В системе TiCN-Ag при увеличении концентрации серебра от 0 до 16,7% наблюдалось снижение коэффициента трения от 0,365 до 0,311.

Износоустойчивость материала имеет обратную зависимость от содержания Ag. Например, для систем (Zr, Ti)-N-Ag наблюдалось отсутствие измеряемого износа при 0% серебра и дальнейшее увеличение скорости износа при увеличении содержания серебра [170]. При увеличении содержания серебра TiCN-Ag в покрытии от 6,3 до 26,7 %износостойкость покрытия постепенно уменьшалась [170]. Для покрытий CrN-Ag с содержанием серебра 5,1-21%, наименьшей износостойкостью обладали покрытия с максимальным содержанием серебра.

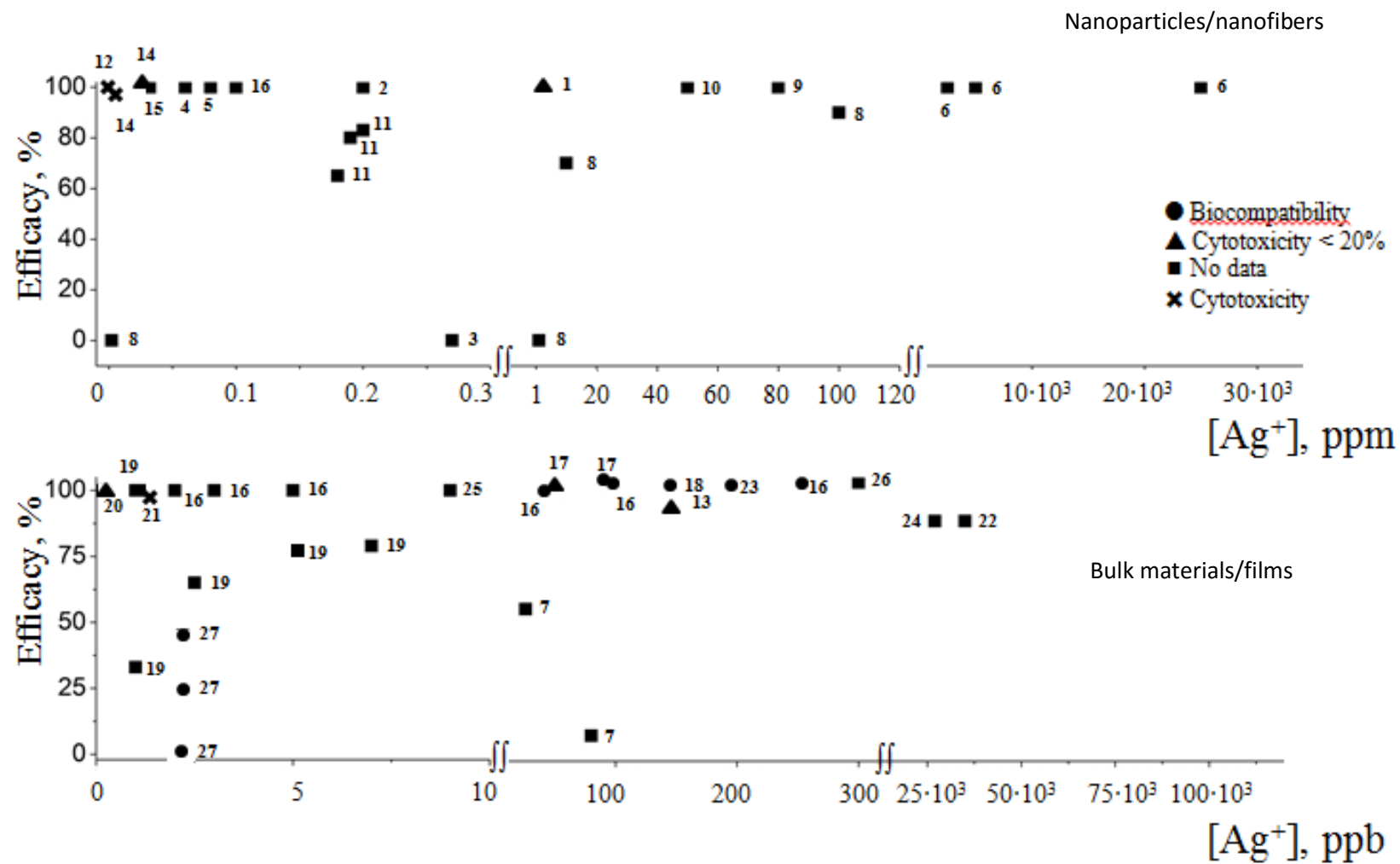
3.3 Факторы, определяющие антибактериальную активность и биоактивность серебросодержащих материалов

Серебро давно используется в качестве антибактериального агента. Однако до сих пор не определена оптимальная концентрация серебра, обеспечивающая значительный антибактериальный эффект. Считается, что минимальная концентрация, при котором наблюдается бактерицидный эффект, составляет 100 ppb, а максимально допустимая, при котором появляется токсический эффект, составляет 10 ppm. При этом стоит отметить, что имеющиеся литературные данные относительно влияния концентрации серебра на биосовместимость материалов достаточно противоречивы. Например, токсический эффект наблюдался уже при довольно низкой концентрации ионов серебра 0,1-80 мкг/л. Также имеются данные что серебро в различных формах оказывает различную антибактериальную эффективность при одинаковой концентрации (рисунок 1) [171-197].

Установлено, что даже малые концентрации серебра в диапазоне 1,1-3,5% могут обеспечивать значительный антибактериальный эффект [198-201]. С увеличением содержания серебра, антибактериальный эффект материалов возрастал [163, 169, 209]. Однако в ряде случаев антибактериальный эффект был слабый или вовсе отсутствовал при больших содержаниях серебра, как например в системе TaCN-Ag, где при содержании серебра 16,7 бактерии активно развивались [203]. Одной из возможных причин отсутствия антибактериального эффекта является тип используемой матрицы, которая может выступать в роли диффузионного барьера, затрудняя диффузию Ag к поверхности материала и соответственно его выход [202]. Другой возможной причиной может быть образование такой фазовое состояние серебра, из которого выход ионов также затруднен. Также не совсем ясна бактерицидная роль наночастиц серебра. Известно, что наличие наночастиц вызывает разрушение стенок бактериальных клеток, приводя к лизису бактерий и их смерти [203-208]. Однако они слишком быстро растворяются, что приводит к краткосрочному антибактериальному эффекту [187].

Использование высоких концентраций серебра, заведомо обладающих антибактериальным эффектом, ограничено возможными токсическими

эффектами. Негативное влияние может наблюдаться при малых концентрациях серебра на уровне 3% [212-213]. При концентрации серебра 26,7% токсический эффект составлял 20%. В связи с этим использование более низких содержаний серебра в диапазоне 1-5% может являться оптимальным решением для обеспечения высоких антибактериальных свойств и одновременно сохранения биоактивности покрытий.



а – наночастицы/нано волокна серебра; б – объемные материалы

Рисунок 1 – Антибактериальная активность различных материалов (литературные данные).

3.5 Постановка задачи исследования

Проведенный анализ литературных данных показал необходимость создания новых видов биоматериалов, обладающих высокой антибактериальной активностью и биологической активностью. Компромисс между данными противоречивыми свойствами можно достигнуть за счет нанесения тонкого слоя, обеспечивающего значительный выход антибактериального агента в первые часы после имплантации и равномерный выход в последующие часы. Для этого будет использовано два подхода, а именно насыщение поверхности с открытой пористостью лекарственным препаратом и введение серебра в биоактивное наноструктурное покрытие.

Глава 2. МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИССЛЕДОВАНИЯ СВОЙСТВ ПОКРЫТИЙ

2.1. Материалы подложек и их подготовка

В процессе селективного лазерного спекания (СЛС) состояние поверхности подложки во многом определяет качество будущего покрытия, поэтому подготовка ее поверхности занимает особое место в ходе эксперимента. В качестве подложек были использованы титановые диски (марка Grade 4) диаметром 15 см. Предварительно на поверхность подложек нанесены риски перпендикулярно направлению нанесения порошка, что препятствует скатыванию порошка во время нанесения первого слоя. Шлифование выполнялось на шлифовальном станке Fu 500 (Ernault Somua, Франция) (рисунок 2).

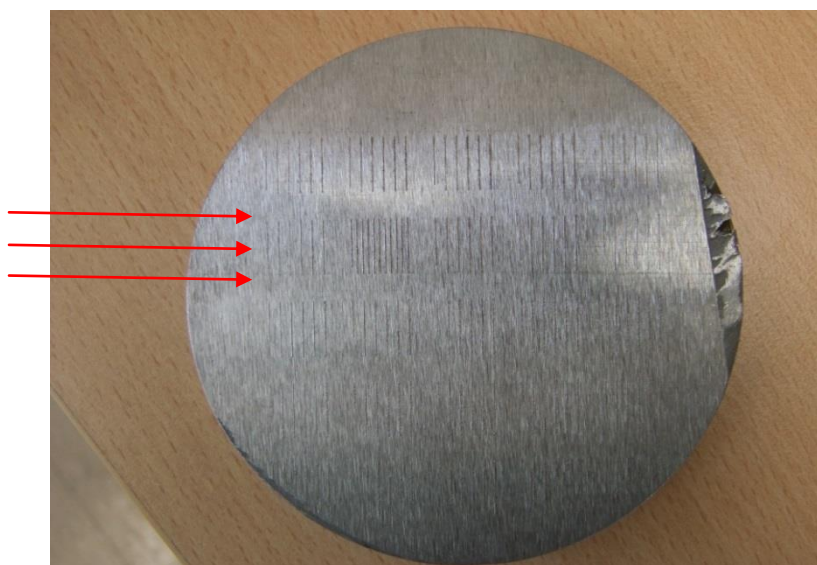


Рисунок 2 - Внешний вид поверхности подложки. Стелками показано направление нанесения порошка

Для осаждения покрытий методом магнетронного напыления были использованы пластины монокристаллического кремния с кристаллографической ориентацией (100) марки КЭФ4,5 (для проведения структурных исследований) и титановые диски марки Grade 4 (для проведения физико-механических и трибологических испытаний).

Предварительно титановые подложки подвергались обработке на плоскошлифовальном станке для получения единой для всех образцов шероховатости поверхности. В целях очистки поверхности подложек от механических и органических загрязнений проводили очистку образцов с использованием ультразвуковой установки UCS 40 MF (Optimal Technologies Ltd, Великобритания).

2.2. Мишени-катоды для магнетронного распыления

В качестве распыляемой мишени для формирования базового покрытия TiCaPCON использовалась композиционная СВС-мишень состава $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Мишень была изготовлена в ЗАО НПО «Металл» согласно ТУ 1984-028-11301236 -2009 «Однослойные планарные мишени катоды СВС-П для ионно-плазменного осаждения многокомпонентных биосовместимых наноструктурных покрытий». Согласно ТУ 9438-015-11458417-2008 «Набор имплантатов титановых с многофункциональными биоактивными наноструктурными покрытиями для черепно-челюстно-лицевой хирургии ЧЧЛХ-Имбнп-«Конмет», в результате распыления данной мишени в реакционной газовой смеси аргона с 15% азота при определенных технологических параметрах, происходит формирование покрытия заданного состава Ti (25-32 ат%), C (30-35 ат%), O (4-8 ат%), N (32-34 ат%), Ca (1-2 ат%), P (0,5-1 ат%). Данное покрытие обладает требуемым комплексом химических, механических, трибологических и биологических свойств, необходимым для имплантатов, работающих под нагрузкой:

- высокая твердость 25-40 ГПа;
- пониженный модуль Юнга в диапазоне 230-350 ГПа;
- высокая стойкость к упругой и пластической деформации;
- высокий предел усталостной прочности (>350 МПа);
- высокая адгезионная прочность (критическая нагрузка до 50 Н);
- высокая степень упругого восстановления (до 75%);

- низкий коэффициент трения 0,12-0,22 в физиологическом растворе;
- высокая износостойкость с приведенной скоростью износа в диапазоне 10^{-6} - 10^{-7} мм³Н⁻¹м⁻¹
- отрицательный заряд поверхности при рН 7;
- положительное значение потенциала свободной коррозии при малой плотности тока в жидких биологических средах;
- хорошая смачиваемость (гидрофильность) поверхности;
- биоактивность;
- биосовместимость.

Данное покрытие рекомендовано для использования на территории РФ. Благодаря этому комплексу свойств, покрытие состава Ti-Ca-P-C-O-N было выбрано в качестве базового (контрольного) для последующего модифицирования с целью придания ему антибактериальных характеристик.

2.3 Осаждение покрытий TiCaPCON-Ag методом магнетронного распыления

Перед началом осаждения покрытий осуществлялась очистка поверхности подложек пучком ионов аргона с использованием ионного источника щелевого типа в течение 10 мин при энергии ионов 2 кэВ и плотности ионного тока на подложках 5 мА/см².

Перед проведением рабочих циклов по осаждению покрытий мишени тренировали на холостых циклах при повышенной тепловой нагрузке. Тренировка позволила отжечь мишени, удалить адсорбированные в порах газ и влагу и стабилизировать состав поверхности.

Распыление композиционной мишени состава TiC+10%Ca₃(PO₄)₂ для осаждения базового покрытия осуществлялось при следующих параметрах: давление 0,1 Па, время напыления 20 минут, ток магнетрона 2А, дистанция до подложек 100 мм. Напряжение смещения на подложках составляло 100В.

Введение серебра осуществлялось тремя методами: 1) с

использованием второго магнетрона и 2) с использованием ионного источника и 3) методом ионной имплантации.

При осаждении покрытий по первому методу с использованием двух магнетронов, распыление композиционной мишени осуществлялось по базовому режиму. Для получения различного содержания серебра в покрытии ток второго (Ag) магнетрона изменяли в диапазоне 0,08-0,1 А.

Методика получения второй группы покрытий TiCaPCON-Ag заключается в использовании кольцевого ионного источника для распыления мишени серебра. В этом случае осуществлялось одновременное распыление композиционной мишени и мишени серебра. Ориентация ионного источника и магнетрона обеспечивала смешение потоков распыляемых элементов в зоне подложек. Регулируя напряжение ионного источника в диапазоне 0,7-3,0 кВ, изменяли скорость распыления серебра, и, как следствие, его содержание в покрытии. Ток магнетрона базовый распыляемой мишени составлял 2 А, напряжение смещения -100 В. Время осаждения покрытий составляло 50 мин.

Для ряда образцов осаждение покрытий осуществлялось с использованием калиброванных диафрагм с диаметром отверстия 4-16 мм, установленных на выходное отверстие ионного источника. Набор диафрагм был изготовлен из алюминиевой фольги толщиной 0,3 мм. Диафрагмы располагали по оси источника на расстоянии 30 мм от распыляемой мишени.

Третья группа покрытий получена введением серебра в поверхность покрытия методом ионной имплантации (ИИ). В этом случае вначале осаждали покрытие состава TiCaPCON, после чего подложки позиционировали напротив имплантора и проводили ИИ Ag в поверхность ранее сформированного покрытия. Обработку проводили при ускоряющем напряжении 25 кВ и токе 10 мА. Время обработки составляло 1 час, доза облучения подложек составляла $5 \cdot 10^{17}$ ион/см².

2.4 Ионное травление

Часть образцов с покрытиями, полученных различными способами (ионная имплантация, одновременное распыление двух мишеней) была подвергнута дополнительному ионному травлению с целью удаления тонкого поверхностного слоя с высоким содержанием серебра. Технологические параметры ионного травления были выбраны экспериментально на основе анализа профилей распределения серебра, полученных методом оптической эмиссионной спектроскопии тлеющего разряда (ОЭСТР) (таблица 1).

Таблица 1 – Технологические параметры ионного травления покрытий TiCaPCON-Ag

№	Метод введения серебра	Ускоряющее напряжение, кВ	Плотность ионного тока, мА/см ²	Напряжение смещения на подложке, В	Время обработки, мин
1	Ионная имплантация	2,5	20	-100	8
2	Со-осаждение	2	15	-100	5

2.3. Получение покрытий с заданной топографией поверхности методом СЛС

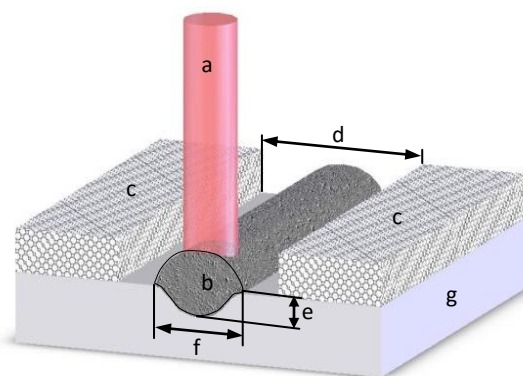
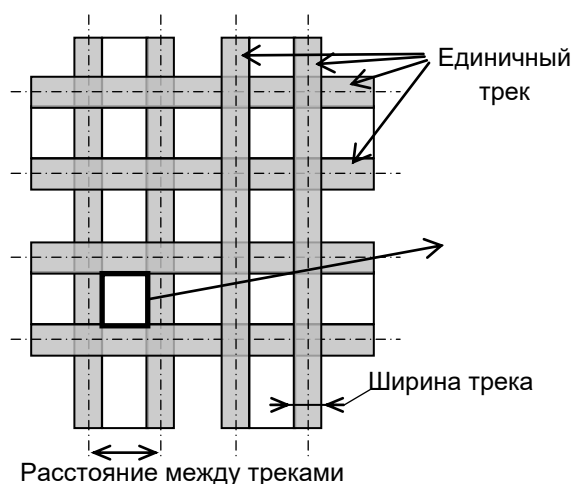
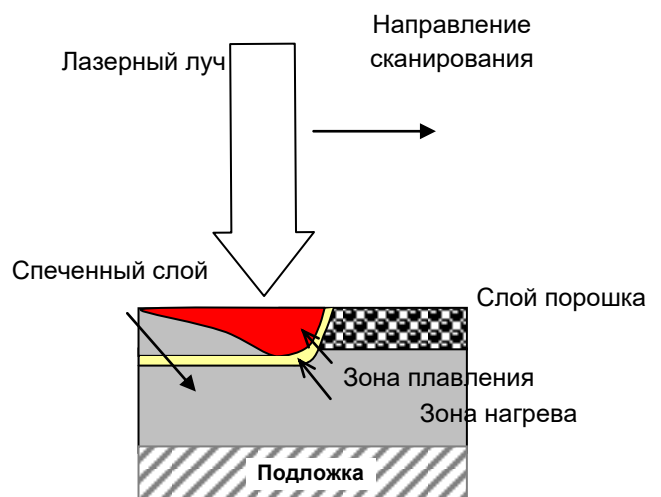
Получение покрытий с заданной топографией поверхности осуществлялось методом СЛС на установке РМ-100 (Phenix, Япония) с использованием квазинепрерывного итербиевого волоконного лазера YLR-50 (IPG Photonics, Япония) с длиной волны 1075 нм и диаметром лазерного пятна 70 мкм. На подложке с предварительно нанесенными рисками (см. п.2.1) размещался слой порошка и разравнивался до высоты 50 мкм, после чего лазерный луч спекал требуемый контур по компьютерной программе с

целью получения заданного рельефа поверхности (рисунок 3). По окончании процесса, образец извлекался из камеры, а излишки порошка удалялись воздушным потоком.

Лазерный синтез – сложный неравновесный процесс, на который влияет большое количество факторов. Одним из основных параметров, определяющих качество конечного изделия является скорость сканирования подложки лазерным лучом. Для определения оптимальной скорости сканирования лазерного луча была проведена серия экспериментов по изучению ее влияния на геометрию треков. В ходе первоначальных экспериментов скорость сканирования варьировалась от 40 до 280 мм/с с шагом 40 мм/с. После изучения треков на наличие областей каплеобразования, диапазон изучаемых скоростей был сужен до интервала 80-140 мм/с, а шаг уменьшен до 20 мм/с. В результате изучения геометрических параметров единичных треков оптимальной скоростью сканирования была выбрана 120 мм/с.

Для получения сетчатой структуры на поверхности подложек, сканирование лазерным лучом осуществлялось в двух взаимно-перпендикулярных направлениях (рисунок 3). Для получения ячеек различного размера, расстояние между треками варьировалось от 220 до 420 мкм. Толщина слоя составляла 50 мкм, мощность излучения 50 кВт. Данные параметры оставались постоянными в ходе всех экспериментов.

С целью придания материалу биоактивных характеристик, на поверхность образцов методом магнетронного напыления было нанесено покрытие TiCaPCON с использованием композиционной мишени состава $\text{TiC}_{0.5} + \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Напыление покрытия осуществлялось на вакуумной установке “UNICOAT 900” по базовому режиму.



- (a) – лазерный луч
- (e) – глубина плавления
- (b) – единичный трек
- (f) – трек width
- (c) слой порошка
- (g) – подложка
- (d) – зона обработки

Рисунок 3 - Схема процесса СЛС

2.4. Получение покрытий с различной шероховатостью поверхности

Для увеличения шероховатости поверхности, титановая подложка была модифицирована методом импульсной электроискровой обработки (ИЭО), что позволило увеличить значение R_a до 8 мкм. ЭИО была проведена на установке Allier-303 с использованием литого титанового электрода по следующему режиму: длительность импульса 80 мкс, частота 800 Гц, амплитудное значение тока 150 А. Полученные подложки были промыты в ультразвуковой ванне в дистиллированной воде. Далее на их поверхность методом магнетронного напыления были нанесены покрытия TiCaPCON-Ag по режимам, указанным в разделе 2.3

2.5. Изучение состава и структуры покрытий

Исследование микроструктуры поперечных изломов покрытий, а также поверхности покрытий после трибологических, адгезионных и циклических, ударно-динамических испытаний проводилось с помощью сканирующего электронного микроскопа S-3400N (Hitachi, Япония), обеспечивающем разрешение до 3 нм при ускоряющем напряжении 30 кВ. Для получения изображения с более высоким разрешением использовался микроскоп с автоэмиссионным катодом JEM7600F (JEOL, Япония) с ускоряющим напряжением 0,1-30 кВ и разрешением 0,6 нм при 5 кВ. Съемка образцов велась как в режиме обратно отраженных электронов, так и в режиме вторичных электронов. Данный микроскоп оснащен приставкой рентгеновского микроанализа INCAx-sight, с помощью которой был изучен элементный состав покрытий. Использовалось ускоряющее напряжение 20-25 кВ, дистанция до детектора составляла 4-10 мм. Время набора спектра 60 секунд.

Также элементный состав покрытий и распределение элементов по толщине покрытий исследовали методом ОЭСТР с использованием прибора Profiler 2 (Horiba Jobin Yvon).

Рентгенофазовый анализ покрытий был проведен на установке D8 Advance (Bruker, США). Дифрактометрическую съемку проводили с использованием монохроматизированного Cu K α излучении в интервале Брегговских углов $2\theta = 10 - 90^\circ$ с шагом $0,1^\circ$ и экспозицией 10 секунд на каждую точку. Фазовый анализ был выполнен с помощью программы EVA и международной базы данных PDF2. Для минимизации отражений от подложек для отдельных образцов с покрытиями проводилась рентгеновская съёмка по схеме «скользящего пучка» при наклоне образца на угол $2 - 5^\circ$.

Покрытия были исследованы с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии. Для изготовления образцов на микроскопические исследования использовались покрытия, нанесенные на пластины

монокристаллического кремния КЭФ-4.5 (100). В работе использовался просвечивающий электронный микроскоп марки JEM-2100 (JEOL, Япония).

Для определения топографии и параметров шероховатости поверхности покрытий использовался оптический профилометр WYKO NT1100 (Veeco, США).

Наличие химических связей и функциональных групп на поверхности покрытий были изучены методами колебательной спектроскопии. Измерение ИК спектров покрытий было проведено с помощью приставки ATR (полного внутреннего отражения) на вакуумном ИК-Фурье спектрометре «Vertex 70v» (Bruker). Угол съемки составлял 15° , спектральный диапазон анализа 400-3000 см^{-1} , разрешение 4 см^{-1} , диаметр апертуры 6 мм (установленная величина для данного разрешения). Ко всем полученным спектрам была применена функция коррекции базовой линии и сглаживание. В качестве образца фона было использовано зеркало. Количество сканирований составляло 256, что позволило отделить полезный сигнал от шума.

Спектры комбинационного рассеяния света покрытий были получены на спектрометре LabRam HR800 (Horiba Jobin Yvon) со спектральным разрешением 1 см^{-1} . Длина волны излучения составляет 514 нм.

2.6. Методика изучения физико-механических и трибологических свойств покрытий

Измерение твердости, модуля упругости и упругого восстановления покрытий осуществлялось по методу Оливера – Фарра согласно стандарту ASTM E 2546-07 с использованием нанотвердомера Nano-Hardness Tester (CSM Instruments, Швейцария).

Трибологические свойства покрытий изучались с помощью автоматической машины трения Tribometer (CSM Instruments, Швейцария). Для испытаний образцов использовалась схема «шарик – диск», когда контртелом являлся шарик из Al_2O_3 радиусом 3 мм, закрепленный неподвижно в торце полого стержня, а перпендикулярно стержню

закрепляется образец в виде диска с нанесённым на него покрытием. Стержень связан с двумя датчиками перемещения: один фиксирует радиус R , другой замеряет отклонение стержня от первоначального положения, которое пропорционально силе трения скольжения для пары трения, что позволяет установить экспериментально значение коэффициента трения f в определенный момент времени. Нагрузка, прикладываемая на стержень, составляла 1 Н, а линейная скорость составляла 10 см/с. Для определения скорости износа покрытия, проводили измерения профиля дорожки износа. Для этого использовался бесконтактный оптический профилометр WYKO NT1100 (Veeco, США). Скорость износа покрытия рассчитывалась по формуле:

$$W=2\pi rS/l,$$

где S – площадь сечения бороздки износа, r – радиус бороздки износа, l – дистанция пробега.

Для испытаний покрытий с целью определения адгезионной/когезионной прочности использовали «скрэтч–тестер» (REVETEST, CSM Instruments, Швейцария). На этом приборе проводили царапание поверхности покрытия алмазным конусным индентором типа Роквелла с радиусом закругления 200 мкм при непрерывно нарастающей нагрузке. Момент адгезионного или когезионного разрушения покрытий фиксировался после испытаний визуально с помощью оптического микроскопа, оборудованного цифровой камерой, а также по изменению одного из пяти параметров: акустической эмиссии, силы трения, коэффициента трения, глубины проникновения индентора и остаточной глубины царапины. Для анализа характера разрушения покрытий использовали следующие обозначения: $Lc1$ – минимальная нагрузка, при которой появляется первая трещина, $Lc2$ – нагрузка, при которой начинается отслаивание участков покрытия и $Lc3$ – нагрузка, при которой наблюдается пластичное истирание или отслоение покрытия до подложки.

2.7 Методика ударно-динамических испытаний

Для оценки усталостной прочности покрытий, осаждённых на подложки из титана марки BT1-0, проводились циклические, ударно-динамические испытания на импакт-тестере (CemeCon, Германия). Поршень импакт-тестера, на котором закреплён держатель для контртела, обеспечивает циклическую нагрузку до 1500 Н с частотой 50 Гц. Во время испытаний зона деформации образца охлаждается с помощью сжатого воздуха. В качестве контртела использовался шарик из твёрдого сплава ВК6 диаметром 5 мм. Испытания проводили при различных нагрузках (300, 500 и 800 Н) и при фиксированном количестве циклов нагружения (10^5 раз).

2.8 Методика электрохимических испытаний покрытий

Электрохимические исследования проводили с использованием потенциостата Voltalab PST050 (Radiometr analytical). Измерения потенциалов и токов коррозии проводили в термостатированной электрохимической ячейке, оснащенной хлоридсеребряным электродом сравнения с капилляром, подведенным к поверхности, и платиновым вспомогательным электродом площадью 1 см^2 . Эксперименты проводили в 0,9% растворе NaCl. Температура раствора поддерживалась постоянной на уровне $37 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ при помощи термостата ТЖ-ТС-01. Электрический контакт к покрытию подводился с помощью медного зажима с припаянным к зажиму проводом. Обратная сторона пластины и зажим изолировались лаком. Исследуемая площадь поверхность покрытия составляла 1 см^2 . Образец подвешивался в ячейке таким образом, чтобы зажим находился выше поверхности раствора. Измерение потенциала свободной коррозии (ПСК) проводили в течение 30 минут. Данный потенциал использовали в дальнейшем для расчета стартовой точки при потенциодинамических исследованиях. Все потенциалы пересчитаны в шкалу нормального водородного электрода сравнения (смещены на 199 мВ). Затем снимали

поляризационные зависимости тока от потенциала в диапазоне от потенциала на 100 мВ отрицательнее потенциала свободной коррозии до потенциала на 3 В положительнее потенциала свободной коррозии. Скорость изменения потенциала составляла 1 мВ/сек.

2.9 Методика изучения смачиваемости поверхности покрытий

Гидрофильные свойства покрытий изучали с помощью установки САМ 101 (KSV Instruments, Финляндия) по методу «лежащей капли». В качестве смачивающей жидкости использовалась дистиллированная вода и физиологический раствор. Установка оснащена цифровой видеокамерой (FireWire, IEEE 1394) и программным обеспечением C200SW, позволяющими получать видеоизображение капли и проводить компьютеризованный анализ геометрических параметров ее оцифрованного изображения.

2.10 Методика изучения кинетики выхода ионов серебра в раствор

Выход ионов серебра с поверхности покрытий изучали методом масс-спектропии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) на установке X-Series II. Образец помещался в физиологический раствор объемом 40 мл. Через равные промежутки времени в течении 7 дней отбирались пробы объемом 2 мл. Полученная проба разбавлялась 3%-ым раствором азотной кислоты. Длительность одного измерения составляла 60 мсек. Каждый образец измерялся 3 раза. Объем использованной пробы составлял 1 мл. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор In, концентрация которого в каждой пробе составляла 10 мкг/л.

2.11. Методика изучения геометрических параметров образцов СЛС

Для изучения геометрии СЛС-треков были подготовлены шлифы с помощью специализированного оборудования (полировальный станок Phoenix 4000 (Buehler, Германия). Для более четкого изображения треков на

оптическом микроскопе треки подвергались травлению в растворе Марбле (20 г медного купороса, 100 см³ соляной кислоты, 100 см³ этилового спирта). Травление производилось в течение 3 секунд. Затем треки промывались дистиллированной водой.

Измерения геометрических параметров (w_1 – ширина трека; w_3 – ширина проплавления подложки; h_1 – высота наплавленной части трека; h_2 – высота проплавления подложки; α_1 угол контакта трека с подложкой) были проведены по схеме, представленной на рисунке 4.

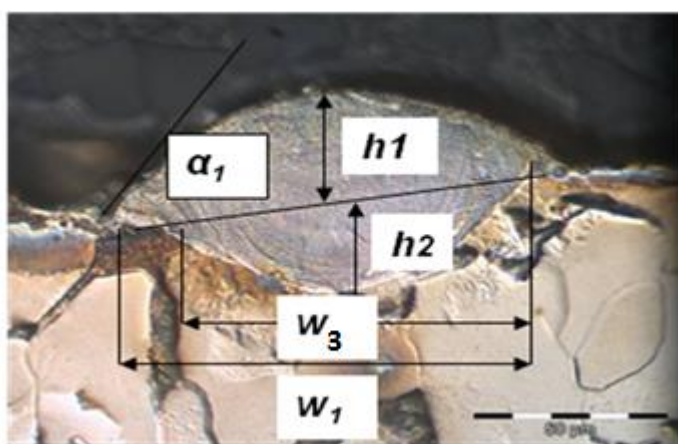


Рисунок 4 – Основные геометрические параметры трека:

Определение размера открытых пор образцов, полученных методом СЛС, осуществлялось с помощью оптического профилометра WYKO NT1100. Результатом изучения поверхности образца являются двумерные и трёхмерные изображения топографии его поверхности, которые представлены на рисунке 5. Анализ изображений позволяет определить ширины верхнего (b) и нижнего (a) оснований, высоту поры (h) и высоту прилегающего к ней пика (H), что также схематично представлено на рисунке 5. Изучение трехмерных профилограмм показало, что в первом приближении пору можно аппроксимировать усеченной четырехгранной пирамидой. Для расчета объема каждой поры, используем формулу определения объема усеченной пирамиды:

$$V = \frac{1}{3}h(S_1 + \sqrt{S_1 S_2} + S_2), \quad (...)$$

где $S_1=b^2$ - где - площадь большого основания

$S_2=a^2$ – площадь меньшего основания.

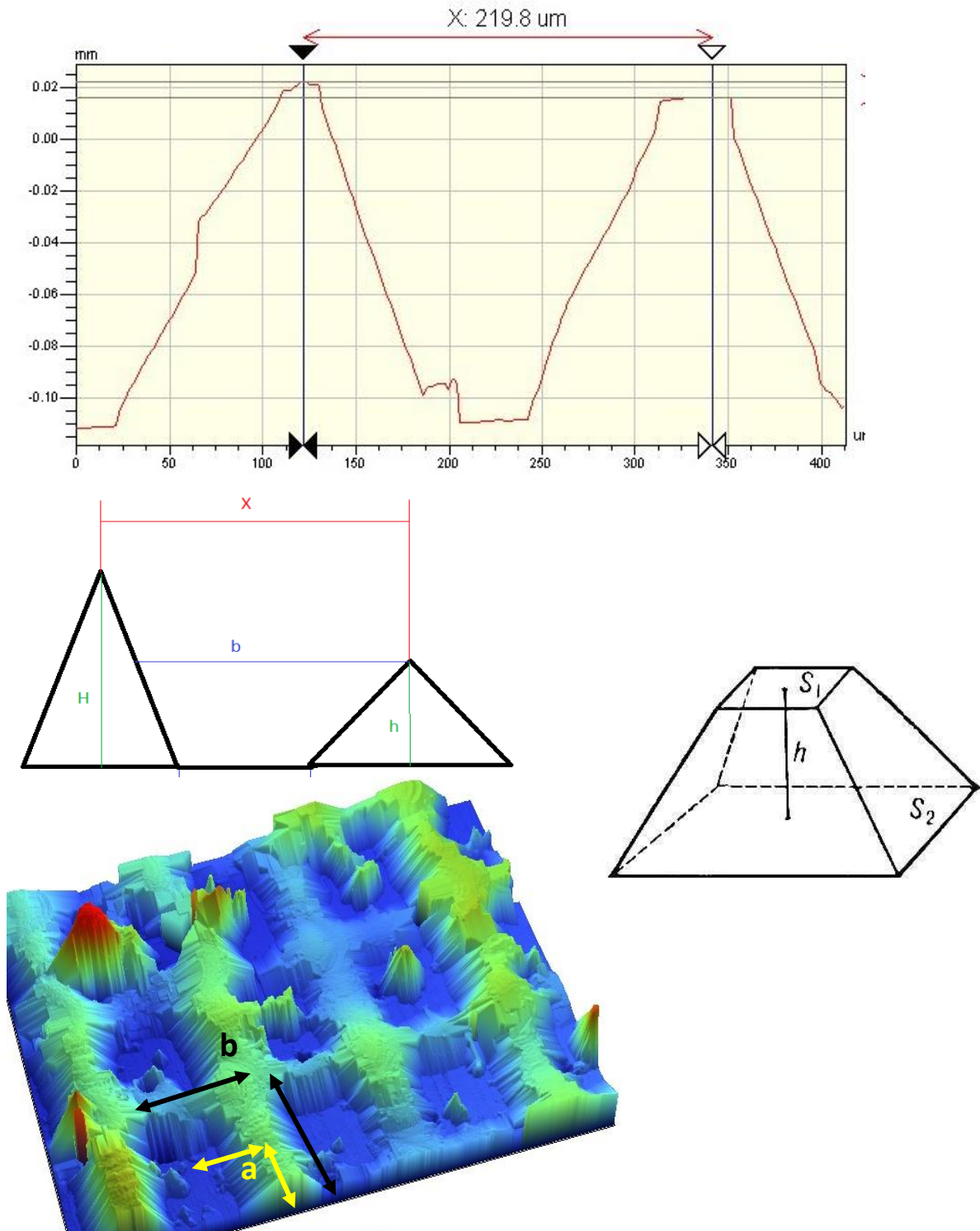


Рисунок 5 – (а) Двумерное и изображение топографии поверхности образца;
(б) Схема определения геометрических параметров поры; (в) Трехмерное

изображение топографии поверхности образца; г) Схема расчета объема пор

При статистической обработке результатов экспериментов находили среднеарифметическое значение и стандартное отклонение. Среднеарифметическое значение X рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i, \quad (...)$$

где X_i – значение i -го эксперимента,

n – число результатов.

Для характеристики разброса значений пользовались стандартным отклонением δ , определенным по формуле:

$$\delta = \pm \sqrt{\frac{\sum (X_i - X)^2}{(n-1)}} \quad (...)$$

1. 12 Методика насыщения поверхности СЛС-покрытий антибиотиком

С целью исследования возможности закрепления лекарственного препарата на поверхности материалов с развитой топографией поверхности, образцы помещались в водный раствор, содержащий Аугментин ($C_{24}H_{27}KN_4O_{10}S$). Аугментин представляет собой комбинированное антибактериальное средство, сочетание бактерицидного антибиотика широкого спектра действия, из группы полусинтетических пенициллинов — амоксициллина и ингибитора бета-лактамаз — клавулановой кислоты. Концентрация раствора антибиотика составляла 20 мг/мл. Затем раствор упаривался в сушильном шкафу при температуре 40°C в течение 2 ч. После протирки поверхности образца сухой ветошью для удаления неадгезивных

частиц лекарственного препарата, образцы исследовались на оптическом эмиссионном спектро스코пе тлеющего разряда.

2.13 Методика исследования биоактивности покрытий в растворе, имитирующей внутреннюю среду организма

Физиологический раствор (ФР) был приготовлен из реагентов, перечисленных в таблице 2 согласно протоколу, описанному в работе [214]. В качестве контрольных образцов были и использованы титановая пластина и широко используемый биоактивный материал Biogran. Образцы выдерживались в 40 мл ФР при температуре 36,7°C в течение 28 дней. Каждый 7 дней раствор обновлялся. Структурные исследования проводились через 7, 14, 21 и 28 дней. Для этого образцы извлекались из раствора и тщательно промывались.

Таблица 2 – Состав раствора, имитирующего внутреннюю среду организма

Реагент	Количество (г/л)
Хлорид натрия (NaCl)	7.996
Бикарбонат натрия (NaHCO ₃)	0.350
Хлорид калия (KCl)	0.224
Двухосновной тригидрофосфат калия (K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O)	0.228
Гексогидрат хлорида магния (MgCl ₂ •6H ₂ O)	0.305
Соляная кислота (HCl)	40 ml
Хлорид кальция (CaCl ₂)	0.278 g
Сульфат натрия (Na ₂ SO ₄)	0.071

Три (гидроксиметил) аминметан ($C_4H_{11}NO_3$)	6.057
---	-------

2.14 Биологические испытания

Биологические испытания имплантатов с покрытиями проводили в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» и Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Исследование кинетики выхода ионов серебра с поверхности покрытий TiCaPCON-Ag с содержанием 3%Ag показало, что в зависимости от метода получения покрытий, наблюдается существенное изменение скорости выхода ионов серебра на начальных этапах, времени насыщения физиологического раствора ионами серебра и абсолютное количество ионов в течение эксперимента. С целью изучения влияния данных факторов на биологические свойства, для проведения испытаний были выбраны образцы покрытий TiCaPCON-Ag с содержанием серебра 3 ат%, полученных двумя методами: одновременным осаждением покрытия при работе магнетрона и ионного источника распыления Ag, а так же ионной имплантацией Ag в ранее осажденное TiCaPCON покрытие. Ряд образцов был подвергнут дополнительному ионному травлению для удаления наночастиц с поверхности. В качестве образцов сравнений были выбраны покрытие TiCaPCON и покрытие TiCaPCON с дополнительным ионным травлением (таблица 3).

Таблица 3 – Описание образцов покрытий, переданных на биологические испытания

№	Образец	Метод получения	Количество образцов, шт
1	TiCaPCON	Магнетронное напыление	25

2	TiCaPCON	Магнетронное напыление с последующим ионным травлением	25
3	TiCaPCON-Ag	одновременным осаждением покрытия при работе магнетрона и ионного источника распыления Ag	25
4	TiCaPCON-Ag	одновременным осаждением покрытия при работе магнетрона и ионного источника распыления Ag с последующим ионным травлением	25
5	TiCaPCON-Ag	ионной имплантацией Ag в ранее осажденное TiCaPCON покрытие	25
6	TiCaPCON-Ag	ионной имплантацией Ag в ранее осажденное TiCaPCON покрытие с последующим ионным травлением	25

Также были проведены биологические испытания титановых имплантатов с гибридными покрытиями Ti/TiCaPCON/Аугментин (таблица 4).

№	Образец	Метод получения	Нагрузка антибиотика, мг/см ²	Количество образцов, шт
1	TiCaPCON	Магнетронное напыление	-	24
2	Ti	Селективное лазерное спекание	-	24
3	Ti/ TiCaPCON	Селективное лазерное спекание с последующим магнетронным распылением	-	24
4	Ti/Аугментин	Селективное лазерное спекание	2,4	24
5	Ti/ TiCaPCON /Аугментин	Селективное лазерное спекание с последующим магнетронным распылением	2,4	24
6	Ti/Аугментин	Селективное	4	24

		лазерное спекание		
7	Ti/ TiCaPCON /Аугментин	Селективное лазерное спекание с последующим магнетронным распылением	0,3	24
8	Ti/ TiCaPCON /Аугментин	Селективное лазерное спекание с последующим магнетронным распылением	0,03	24
9	Ti/ TiCaPCON /Аугментин	Селективное лазерное спекание с последующим магнетронным распылением	4	24

Глава 3. Разработка покрытий в системе TiCaPCON-Ag

3.1. Оптимизация технологических параметров осаждения покрытий

Согласно литературному обзору (глава 1), эффективное антибактериальное действие материалов типа $\text{Me}(\text{C}, \text{N})$ может быть обеспечено при содержании серебра 1-5 ат%. При этом желательно стремиться к минимальным концентрациям для предотвращения негативных воздействий на организм человека. В рамках данной работы были опробованы три различных метода введения серебра и проведена оптимизация технологических параметров напыления покрытий с целью обеспечения содержания серебра в указанном диапазоне.

В первом методе введение серебра осуществлялось магнетронным распылением литой мишени из чистого серебра (99,99%). Предварительные эксперименты показали, что даже на минимальных токах поток распыляемого серебра слишком велик. Концентрация серебра превышает 25 ат% при токе магнетрона 0,08-0,1 А (рисунок 6). При использовании низких токов магнетрона ($<0,08 \text{ A}$), распыление серебра не происходит вследствие зарастания мишени материалом, распыляемым с основной мишени.

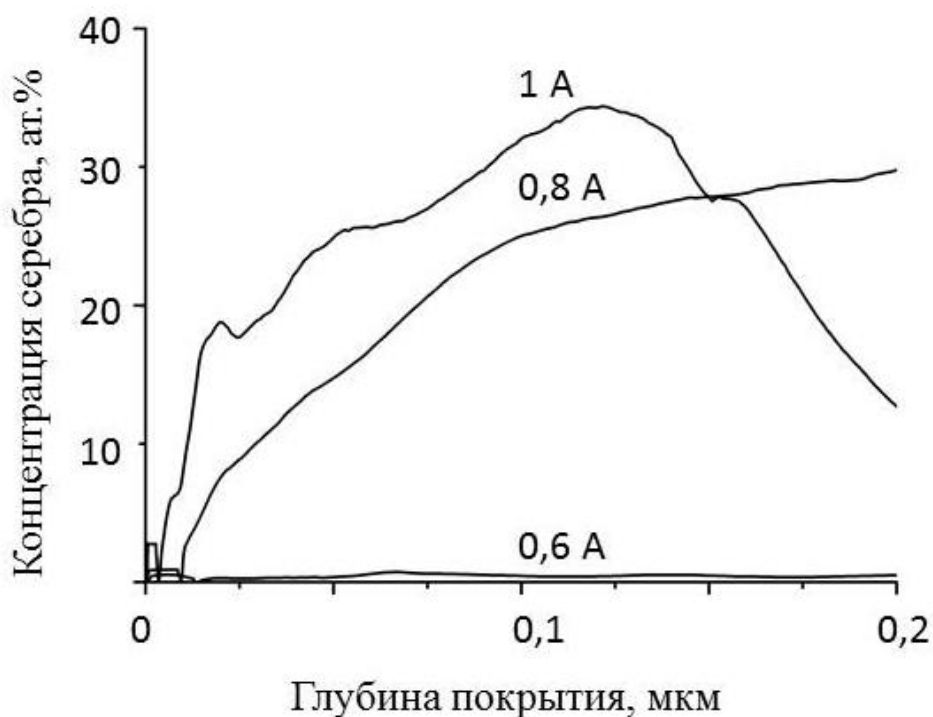


Рисунок 6 – Профили распределения серебра в покрытии TiCaPCON-Ag в зависимости от тока магнетрона

Во втором методе для распыления серебра использовался специализированный ионный источник, над которым закреплялась серебряная мишень. В этом случае, варьируемым параметром было ускоряющее напряжение источника. Чем больше было ускоряющее напряжение, тем больше была плотность потока серебра. Так, при снижении ускоряющего напряжения с 3 до 1 кВ, концентрация серебра уменьшилась с 16 до 7 ат% (таблица 4, рисунок 7). Дальнейшее уменьшение ускоряющего напряжение приводило к неравномерному распределению серебра в покрытии (рисунок 7).

Таблица 4 – Режимы осаждения покрытий при введении серебра с использованием ионного источника (без диафрагмы)

Ток ионного источника, мА	Напряжение ионного источника, кВ	Содержание Ag, % ат.
50	3	16
50	2	8

50	1	7
50	0,8	9
50	0,7	9

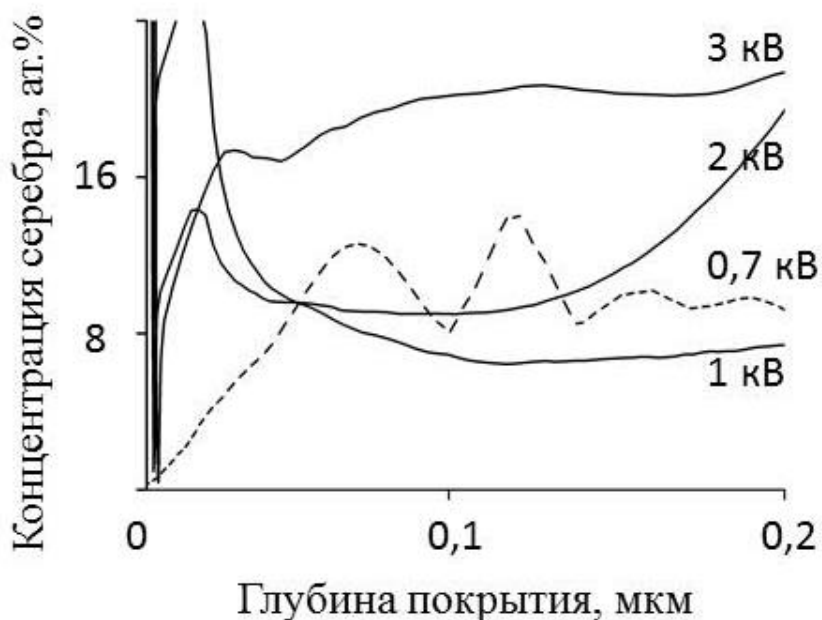


Рисунок 7– Профили распределения серебра в покрытии TiCaPCON-Ag в зависимости от напряжения ионного источника (без диафрагмы)

Для ограничения потока серебра на выходной апертуре источника устанавливались диафрагмы, обрезающие часть потока. Использование ионного источника с полностью открытой выходной апертурой (50 мм) приводит к содержанию серебра в покрытии 7-16%. При уменьшении диаметра отверстия диафрагмы с 16 до 4 мм, содержание серебра в покрытии было снижено с 4 до 0,4% (рисунок 8).

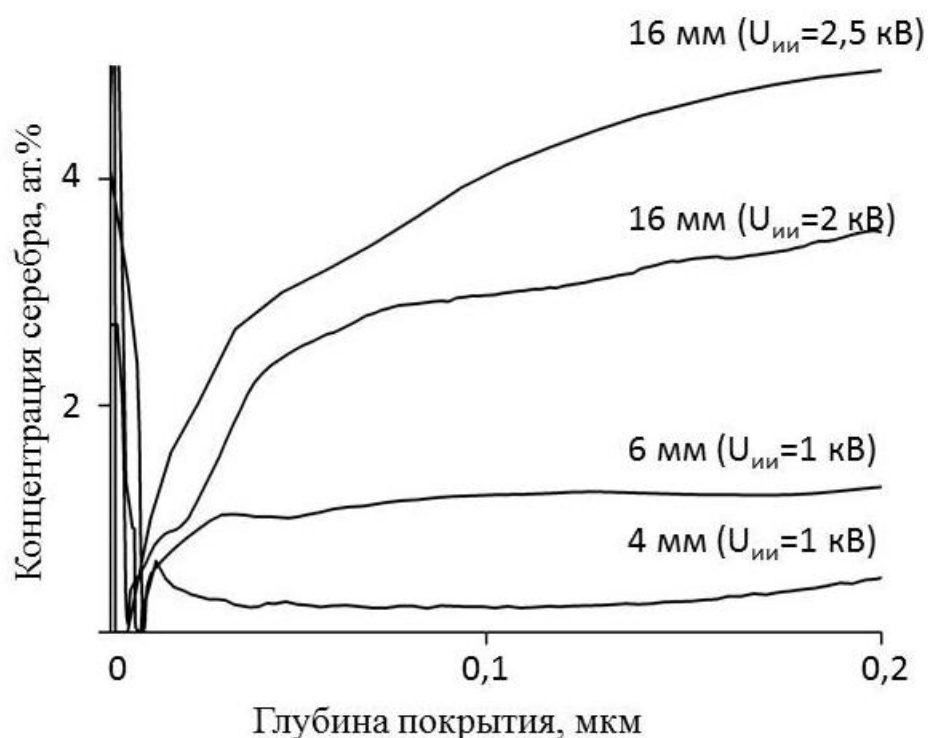
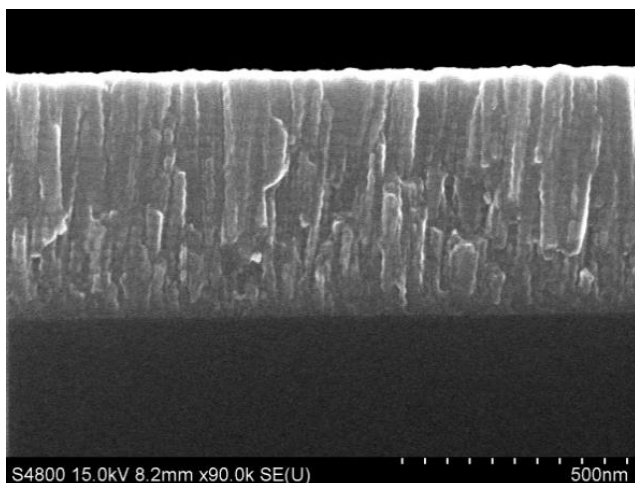
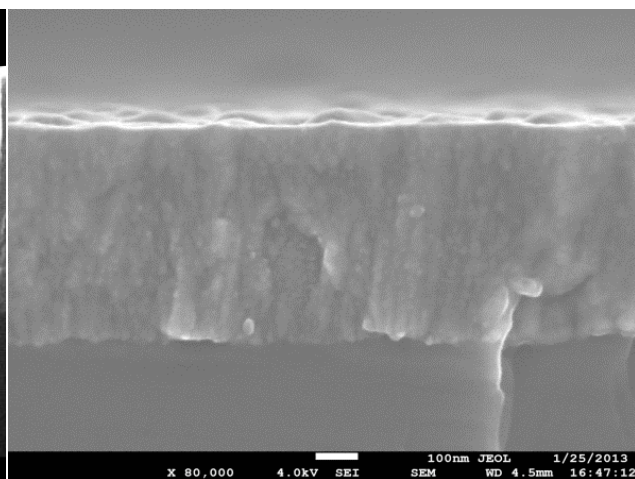


Рисунок 8 - Профили распределения серебра в покрытии TiCaPCON-Ag в зависимости от диаметра диафрагмы

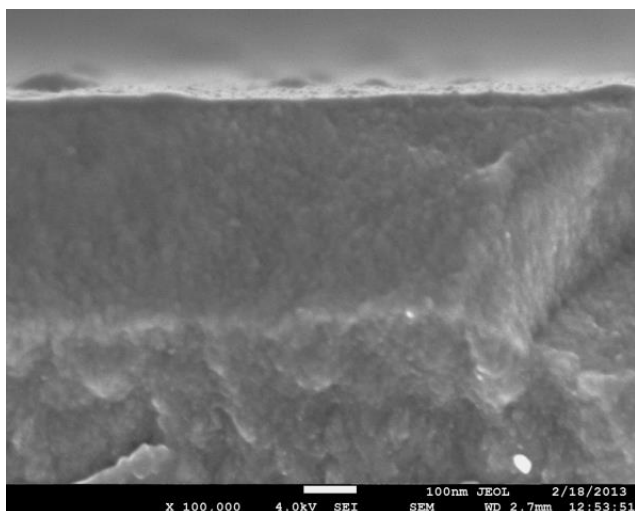
Отметим, что на поверхности покрытий с содержанием серебра $>0,4$ ат% Ag наблюдается высокий концентрационный пик серебра (рисунок 8). Изучение изломов покрытий методом СЭМ, показало, что появление данного пика связано с образованием наночастиц серебра на поверхности покрытия TiCaPCON-Ag (рисунок 9б-г). Размер частиц составляет 5-10 нм, что, по данным ОЭСТР, согласуется с толщиной обогащенного серебром слоя (рисунок 8). С увеличением общего содержания серебра в покрытии, увеличивается количество частиц и их средний размер.



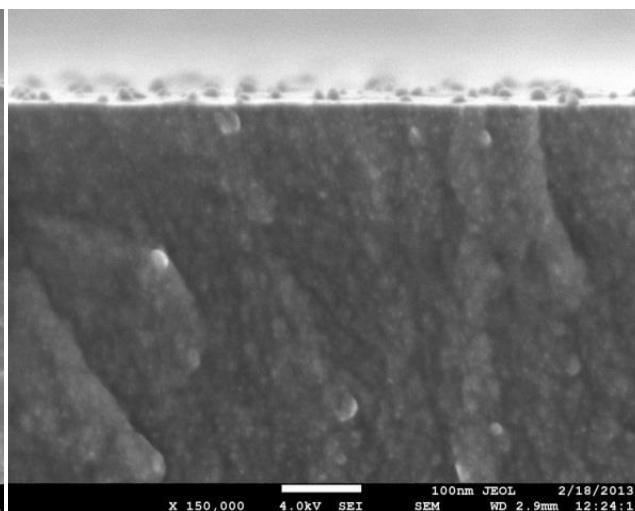
(a)



(б)



(в)



(г)

а - 0%; б - 0,4 ат.%, в - 1,2 ат.%; г - 4ат%.

Рисунок 9 - СЭМ-изображения поперечного излома покрытий TiCaPCON-Ag, полученных одновременным распылением композиционной и серебряной мишеней.

Присутствие наночастиц серебра также подтверждено методом ПЭМ (рисунок 10). На светлопольном изображении видны наночастиц размером 10 нм, вкрапленные в аморфную матрицу. На электронной дифракции (рисунок 10, вставка) кроме линий (111), (200) и (220), соответствующих отражениям от плоскостей кубической фазы, наблюдались дополнительные

дифракционные точечные рефлексy. Эти точечные рефлексy, находящиеся за пределами основных кольцевых отражений, были отнесены к металлическому серебру (межплоскостные расстояния $d_{111} = 0,236$ нм и $d_{200} = 0,204$ нм).

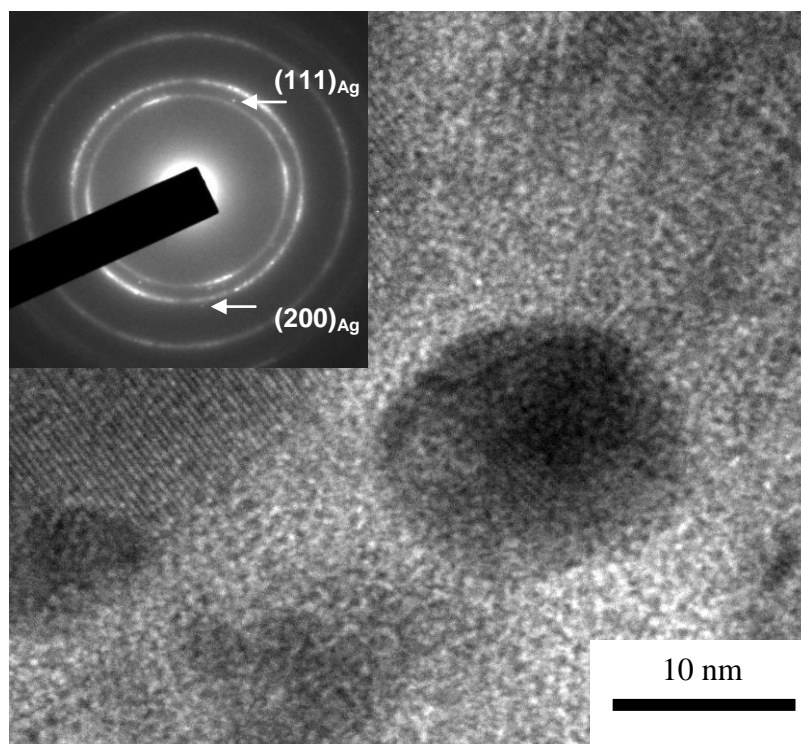


Рисунок 10 - ПЭМ изображение и электронная дифракция покрытия TiCaPCON-Ag, полученных одновременным распылением композиционной и серебряной мишеней.

При разработке материалов с антибактериальной активностью важно учитывать не только объемную концентрацию серебра, но и поверхностную. Низкая концентрация серебра на поверхности при общем высоком содержании в объеме может быть одним из возможных объяснений отсутствия антибактериальной активности при высоком содержании серебра [202-203]. Кроме того, поскольку введение серебра в покрытие в основном обусловлено необходимостью обеспечения антибактериального эффекта в течение ограниченного периода времени после установки имплантата, был опробован третий метод, позволяющий насыщать серебром только тонкий поверхностный слой.

Известно, что в методе ионной имплантации профиль распределения серебра определяется энергией и дозой ионов. Для получения покрытий с различным содержанием серебра варьировалась длительность облучения от 10 до 30 минут, которая связана с дозой ионов по следующей формуле:

$$Q = jt, \text{ где}$$

Q – доза ионов [мкКл/см²]

j – плотность ионного тока [мкА/см²]

t – длительность имплантации [с].

Величина ускоряющего напряжения составила 30 кВ, при котором основная масса внедряемых ионов серебра сосредоточена на глубине 20-100 нм (рисунок 11).

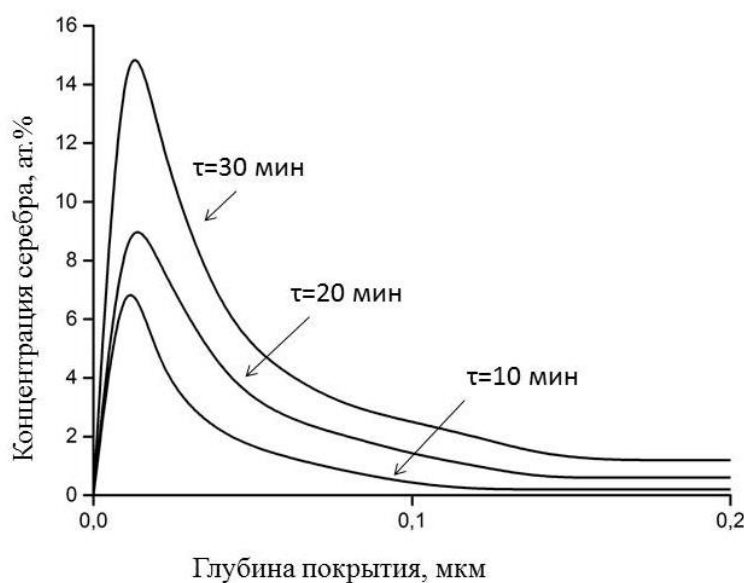


Рисунок 11- Профили распределения серебра в покрытии TiCaPCON-Ag в зависимости от времени имплантации при $U=30$ кВ

Анализ литературы показал, что бактерицидный эффект серебра, помимо его концентрации, также зависит от формы его нахождения в покрытии. В связи с этим одной из задач данной работы было исследование влияния наночастиц серебра на антибактериальную активность покрытий

TiCaPCON-Ag. Были проведены сравнительные исследования образцов с наночастицами серебра и без. Для удаления наночастиц с поверхности был использован метод дополнительного ионного травления, технологические параметры которого приведены в разделе 2.4.

На рисунке 12 представлены изображения поверхности и поперечного излома покрытий TiCaPCON-Ag при введении серебра методом со-осаждения до и после ионного травления. Видно, что ионное травление приводит к полному удалению наночастиц с поверхности (рисунок 12г).

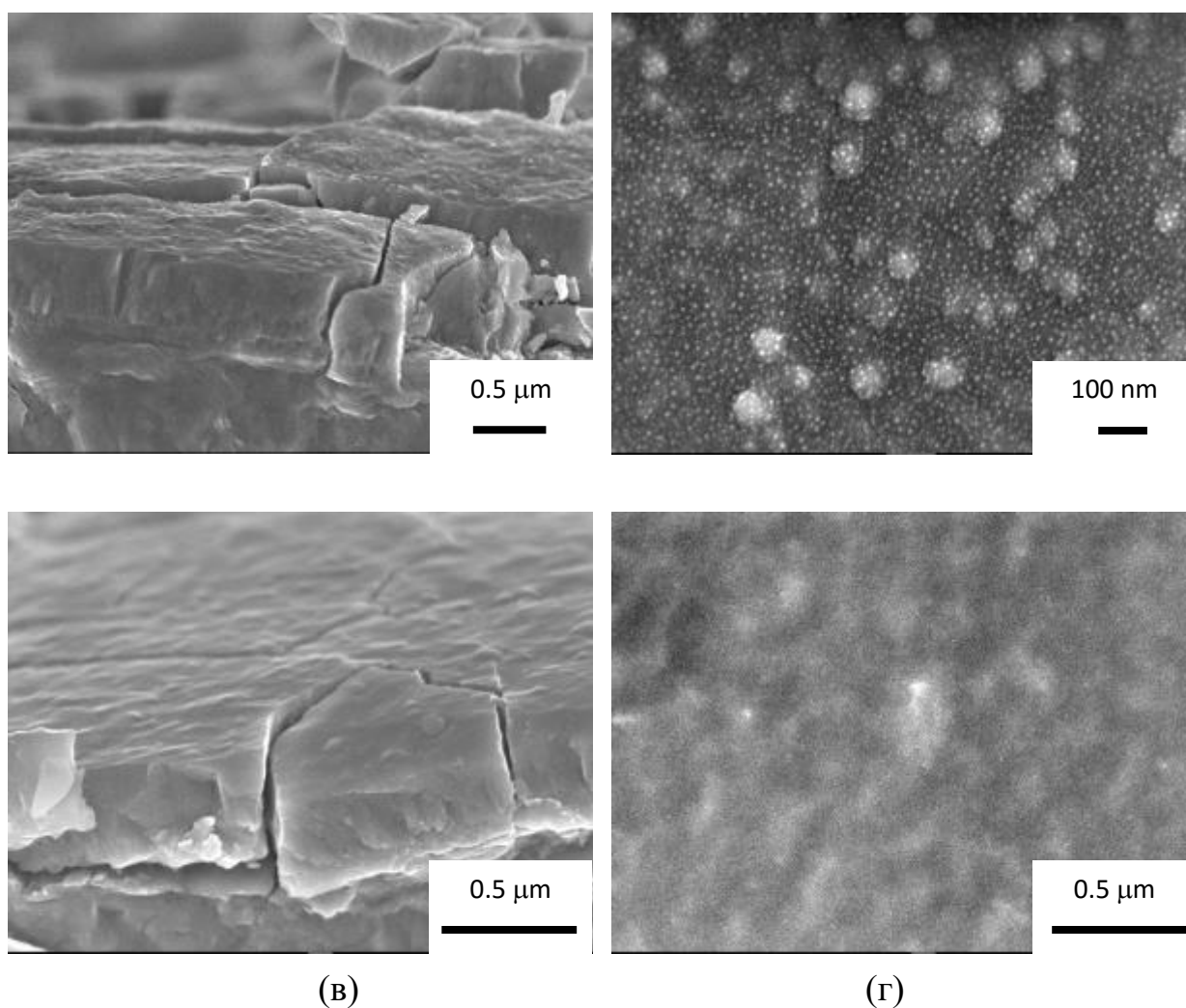


Рисунок 12 – СЭМ-изображения поперечного излома покрытий (а, в) и поверхности (б, г) покрытий TiCaPCON-Ag, при введении серебра методом со-осаждения до (а, б) и после ионного травления (в, г).

На рисунке 13 представлены изображения поверхности и поперечного излома покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag, при введении серебра

методом ионной имплантации до и после ионного травления. В результате ионного травления большинство наночастиц Ag распыляется с поверхности образца.

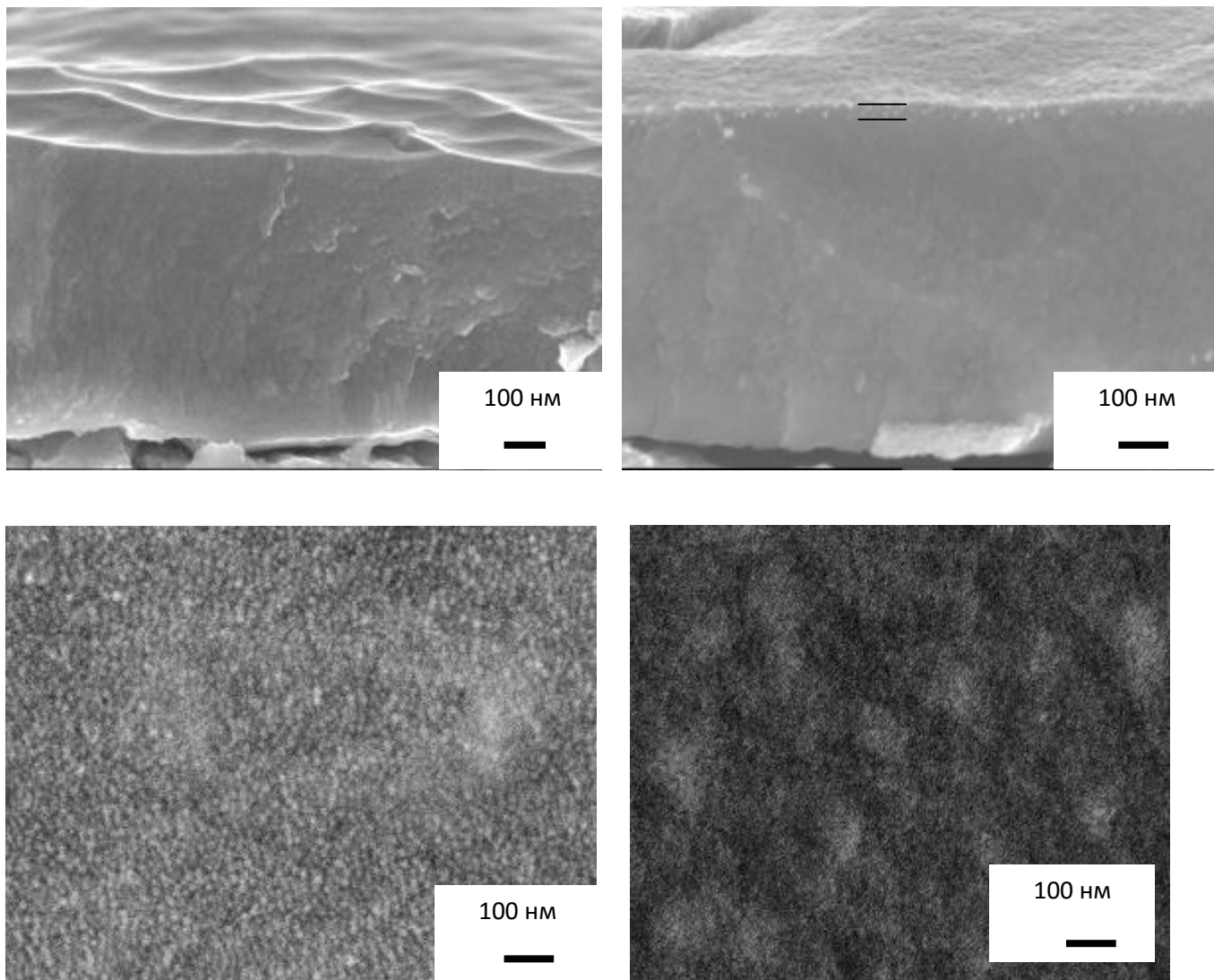


Рисунок 13 – СЭМ-изображения поперечного излома покрытий (а-б) и поверхности (в-г) покрытий TiCaPCON (а) и TiCaPCON-Ag (б-г), при введении серебра методом ионной имплантации до (а, б, в) и после ионного травления (г).

В таблице 5 приведен элементный состав покрытий TiCaPCON-Ag, полученных по оптимальным режимам. Согласно полученным результатам, введение серебра не оказывает сильного влияния на содержание остальных элементов, которые находятся в оптимальном диапазоне концентраций,

установлено для базового покрытия TiCaPCON с высоким комплексом свойств.

Таблица 5 – Элементный состав покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag при оптимальных режимах осаждения

Со-осаждение										
№	Напряжение ионного источника, кВ	Диаметр диафрагмы, мм	Ионное травление	Элементный состав, ат.%						
				Ti	Ca	C	O	P	N	Ag
1	1	4	-	29.0	1.2	32.7	3.7	0.5	32.5	0.4
2	1	6	-	28.1	1.3	31.8	4.1	0.6	32.9	1.2
3	2	16	-	27.2	1.2	30.0	5.2	0.6	32.8	3.0
4	2,5	16	-	23,4	1.0	32.6	6.1	0.5	32.4	4.0
5	2	16	+							3.0
Ионная имплантация										
	Ускоряющее напряжение, кВ	Время имплантации, мин	Ионное травление	Ti	Ca	C	O	P	N	Ag
6	30	10	-	30,1	1,2	30,8	3,6	0,8	32,0	1,5
7	30	20	-	26,4	1,2	31,1	4,8	1,0	32,5	3,0
8	30	30	-	25,2	1,3	30,0	4,9	0,6	34,0	4,0
9	30	20	+	25,9	1,2	31,2	5,3	0,6	32,8	3,0

3.2. Состав и структура покрытий

Целью настоящего раздела было исследование влияния различной концентрации серебра на состав и структуру покрытий TiCaPCON, полученных по режимам 1-4 (таблица 5).

Фазовый состав и текстуру покрытий изучали методом РФА. Результаты РФА показали, что основной структурной составляющей

покрытий является гцк фаза TiCN (рисунок 14). Размер кристаллитов покрытия TiCaPCON, определенной по формуле Селякова-Шеррера (Дебая-Шеррера) из полуширины пиков составлял 25 нм. Легирование серебром не влияло на размер кристаллитов, что, по-видимому, связано с малым количеством легирующего компонента. При введении серебра в количеств 3-4 ат.% наблюдается дополнительный пик в районе $36^\circ 2\theta$, характерный для чистого серебра. Также отметим, что покрытия с содержанием серебра 0,4-1,2 ат.% имели преимущественную ориентировку (111) которая ослаблялась по мере увеличения содержания серебра.

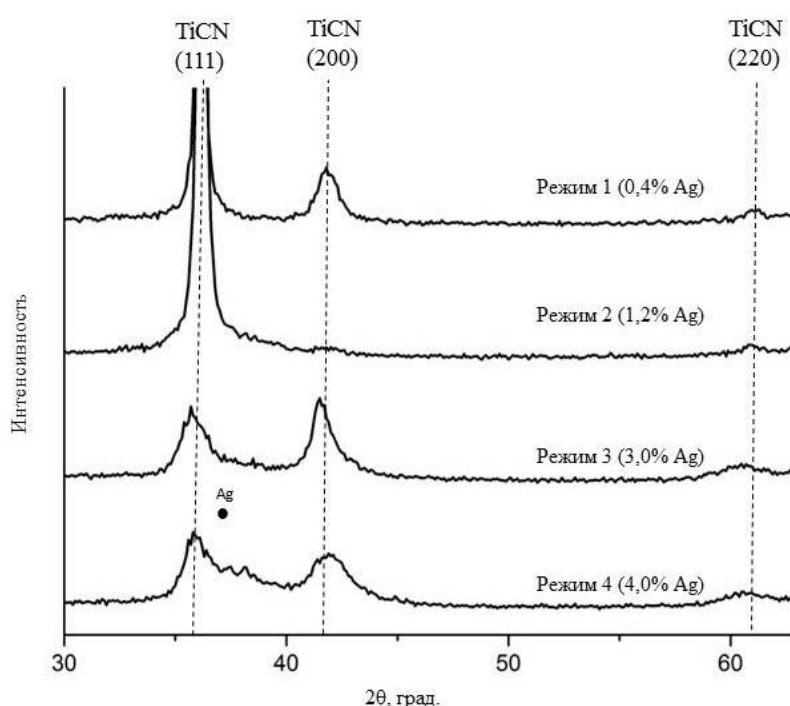


Рисунок14 - Рентгенограммы покрытий TiCaPCON-Ag

Структура покрытий также была изучена методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рисунок 15). На всех ИК спектрах наблюдается наличие дублета в области $250-270$ и $520-540\text{ см}^{-1}$, что характерно для фазы TiCN. В области больших длин волн ($1200-1700\text{ см}^{-1}$) также наблюдается характерный сдвоенный максимум, который свидетельствует о наличие свободного углерода. Для покрытия TiCaPCON-Ag, содержащего 3%

серебра, КР-спектр был получен с отдельной частицы серебра, находящейся на поверхности покрытия. На спектре можно наблюдать два дополнительных пика, расположенных при 520 и 963 см^{-1} . Первый пик соответствует кремниевой подложке, а второй - AgO (база данных Rasmin). Таким образом, результаты КР-спектроскопии и РФА подтверждают присутствие серебра (или оксида серебра) на поверхности покрытий.

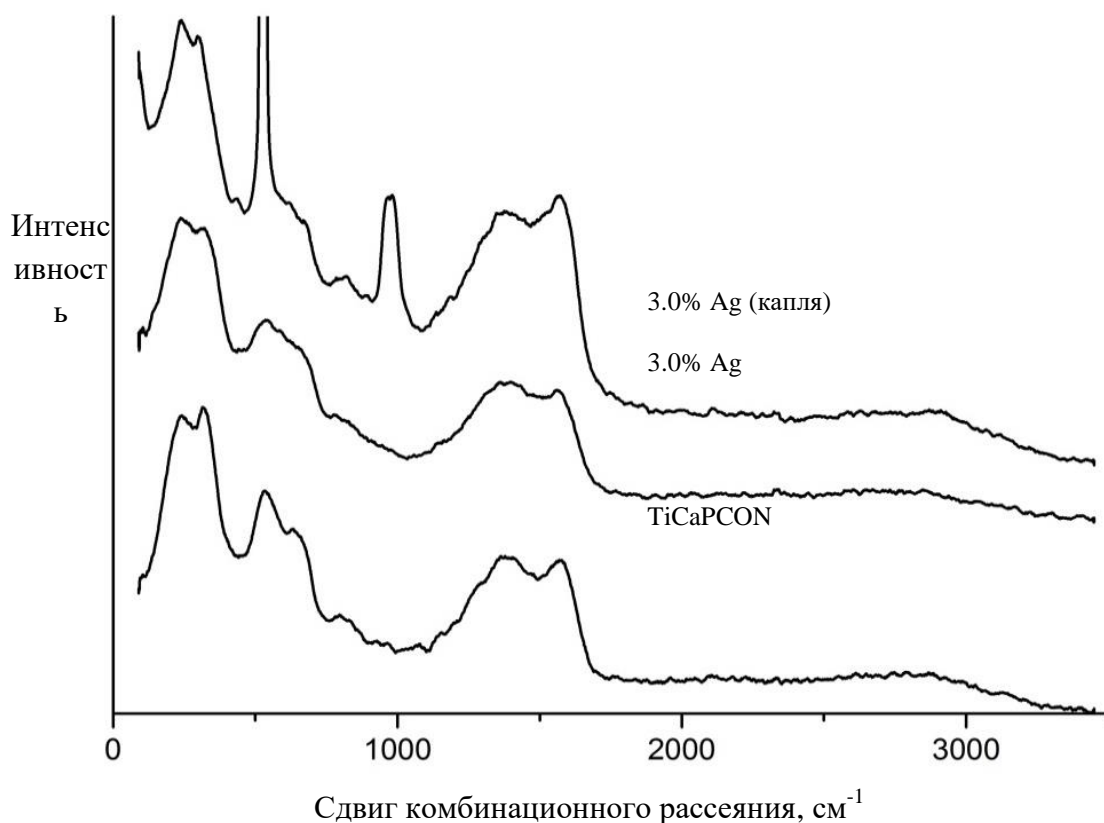


Рисунок 15 – Спектры комбинационного рассеяния покрытий TiCaPCON-Ag

3. 3. Механические свойства покрытий

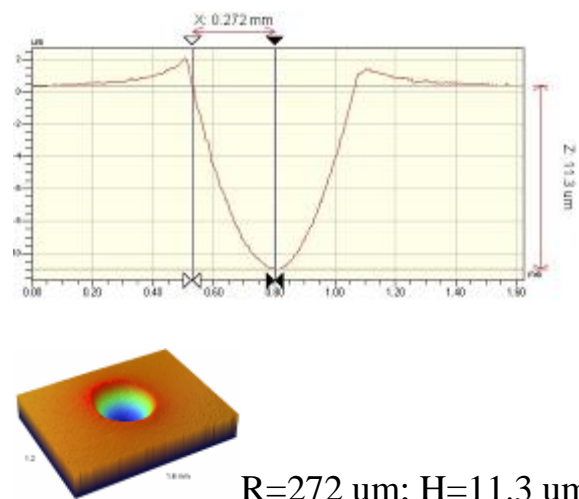
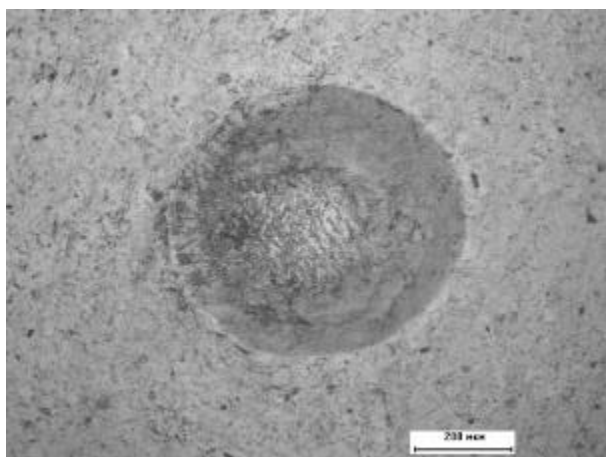
Одним из основных требований к материалам, предназначенным для костных имплантатов, работающих под нагрузкой, является высокий уровень механических свойств. В данном разделе изучено влияние серебра на твердость, модуль упругости, упругое восстановление и усталостную прочность покрытий TiCaPCON-Ag.

В таблице 6 приведены значения твердости, модуля упругости и упругого восстановления для покрытий TiCaPCON-Ag с содержанием серебра 0,4 и 4.% (режим 1-4, таблица 5). Максимальная твердость покрытий наблюдается при содержании серебра 3%. Снижение твердости при дальнейшем увеличении концентрации серебра может быть связано с образованием металлического серебра в виде отдельной фазы. Модуль упругости покрытий находится в интервале 185-230 ГПа. Упругое восстановление составляет 49-68 %.

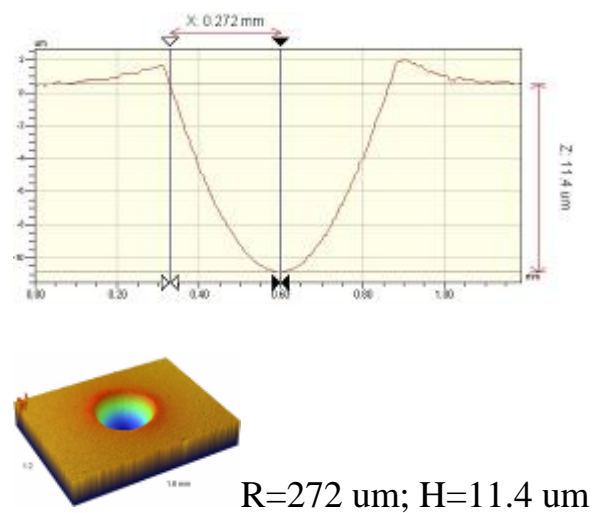
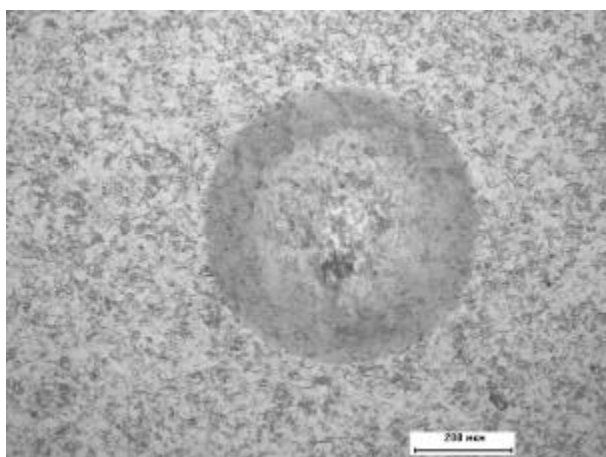
Таблица 6 – Механические свойства покрытий TiCaPCON-Ag

Образец	Содержание серебра, ат. %	Твердость, ГПа	Модуль упругости, ГПа	Упругое восстановление, %
TiCaPCON	-	23±2	190±8	65
1	0,4	16±1	185±10	49
2	4,0	24±3	200±20	66

Для оценки усталостной прочности покрытий проводились циклические, ударно-динамические испытания на импакт-тестере. На рисунках 16-18 приведены фотографии лунок износа, полученных при 300, 500 и 800 Н, на покрытиях TiCaPCON и TiCaPCON-4% Ag, а также профили и уменьшенные 3D-изображения соответствующих лунок. Видно, что геометрические размеры (радиус и глубина) полученных при одинаковой нагрузке лунок не зависят от типа покрытий. Также по краям всех лунок образовались так называемые «навалы» - вытесненный материал вследствие пластической деформации подложки, размер которых увеличивается с увеличением нагрузки. Трещин или проломов покрытий на профилограммах также не обнаружено не было.



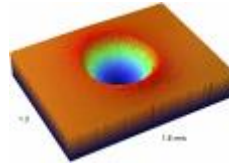
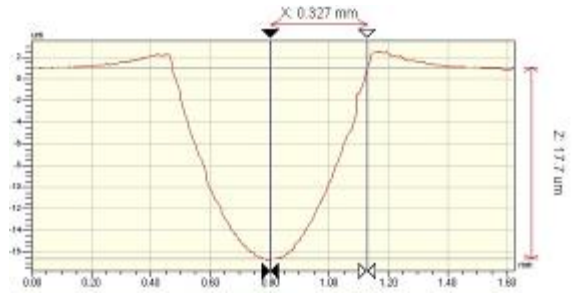
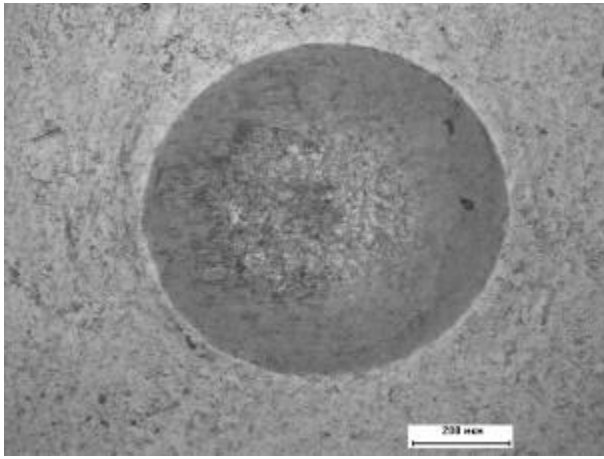
(a)



(б)

a – TiCaPCON, б – TiCaPCON-Ag

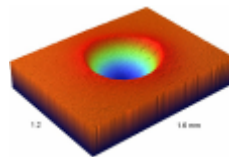
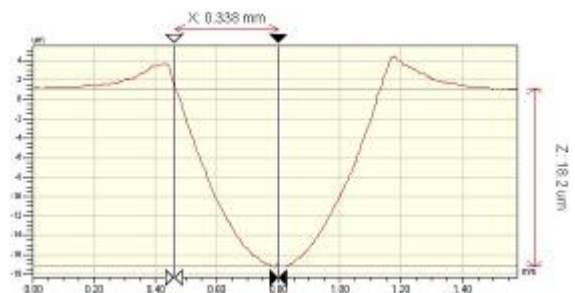
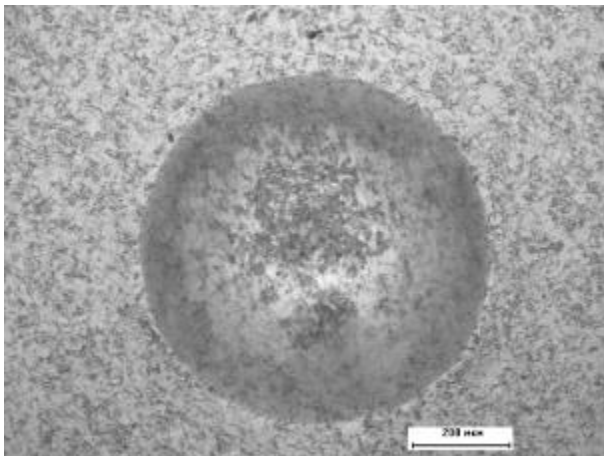
Рисунок 16 – Фотографии и профили лунок после импакт-тестирования покрытий при нагрузке 300 Н.



R=327 um; H=17.7

um

(a)



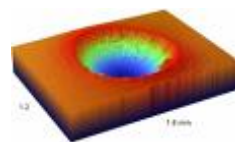
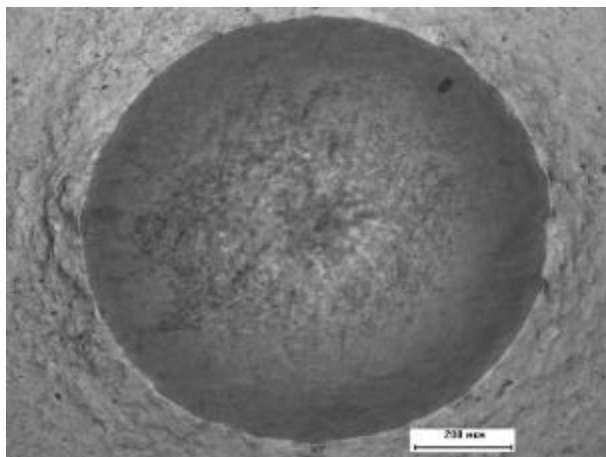
R=338 um; H=18.2

um

(б)

а – TiCaPCON, б – TiCaPCON-Ag

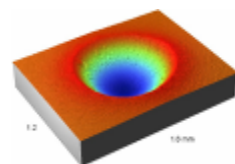
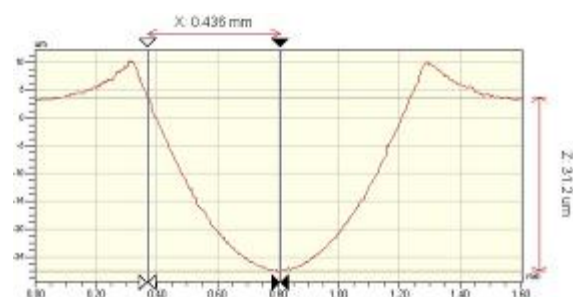
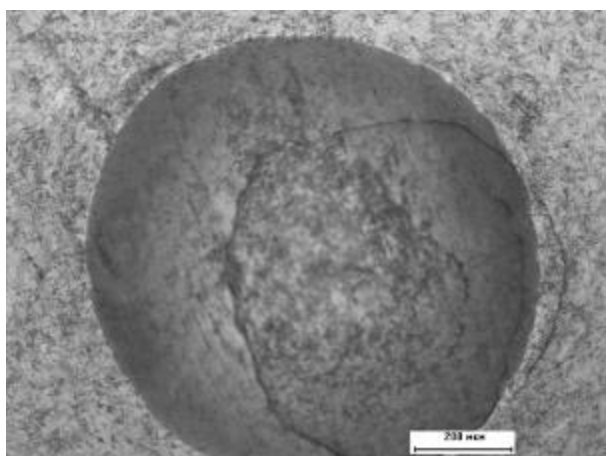
Рисунок 17 – Фотографии и профили лунок после импакт-тестирования покрытий при нагрузке 500 Н.



R=418 um; H=28.4

um

(a)



R=436 um; H=31.2

um

(б)

а – TiCaPCON, б – TiCaPCON-Ag

Рисунок 18 – Фотографии и профили лунок после импакт-тестирования покрытий при нагрузке 800 Н.

Для более детального изучения разрушения различных типов покрытий при импакт-тестировании были проведены исследования с помощью сканирующей электронной микроскопии. Основной механизм разрушения

базового покрытия состава TiCaPCON проявляется в когезионном растрескивании в центральной области лунки (рисунок 19). Для этой области характерны большие сжимающие напряжения, приводящие к сильной пластической деформации материала подложки. Трещины, заметные на рисунке 19г, вероятнее всего проходят по границам раздела единичных колонн, являющихся основными структурными элементами данных покрытий. Данный механизм разрушения наблюдался при всех нагрузках. Также для покрытия TiCaPCON характерно наличие сетки трещин или складок, возникших вследствие пластической деформации подложки по всей поверхности лунок.

Покрyтия TiCaPCON + Ag показали большую усталостную прочность и стойкость к циклическим ударно-динамическим нагрузкам. Как видно из рисунка 20а, при 300 Н следов разрушения покрытия не наблюдалось. При увеличении нагрузки до 500 и 800 Н в центральной области начинается когезионное разрушение покрытия с образованием мелких трещин. Также, при больших нагрузках были обнаружены скопления продуктов износа с вкраплениями материала контр тела. В области контакта при 800 Н обнаружены области, содержащие большое количество вольфрама. Одна из таких областей помечена рамкой на рисунке 20г. Результаты микроанализа, выполненного в этой области, приведены на рисунке 21. Высокое содержание вольфрама может свидетельствовать о том, что происходит не только перенос материала контртела, но и его выкрашивание.

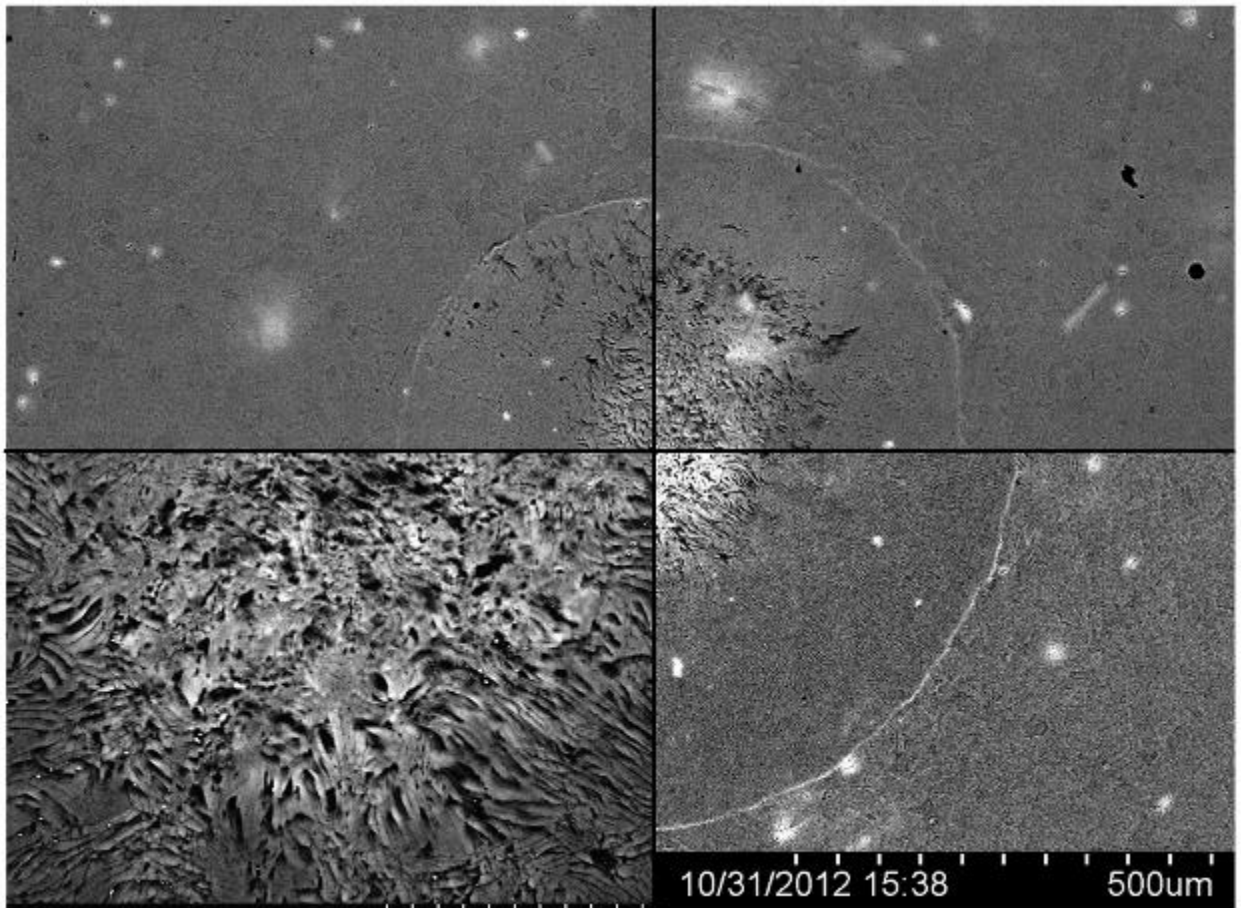


Рисунок 19 – Микрофотографии лунок, полученных при 300 Н (а), 500 Н (б) и 800 Н (в), на покрытии TiSSaPON и центра лунки, полученной при 800 Н, при большем увеличении (г).

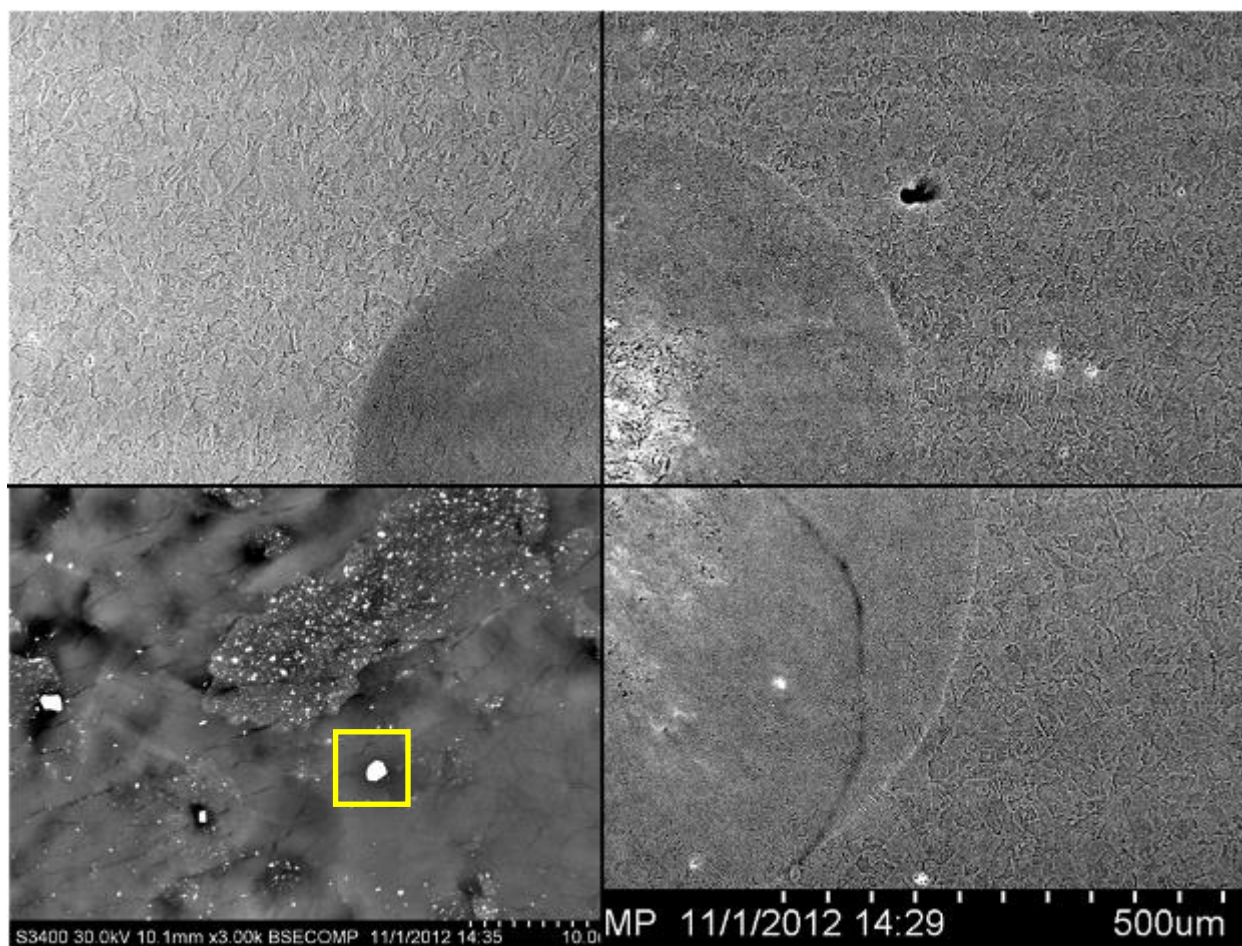


Рисунок 20 – Микрофотографии лунок, полученных при 300 Н (а), 500 Н (б) и 800 Н (в), на покрытии TiSSaPON+Ag и центра лунки, полученной при 800 Н, при большем увеличении (г).

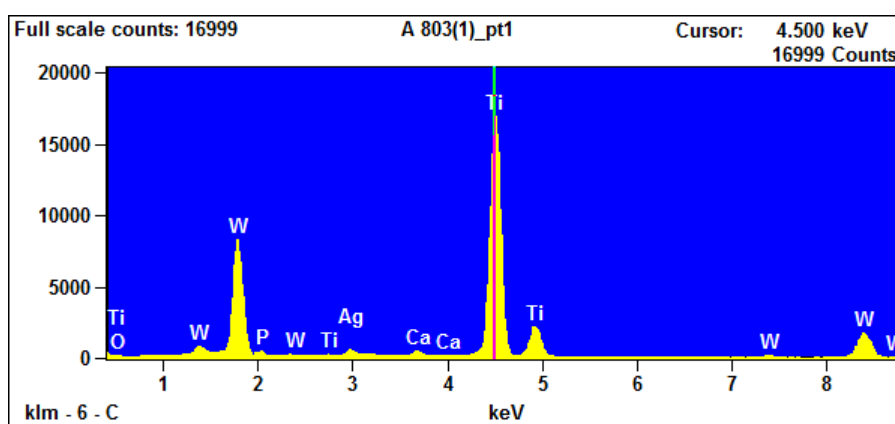


Рисунок 21 – Результаты микроанализа, сделанного в светлой области, отмеченной на рисунке 25г.

Таким образом, основным механизмом разрушения покрытий является когезионное растрескивание в центральной области нагружения, в которой происходит существенная пластическая деформация подложки. Следов адгезионного разрушения обнаружено не было ни в одном из исследованных образцов.

3.4 Трибологические свойства покрытий

Одной из основных причин ограниченного срока службы металлических имплантатов являются процессы трибокоррозии. Кроме того, отдельные участки имплантата находятся в непосредственном контакте, что приводит к их ускоренному трению и износу, образованию продуктов износа, некоторые из которых могут быть токсичны для организма. В данном разделе описаны результаты трибологических испытаний покрытий TiCaPCONAg, полученных методом со-осаждения (режимы 1-4, таблица) как на воздухе, так и в физиологическом растворе, имитирующем внутреннюю среду организма.

Средний коэффициент трения и скорость износа покрытий представлены в таблице 7. Независимо от содержания серебра, коэффициенты трения покрытий сильно не отличались и составляют 0,19-0,23 на воздухе и 0,18-0,27 в физиологическом растворе. Скорость изнашивания покрытий TiCaPCON-Ag на воздухе возрастала с 0,77 до 9,33 мм³/Н/м при увеличении содержания серебра с 0,4 до 4,0%. При аналогичных условиях испытаний наблюдалось полное истирание покрытия TiCaPCON. При проведении испытаний в физиологическом растворе, какой либо зависимости между скоростью изнашивания покрытий и содержанием в них серебра не наблюдалось.

Таблица 7 – Трибологические свойства покрытий TiCaPCON-Ag

N режима	Содержание серебра, ат%	На воздухе	в ФР
-------------	----------------------------	------------	------

		μ	$W_r \times 10^{-6}$ мм ³ /Н/м	μ	$W_r \times 10^{-6}$ мм ³ /Н/м
	0	0,19	-*	0,30	2,28
1	0,4	0,23	0,77	0,27	0,98
3	1,2	0,18	2,04	0,22	3,86
4	3,0	0,21	3,05	0,18	2,71
5	4,0	0,23	9,33	0,23	5,20

3.5. Электрохимические свойства покрытий

Известно, что покрытие TiCaPCON характеризуется высокой электрохимической устойчивостью за счет образование на его поверхности плотной пассивной пленки. Поскольку серебро является эффективным катодом, введение его в состав покрытия в количестве до 4% может оказывать влияние на защитные свойства образующейся пленки. В настоящем разделе описаны результаты изучения влияние серебра на электрохимические свойства покрытий TiCaPCON-Ag, полученных различными методами.

Значение стационарного потенциала покрытия TiCaPCON составило 0,160 В (таблица 8). Значения стационарного потенциала покрытий, полученных одновременным со-осаждением композиционной мишени и мишени серебра (режимы 1,2, 4, таблица 5) были в диапазоне 0,173-0,179 В. Наибольшее значение стационарного потенциала соответствует покрытию TiCaPCON-4ат.%Ag, полученного методом ионной имплантации (режим 8, таблица 5).

Таблица 8 – Стационарные потенциалы покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag

№ режима	Содержание серебра, ат%	Стационарный потенциал, В	Потенциал пробы, В	Ток коррозии, нА/см ²
		0,160	2,2	24
1	0,4	0,177	2,6	21
2	1,2	0,173	2,5	20
4	4	0,179	2,8	118
8	4	0,275	1,7	105
	99,99 (слиток)	0,215	0,3	1000

Поляризационные кривые покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag представлены на рисунке 22.

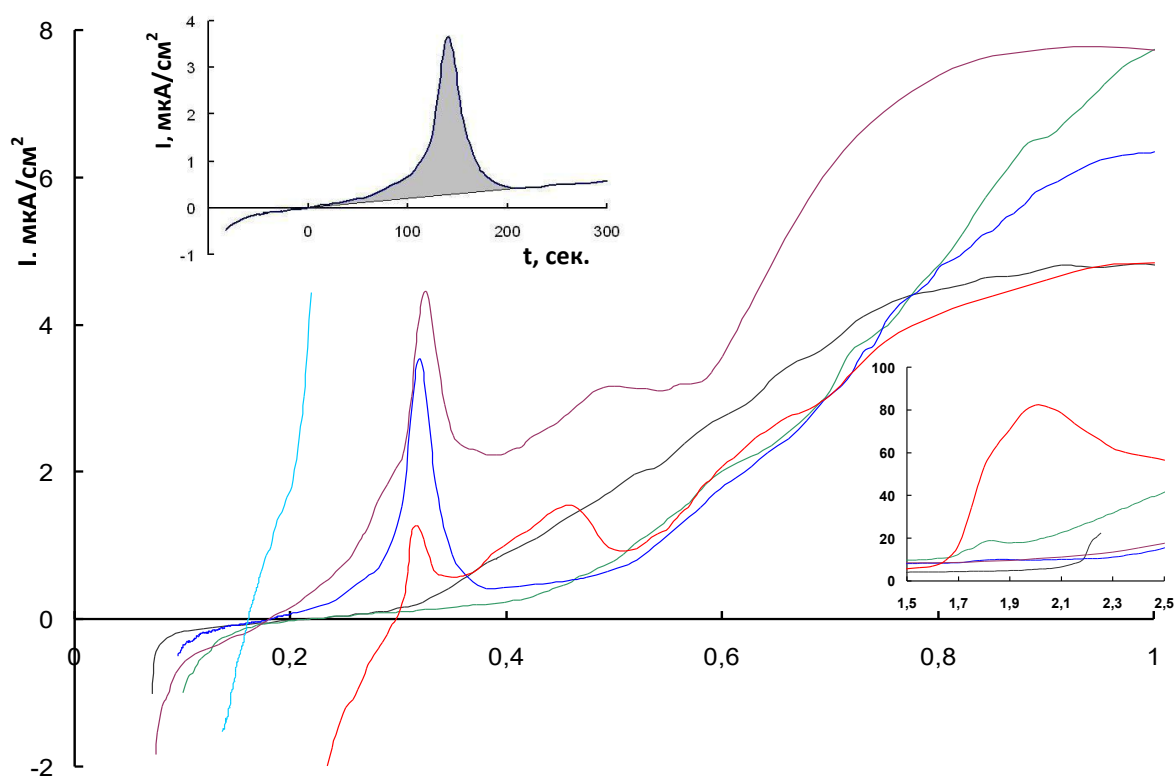


Рисунок 22 - Поляризационные кривые покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag

Для покрытия TiCaPCON характерно устойчивое пассивное состояние при малой поляризации. При потенциалах положительнее 0,4 В наблюдается активационный пик плотности тока, связанный с процессом окисления

титана. При поляризации более 1,6 В на поверхности покрытия формируется устойчивая оксидная пленка (рисунок 22, вставка). Анодное поведение покрытия с содержанием Ag 0,4 % мало отличается от покрытия без Ag. В области потенциалов менее +0,7 В плотность анодного тока покрытия TiCaPCON-0,4ат.%Ag оказалось даже чуть меньше, чем для покрытия TiCaPCON. Возможно, это связано с более толстой пассивной пленкой, сформировавшейся в присутствии эффективных катодов, которыми являются наночастицы Ag. Однако при большей поляризации, в диапазоне потенциалов 0,8-2,5 В, плотность анодного тока существенно больше чем у материала основы (TiCaPCON), что свидетельствует об ухудшении защитных свойств пассивной пленки. Анодные кривые покрытий с содержанием Ag 1,2% и 4,0% отличаются наличием пика анодного растворения Ag. Последующее снижение тока может быть связано с двумя факторами: полным растворением наночастиц серебра или образование толстой пассивной пленки. Анодное поведение покрытия TiCaPCON-Ag, полученного методом ионной имплантации, аналогично поведению покрытия TiCaPCON-4%Ag, полученного со-осаждением.

3.6. Смачиваемость поверхности покрытий

При разработке новых материалов возникает вопрос о смачиваемости или степени гидрофильности их поверхности, поскольку эта характеристика имеет большое значение для биосовместимости. Смачивание определяет поведение клеток (адгезию, пролиферацию и др), а изменение рельефа и химического состава поверхности – основные факторы, определяющие смачиваемость поверхности. О гидрофильности поверхности можно судить по величине краевого угла смачивания между поверхностью покрытия и смачивающей жидкостью. Установка имплантата подразумевает его нахождение на воздухе в течение некоторого промежутка времени (после извлечения из упаковки), вследствие чего на его поверхности могут адсорбироваться примеси. В связи с этим интерес представляет изучение

краевого угла смачивание не только после нанесения покрытия, но и после его выдержки на воздухе.

Измерения краевого угла смачивания методом лежащей капли показали, что все покрытия после напыления являются гидрофильными. Угол смачивания составляет 38-61°. Легирование серебром немного повышает значения краевого угла смачивания. Покрытия сохраняют гидрофильные свойства в течение 3 часов хранения на воздухе.

Таблица 9 – Краевой угол смачивания покрытий

№ образца	Время после напыления			
	5 минут	1 час	3 часа	3 дня
TiCaPCON	44±1	48±2	50±1	63±1
0,4% Ag	47±1	51±1	56±4	58±2
1,2% Ag	61±13	60±4	94±4	74±14
3,0% Ag	50±3	55±2	55±1	64±2
4,0% Ag	53±1	57±2	68±4	70±1

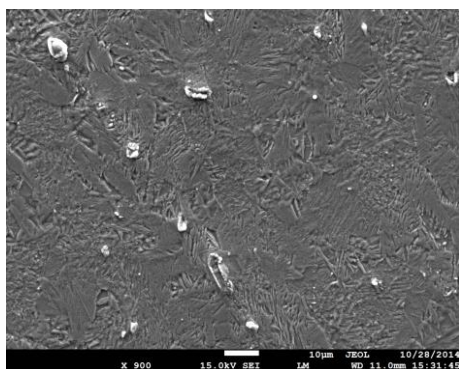
3.7 Исследование биоактивности покрытий TiCaPCON-Ag в растворе, имитирующей внутреннюю среду организма

Биоактивность определяют как способность материала образовывать прочную химическую связь на границе раздела биоматериал/живая ткань. Вопросам биоактивности посвящены работы Hench и позднее Ducheyne and Qiu. Образование химической связи включает последовательность химических и биологических процессов на границе имплантат/ткань. Основным свойством биоактивного материала является способность образовывать костноподобный слой гидроксилапатита, посредством которого осуществляется связь с костной тканью. Одним из общепринятых методов оценки биоактивности материалов *in vitro* являются эксперименты в

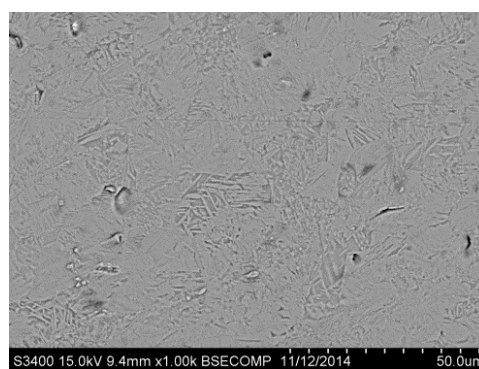
растворах, имитирующих внутреннюю среду организма, и последующий анализ продуктов реакции на поверхности имплантата.

В данном эксперименте было исследовано два типа образцов покрытий TiCaPCON-Ag, полученных методом со-осаждения композиционной мишени и мишени Ag (режим 3, таблица 5) и методом ионной имплантации в предварительно осажденное покрытие TiCaPCON (режим 7, таблица 5). Содержание серебра в покрытиях составило 3%. В качестве контрольных образцов использовались титан, биоактивное стекло Biogran и биоактивное покрытие TiCaPCON.

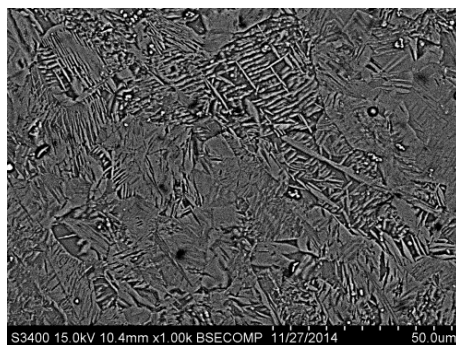
Морфология поверхности покрытий до и после выдержки в растворе представлена на рисунках 23-25. Поверхность покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag, полученных магнетронным распылением, была гладкой и без специфических особенностей (рисунок 23). Выдержка в течение 28 дней привела к образованию иглоподобных структур с длиной игл 10-40 мкм (рисунок 23). Образование аналогичных иглоподобных структур наблюдалось на поверхности покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag. С увеличением времени выдержки, количество вторичных структур, являющихся следствием химической реакции на поверхности имплантата, возрастало. Наибольшие изменения наблюдались в контрольном образце Biogran, поверхность которого уже через 7 дней была плотно усеяна частицами размером 1 мкм (рисунок 26 б). На поверхности контрольной титановой пластины не наблюдалось никаких новообразований (рисунок 26 д).



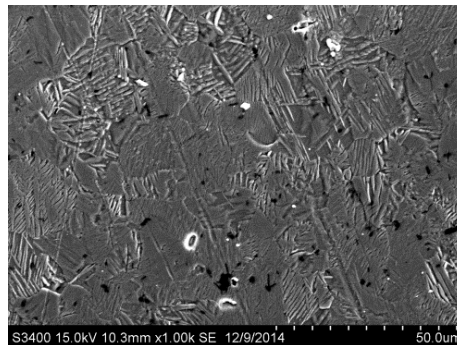
(a)



(б)



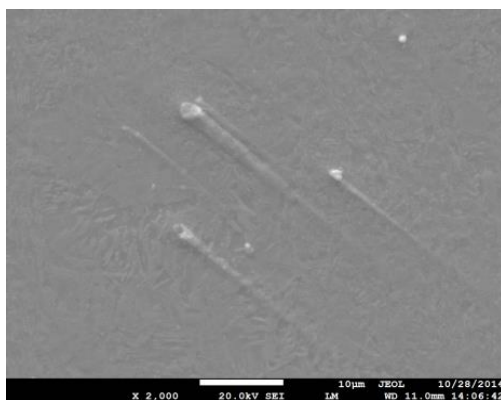
(б)



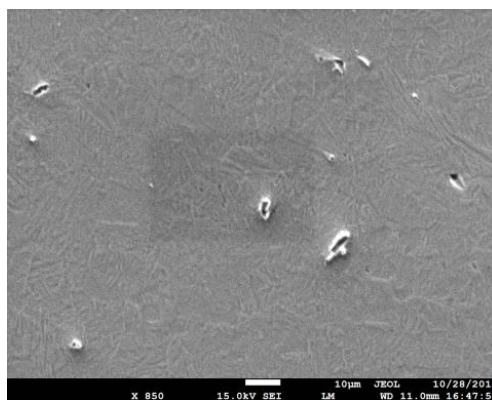
(г)

а - 7 дней, б – 14 дней, в – 21 день, г – 28 дней

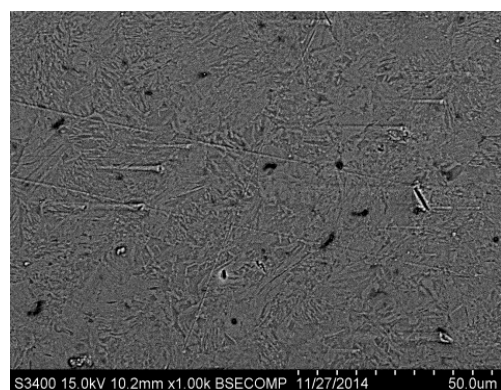
Рисунок23 – Морфология поверхности покрытия TiCaPCON после различного времени выдержки в физиологическом растворе



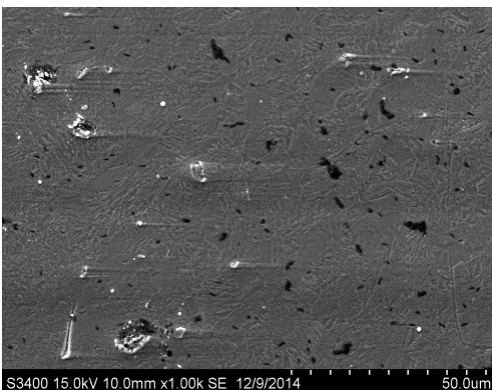
(а)



(б)



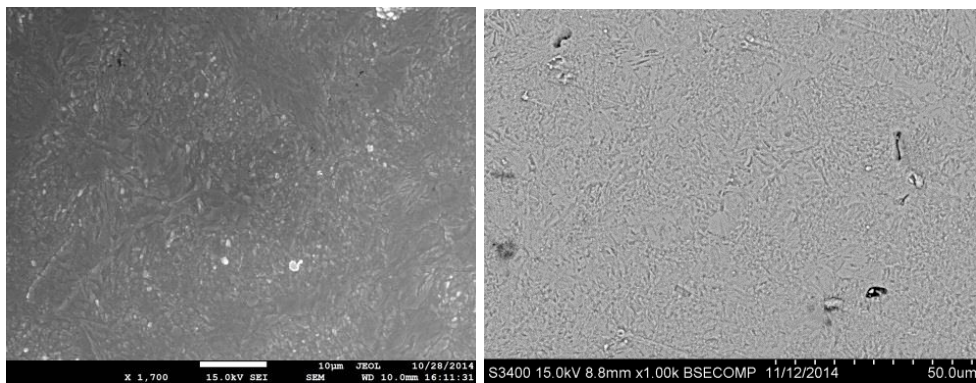
(в)



(г)

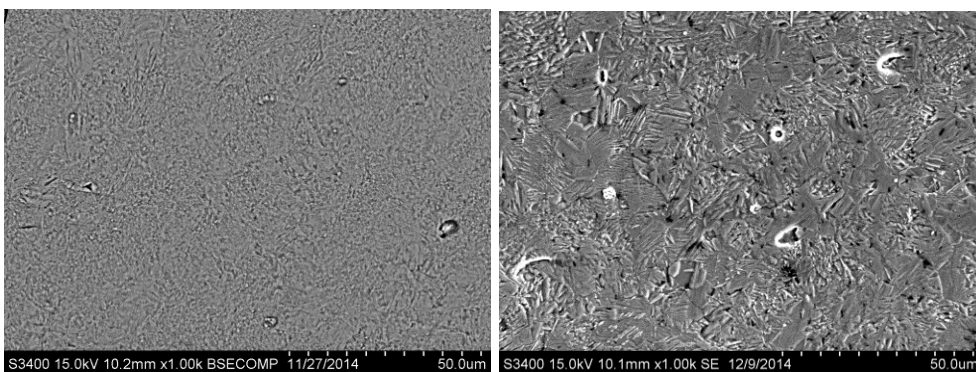
а - 7 дней, б – 14 дней, в – 21 день, г – 28 дней

Рисунок 24– Морфология поверхности покрытия TiCaPCON-Ag, полученного со-осаждением, после различного времени выдержки в физиологическом растворе



(а)

(б)

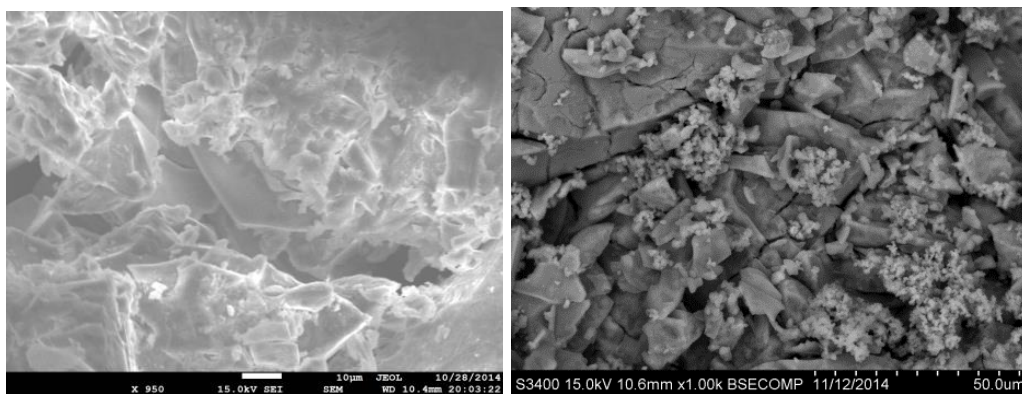


(в)

(г)

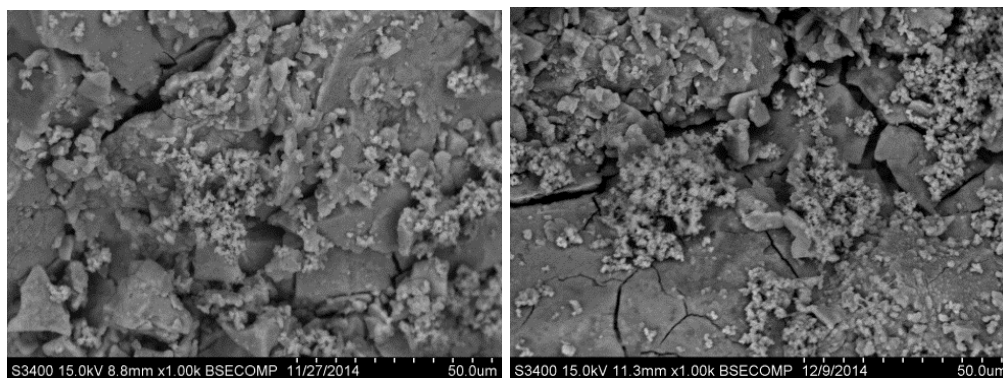
а - 7 дней, б – 14 дней, в – 21 день, г – 28 дней

Рисунок 25– Морфология поверхности покрытия TiCaPCON-Ag, полученного методом ионной имплантации, после различного времени выдержки в физиологическом растворе



(а)

(б)



(В)

(Г)



(Д)

а - 7 дней, б – 14 дней, в – 21 день, г, д – 28 дней

Рисунок 26 – Морфология поверхности контрольных образцов – Biogran (а-г) и титана (д) после различного времени выдержки в физиологическом растворе

На рисунках 27-28 представлены ИК спектры покрытий, полученных магнетронным распылением, и контрольного образца Biogran до и после выдержки в течение 1-28 дней. На рисунки добавлен эталонный спектр порошка ГАП, который характеризуется двумя основными пиками при 600 и 1030 см^{-1} , соответствующими колебаниям фосфатной группы $(\text{PO}_4)^{3-}$. На ИК-спектре Biogran присутствуют два пика от колебаний Si-O и Si-O-Si при 1000 и 470 см^{-1} . После выдержки в течение 7-21 дня на Biogran появляется широкая область поглощения между 790 и 1120 см^{-1} с двумя хорошо разрешаемыми пиками при 940 и 1020 см^{-1} . Интенсивность пика увеличивается с увеличением времени выдержки. Также со временем наблюдается сужение пика и его форма становится близка к ГАП. Уже после

7 дней выдержки на ИК-спектре Biogran наблюдаются пики малой интенсивности при 585 см^{-1} , что соответствует связям Р-О. На формирование кристаллической фазы СаР указывает присутствие пиков при 560 и 605 см^{-1} .

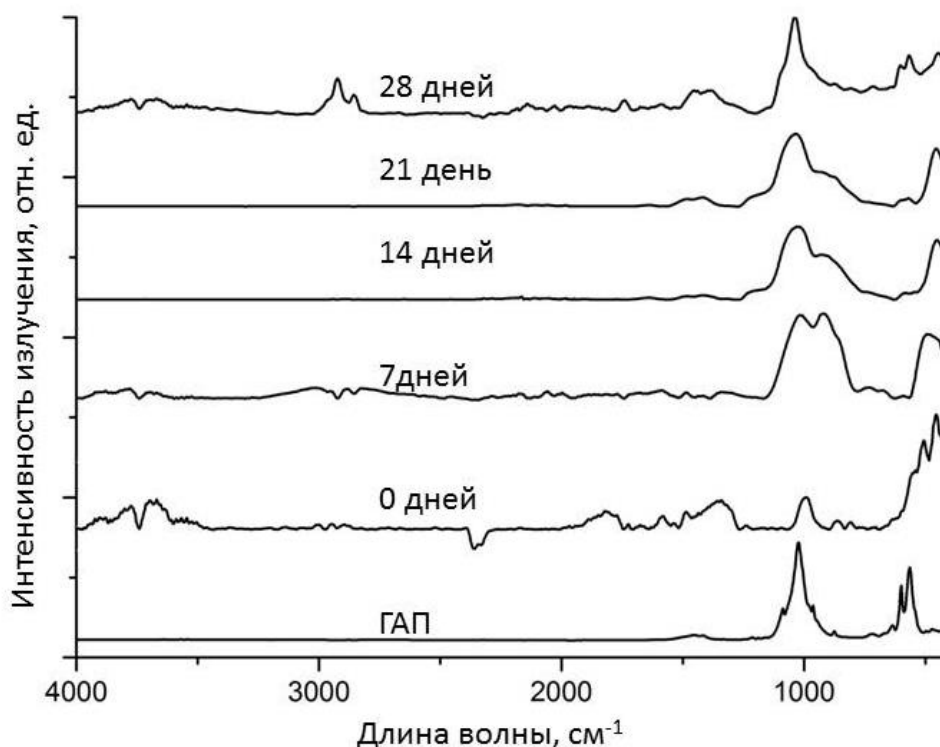
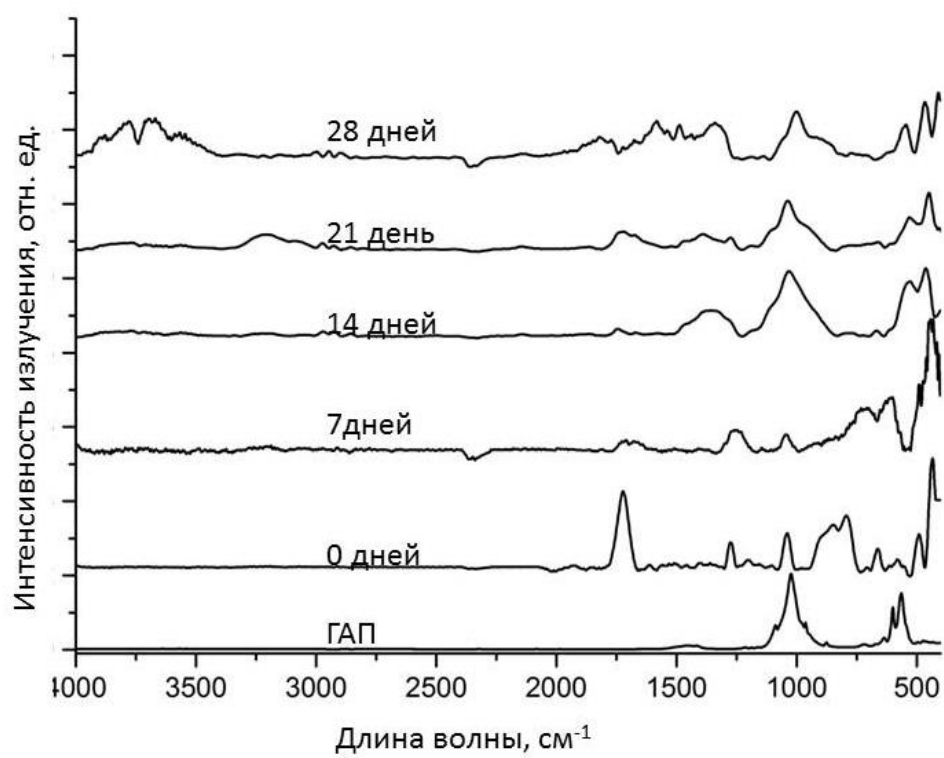
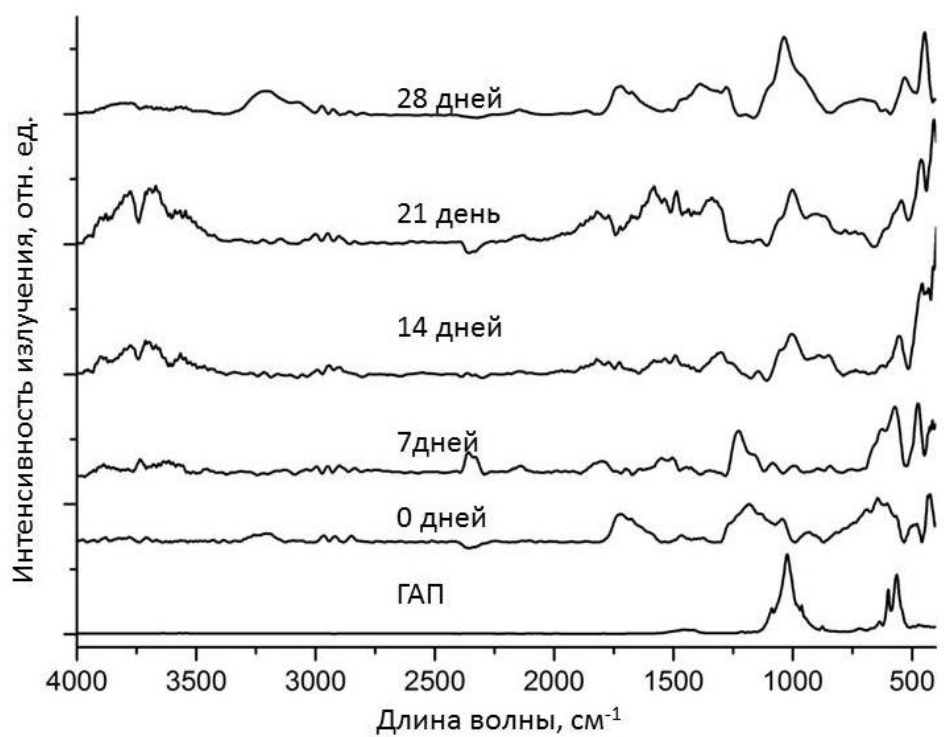


Рисунок 27 – ИК-спектры контрольного образца Biogran до и после выдержки в физиологическом растворе в течение 0-28 дней

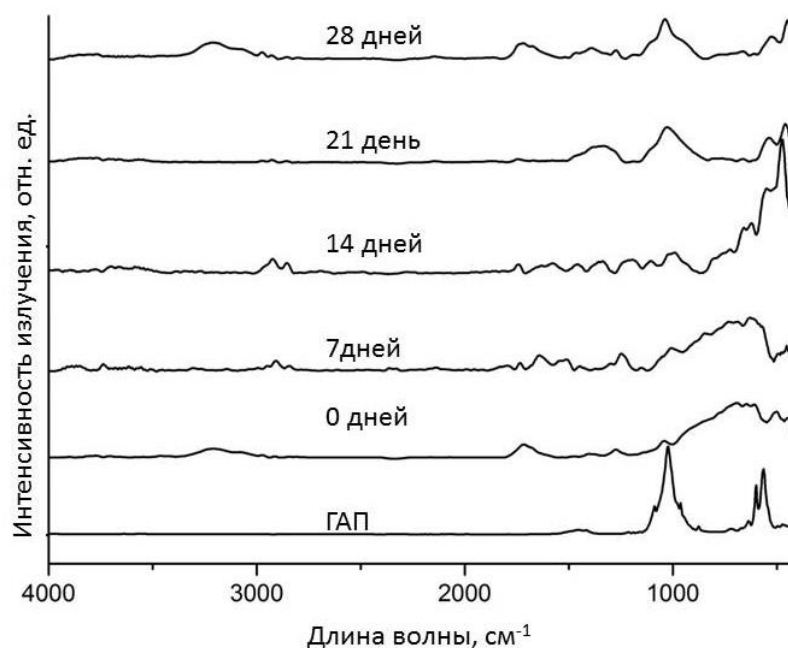
На ИК-спектре покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag основной пик, наблюдаемый при 470 см^{-1} , относится к фазе TiN. Поглощение в области $700\text{--}800\text{ см}^{-1}$ соответствует фазе TiO_2 . Присутствие характерных максимумов при 1030 , 1275 и 1715 см^{-1} свидетельствует о наличии связей C-O, C-N и C=O. Наблюдаемое поглощение в области $1380\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ подтверждает присутствие фазы СаО. О наличии связей Р-О можно судить о присутствии пика при $570\text{--}620\text{ см}^{-1}$. При выдержке в физиологическом растворе покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag, пик от оксида титана почти полностью исчезает через 7 дней. Появление аморфной фазы СаР наблюдается после 14 дней.



(а)



(б)



(в)

Рисунок 28 – ИК-спектры покрытий TiCaPCON (а) и TiCaPCON-Ag (б,в), полученных путем введения серебра методом ионной имплантации (б) и со-осаждением (в) до и после выдержки в физиологическом растворе течение 0-28 дней

Для анализа приповерхностного слоя покрытий был использован метод ОЭСТР, который позволяет получить профили распределения элементов по глубине покрытия (рисунок 29). Результаты ОЭСТР подтверждают образование на поверхности тонкого слоя, обогащенного Са и Р, после выдержки в физиологическом растворе.

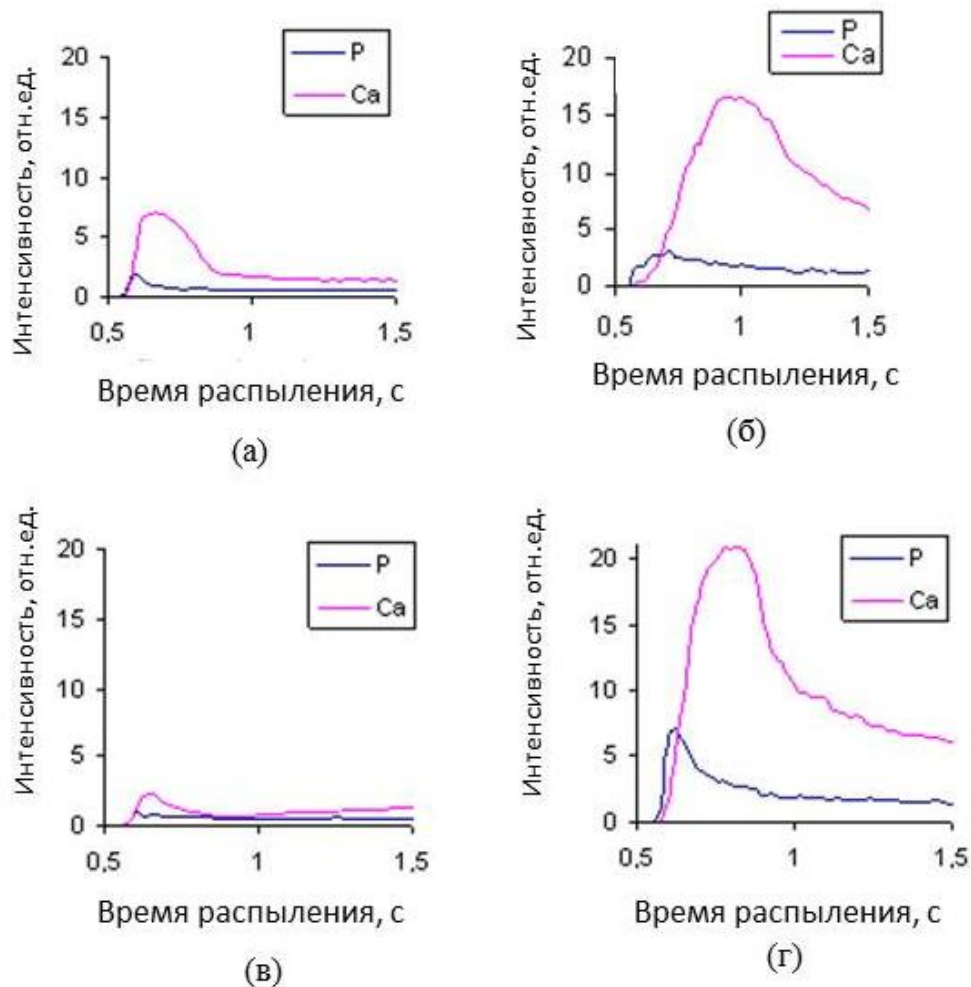


Рисунок 29 – Распределение элементов Ca и P по глубине покрытий TiCaPCON (а, б) и TiCaPCON-Ag (в, г) до (а, в) и после 28 дней выдержки в физиологическом растворе (б, г).

Для изучения фазового состава образовавшихся микроструктур, поверхность покрытий исследовали методом РФА через 28 дней. На дифрактограмме покрытия присутствуют пики кубической решетки TiCN. При съемке «в скользящем пучке» пики от подложки полностью исчезают, в то время как в области $37-42^\circ$ наблюдается появление дополнительных пиков от TiO_2 . Еще одной отличительной особенностью дифрактограммы, полученной «в скользящем пучке», является наличие широкого интенсивного максимума в диапазоне $10-15^\circ$. Положение данного пика соответствует тетрагональной решетке фазы фосфата кальция (002) ($\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_7$, ICDD №. 88-1320, 80-0410, and 44-0368).

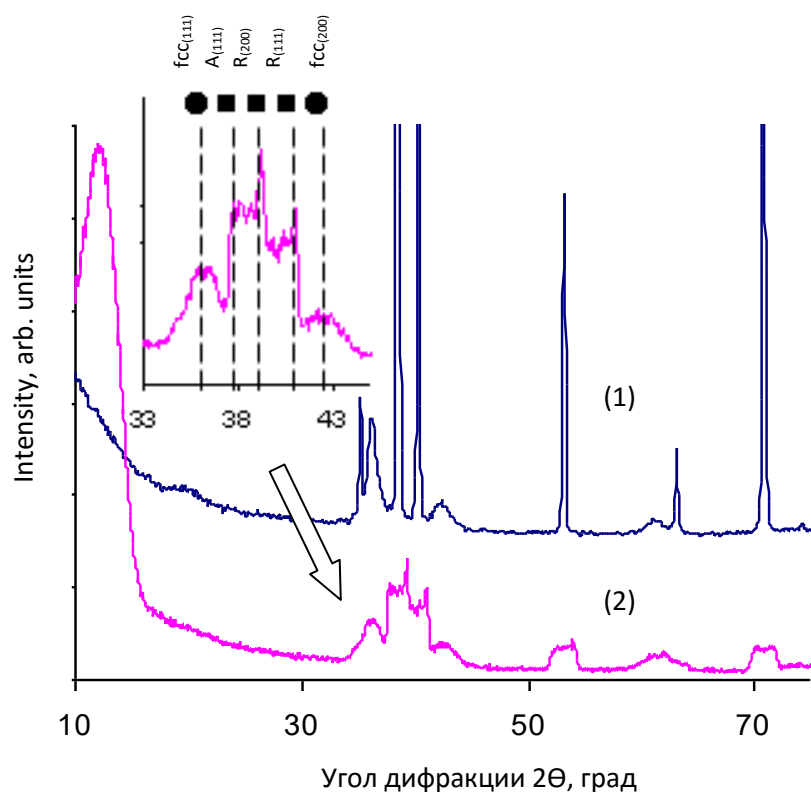


Рисунок 30– Дифрактограмма покрытия TiCaPCON после выдержки в физиологическом растворе в течение 28 дней. (●) Ti(C,N), (■) TiO₂ (A - анатаз, R –рутил). (1) – классическая съемка; (2) метод скользящего пучка.

При легировании серебром покрытий TiCaPCON, на дифрактограмме наблюдается два дополнительных пика в области 38-40°, соответствующих металлическому серебру (111) и оксиду титана ((004) анатаз) (рисунок 31).

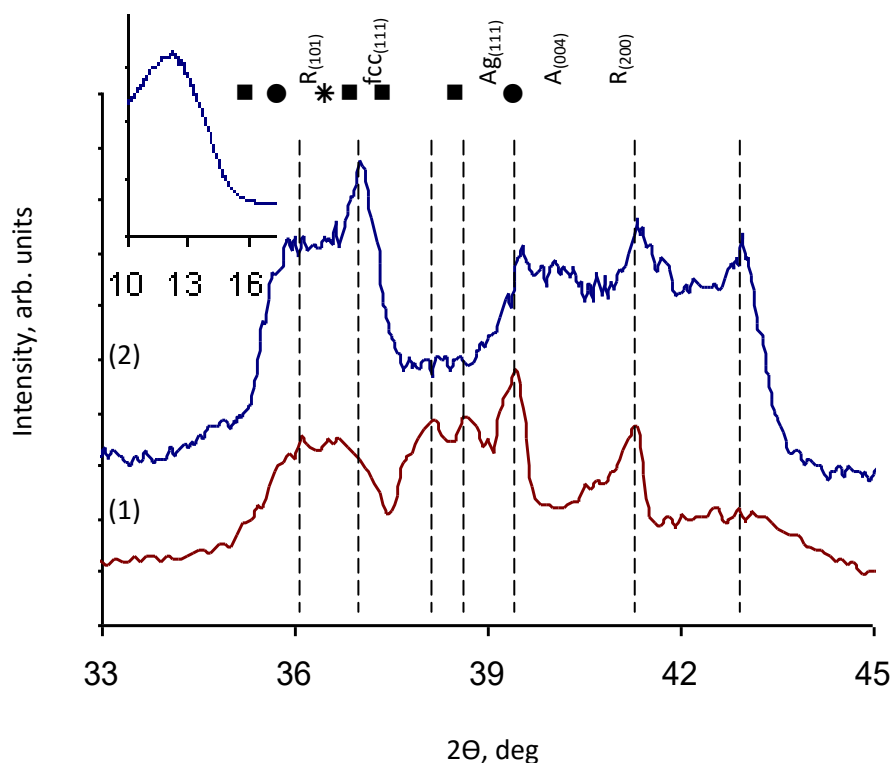


Рисунок31 – Дифрактограмма покрытий TiCaPCON-Ag после выдержки в физиологическом растворе в течение 28 дней (●) TiCN, (■) TiO₂ (A- анатаз, R-рутил), (*) Ag. (1) – режим 3; (2) – режим 7

Полученные результаты свидетельствуют о том, что поверхность покрытий является биоактивной и способствует образованию слоя апатита в процессе выдержки в физиологическом растворе в течение 14 дней. После выдержки в течение 28 дней поверхность покрытий полностью покрывается слоем апатита, что объясняется особенностями структуры покрытий: нанокomпозиционная структура с большим количеством границ раздела; наличие аморфной фазы, содержащей Ca, P и O; присутствие на поверхности гидроксильных и карбоксильных групп; отрицательный заряд поверхности.

Глава 4. Кинетика выхода бактерицидного компонента

4.1 Влияние элементного состава поверхности на кинетику выхода серебра

При разработке новых видов бактерицидных материалов, предназначенных для замены поврежденных участков костной ткани, желательно обеспечить высокий выход ионов серебра в первые часы после имплантации во избежание образования бактериальной биопленки, и затем поддержание концентрации серебра на некотором минимальном уровне для предотвращения адгезии бактерий. При изучении выхода ионов серебра из покрытий с различным содержанием серебра в физиологический раствор (рисунок 32), было установлено, что покрытия с 0,4 и 1,2% серебра имеют схожую кинетику. В первый день в ФР выходит около 25 мкг/л, после чего скорость выхода серебра снижалась и составляла 1,5-3 мкг/л/день. Покрытия с 4% Ag продемонстрировало более быстрое высвобождение Ag в течение первых суток выдержки в растворе. Далее скорость выхода серебра уменьшается до значений 25 мкг/л/день, что, однако, на порядок выше скорости выхода для покрытий с меньшим содержанием серебра. Средняя скорость выхода серебра для покрытий TiCaPCON-Ag с содержанием серебра 0,4, 1,2 и 4% составила 8, 12 и 64 мкг/л/день.

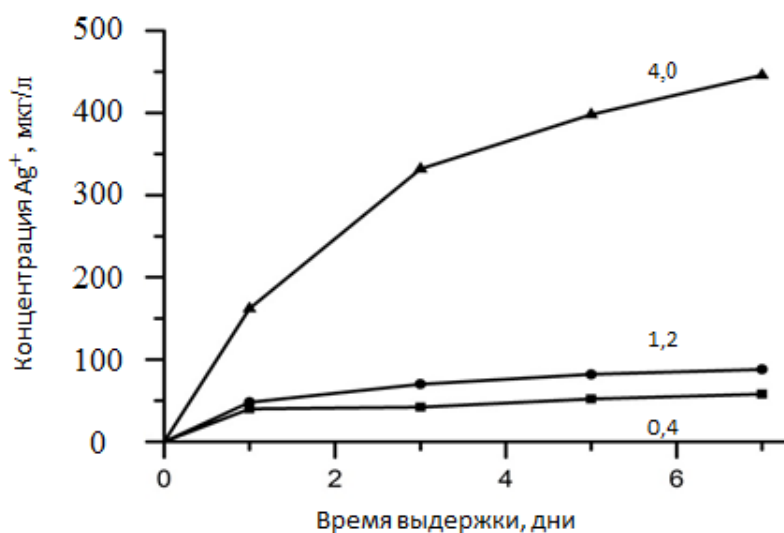


Рисунок 32 - Выход ионов серебра с поверхности покрытий TiCaPCON-Ag с содержанием серебра 0,4, 1,2 и 4%.

4.2 Влияние шероховатости поверхности на кинетику выхода серебра

Для того чтобы достичь более высоких концентраций ионов серебра в растворе, покрытие TiCaPCON-Ag было нанесено на подложки с развитым рельефом поверхности, полученные методом импульсной электроискровой обработки (ИЭО). Среднее значения шероховатости составляло 10 мкм. Сравнение выхода ионов серебра с гладкой и шероховатой подложек показано на рисунке 33.

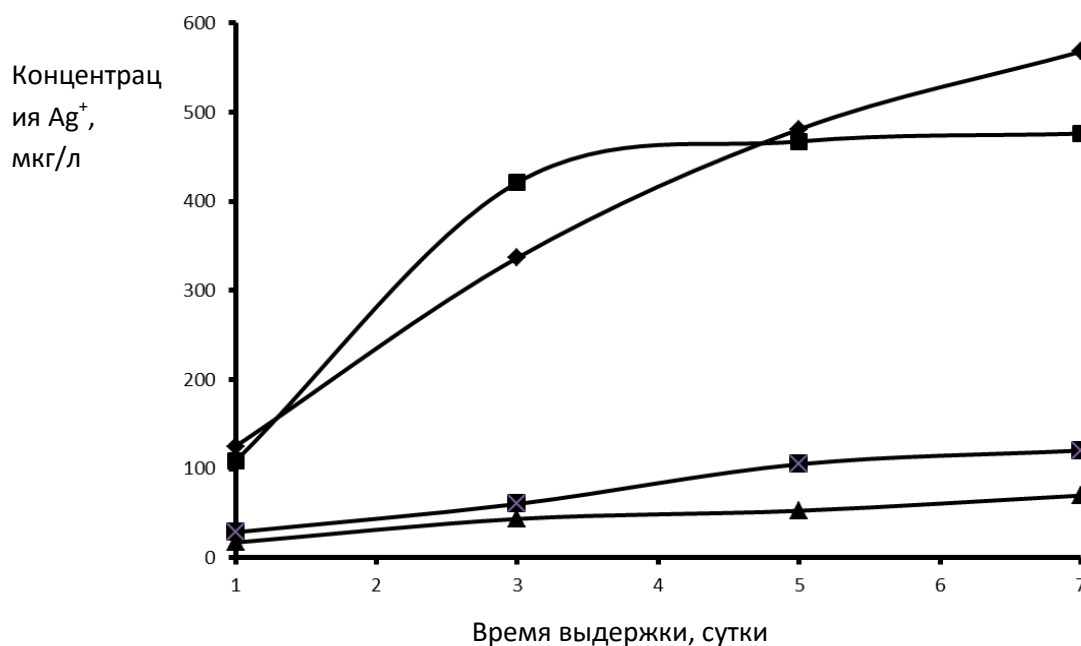


Рисунок 33 — Выход ионов серебра с поверхности покрытий TiCaPCON-Ag с содержанием Ag 1% (1) и 2% (2), осажденных на полированную (1,2) и шероховатую подложки (3,4).

Для покрытий TiCaPCON-Ag, нанесенных на полированный Ti, количество вышедших в раствор ионов, слабо зависело от исходной концентрации серебра (кривые 1 и 2). Так, средняя скорость выхода ионов серебра составила 10 и 17 мкг/л*день для покрытий с содержанием 1 и 2% серебра соответственно. Отличия в концентрациях серебра стали заметны на 5 день, однако на 7 дней содержание серебра в ФР для обоих образцов

совпадало. Отметим, что для образца с 2% Ag начиная с 5 дня выход ионов серебра с поверхности практически полностью прекращается.

Гораздо большее влияние на кинетику выхода серебра оказывала шероховатость поверхности подложки (кривые 3 и 4). Так, для покрытий, осажденных на Ti подложки после ИЭО, уже в первый день концентрация ионов серебра в физиологическом растворе достигла 100 мкг/л, на что, в случае полированных подложек, потребовалось 7 дней. Стоит отметить, что, в случае ИЭО-модифицированных подложек, кинетика выхода серебра из покрытий с содержанием серебра 1 и 2 ат.% существенно различалась. В первые 3 дня для обоих образцов наблюдался примерно одинаковый выход ионов серебра на уровне ~ 100 мкг/л в сутки, однако, начиная с 5 дня выход ионов серебра из покрытия с более высоким его содержанием практически полностью прекратился. Средняя скорость выхода ионов серебра с поверхности покрытий TiCaPCON-Ag с содержанием серебра 1 и 2%, осаждённых на шероховатые подложки, составила 68 и 81 мкг/л/день соответственно.

Для анализа причин замедления и прекращения выхода серебра с поверхности покрытий TiCaPCON-2,5ат.%Ag, были проанализированы их ОЭСТР спектры после выдержки в ФР, представленные на рисунке 34. Полученные результаты свидетельствуют о том, что поверхность обедняется серебром вследствие растворения наночастиц серебра. Так пик серебра, наблюдаемый в исходном образце (рисунок 34 а), существенно уменьшается через 3 суток (рисунок 34 б) и практически полностью исчезает через 7 дней (рисунок 34 в).

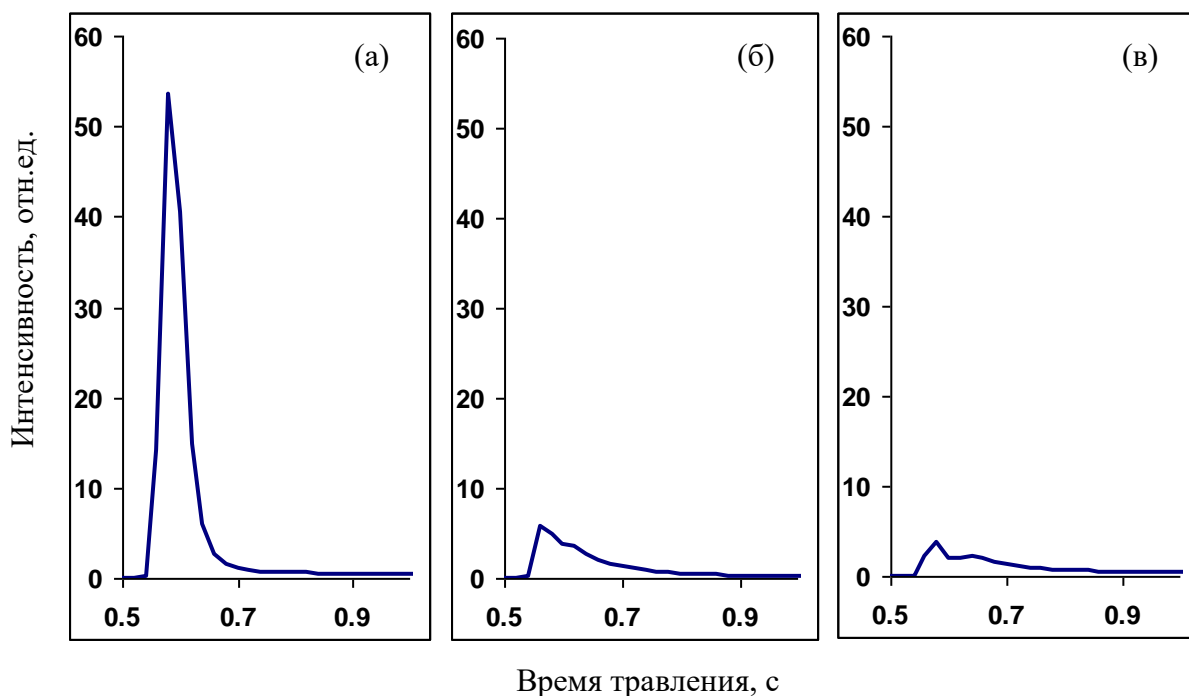
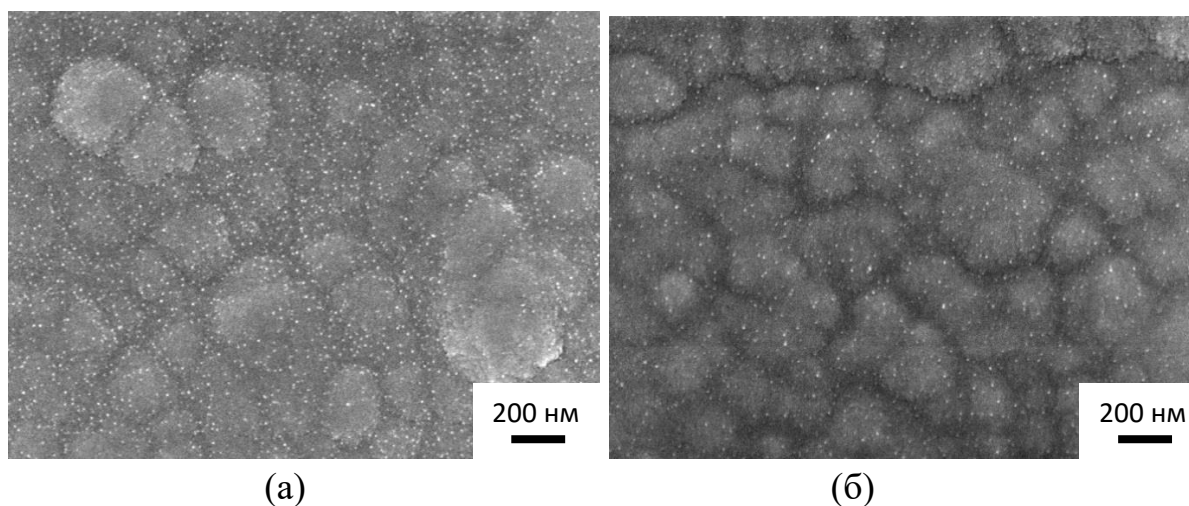


Рисунок 34- Профили распределения серебра по глубине покрытий. (а) Исходный, после выдержки (б) 3 дня и (в) 7 дней в ФР.

На рисунке 35 представлены изображения поверхности покрытий TiCaPCON-2,5at%Ag, осажденных на гладкую и шероховатую поверхности титана, после выдержки в растворе NaCl в течении 3 и 7 дней. Видно, что в случае гладкой Ti подложки растворение большей части наночастиц серебра с поверхности покрытий происходит в течение 7 дней (рис. 35б), тогда как в случае ИЭО-модифицированной подложки существенное уменьшение плотность наночастиц наблюдается уже через 3 дня (рис. 35в).



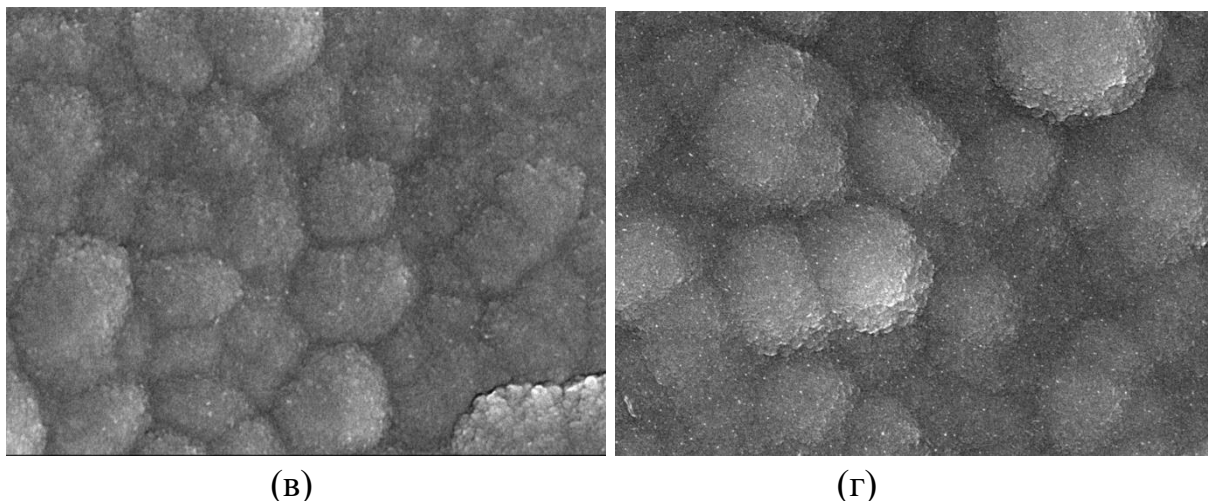


Рисунок 35 - СЭМ изображения структуры поверхности покрытий TiCaPCON-2,5at%Ag, осажденных на гладкую (а, б) и ИЭО-модифицированную Ti подложку (в, г) после 3 (а,в) и 7 (б, г) дней выдержки в растворе NaCl.

Выход ионов серебра с поверхности покрытия в раствор вследствие растворения наночастиц серебра является лишь одним из типов химических реакций, протекающих на границе раздела покрытие/ФР. Известно, что, в случае биоактивной поверхности, погружение образца в ФР может приводить к последовательности химических реакций, связанных с образованием на поверхности фаз на основе фосфата кальция [14]. На рисунке 36 представлены ИК-спектры покрытия TiCaPCON-Ag, осажденного на гладкую титановую подложку до и после выдержки в растворе NaCl в течение 3 и 7 дней. После выдержки в ФР наблюдается существенное усиление интенсивности полос поглощения в диапазоне 900-1100 и 1300-1500 см^{-1} , что свидетельствует о присутствии на поверхности фосфатных $(\text{PO}_4)^{3-}$ групп и оксида кальция (CaO). Оксид серебра обычно имеет характерный пик в положении 530 см^{-1} . Появление этого пика на спектре покрытия TiCaPCON-Ag, помещенного в раствор NaCl в течении 3 дней, свидетельствует о том, что, помимо растворения, частицы серебра подвергаются окислению. Через 7

дней интенсивность пика заметно снижается, что, по-видимому, связано с уменьшением плотности частиц на поверхности образца (рисунок 36).

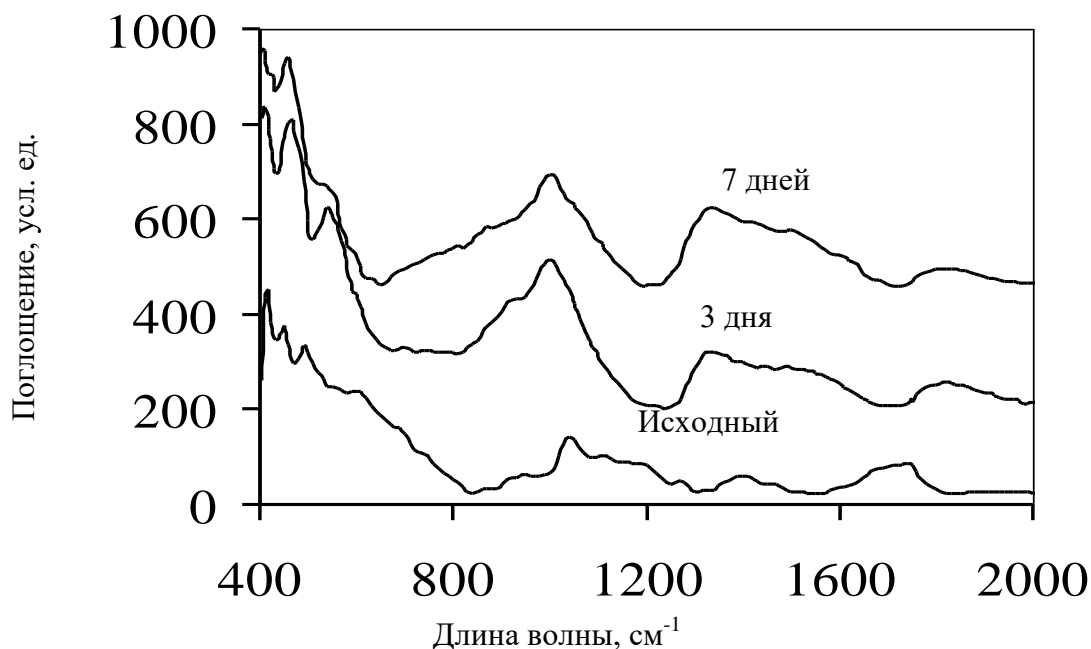


Рисунок 36- ИК-спектры покрытия TiCaPCON-Ag, осажденного на гладкую подложку

4.3. Влияние наночастиц серебра на кинетику выхода ионов серебра

При получении покрытий, легированных серебром, было установлено, что бактерицидный компонент либо равномерно растворен в объеме покрытия, либо аккумулируется на поверхности в виде металлических наночастиц. В результате концентрация серебра у поверхности оказывается во много раз выше, чем в объеме. Известно, что ионы серебра обладают способностью вызывать гибель бактерий, однако роль наночастиц серебра в этом процессе требует дополнительного изучения. Поэтому в рамках работы ставилась задача изучения кинетики выхода серебра не только в зависимости от его концентрации в покрытии, но и от наличия или отсутствия наночастиц серебра на поверхности.

Для получения покрытий с различным распределением серебра у

поверхности (с одинаковой концентрацией в объеме) были получены две группы покрытий. Покрытия первой группы получали методом со-осаждения при одновременной работе магнетрона (мишень TiCaPCON) и ионного источника распыления Ag (режим 3, таблица 5). Вторая группа покрытий была получена путем ионной имплантации Ag в ранее осажденное TiCaPCON покрытие (режим 7, таблица 5). Как видно из рисунка 37, на котором представлены профили распределения элементов по толщине покрытия, на поверхности наблюдается высокий концентрационный пик, который связан с присутствием наночастиц Ag. Также ряд образцов был подвергнут дополнительному ионному травлению для удаления наночастиц Ag с поверхности (режимы 5, 9, таблица 5). В результате независимо от метода введения Ag в состав покрытия интенсивность концентрационного пика у поверхности существенно уменьшилась.

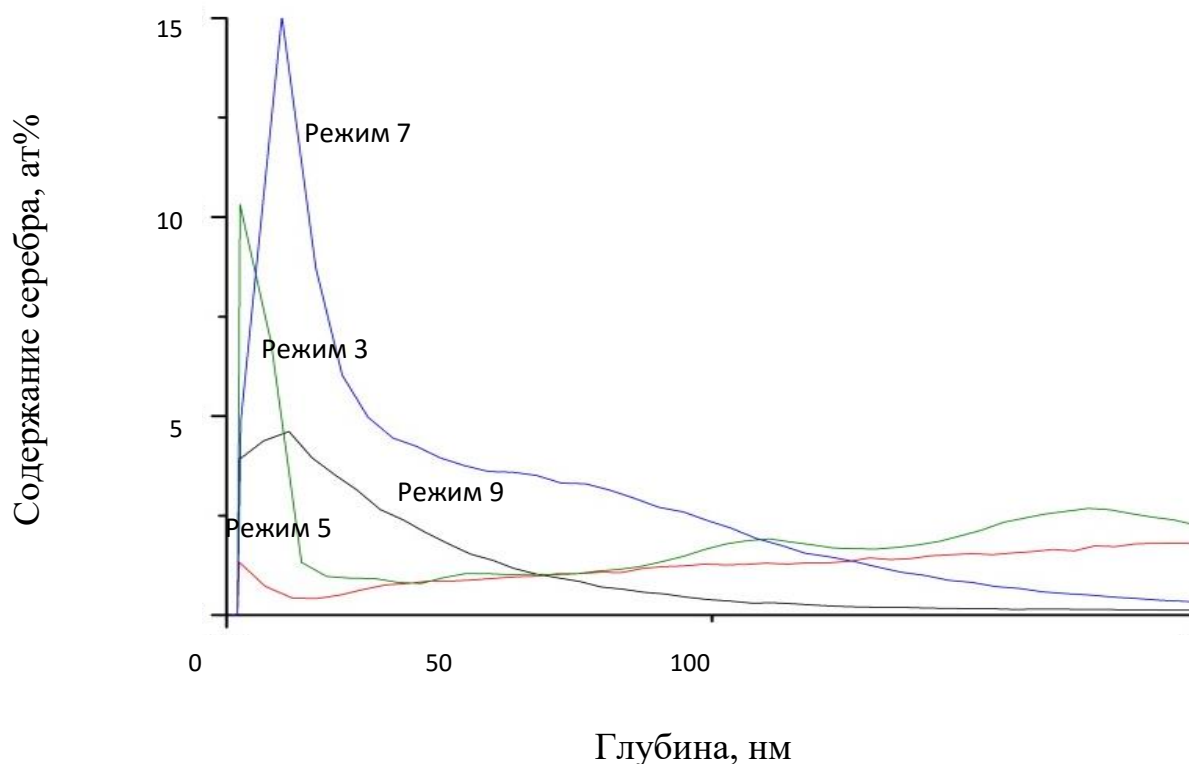
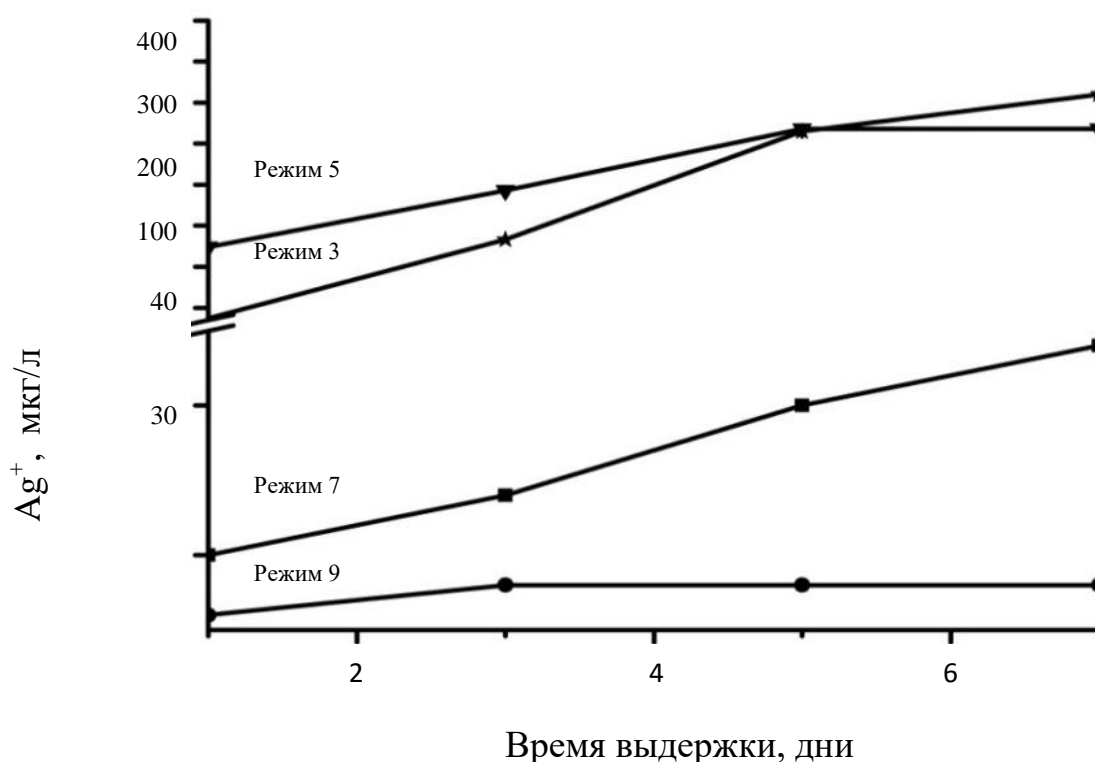


Рисунок 37 - Профили распределения серебра по толщине покрытий TiCaPCON – Ag до и после ионного травления.

На рисунке 38 представлена кинетика выхода ионов серебра с поверхности покрытий TiCaPCON-Ag при введении серебра различными методами. В случае введения серебра методом ионной имплантации (режим 7) за 7 дней концентрация серебра в ФР достигает 44 мкг/л. При дополнительном ионном травлении скорость выхода, а также общее количество ионов в ФР снижается (режим 9). Более интенсивный выход серебра наблюдается при введении серебра методом со-осаждения (режим 3). Максимальная концентрация наблюдается также на 7 день выдержки, однако составляет 300 мкг/л.



на первых этапах выдержки 1-3 дней (режим 9).

Рисунок 38 – Выход ионов серебра с поверхности покрытий TiCaPCON-Ag

Отметим, что покрытие, полученное по режиму 5, на поверхности которого нет наночастиц Ag, демонстрирует более интенсивный выход ионов серебра на начальных этапах выдержки. Это объясняется более легким выходом ионов серебра из объема покрытия, где часть атомов может

находится в свободном состоянии по границам зерен, чем из наночастиц, которые выступают в роли диффузионного барьера для выхода серебра с поверхности пленки.

Также определенное влияние оказывает и шероховатость покрытий. В таблице 10 представлены значения среднеарифметического значения шероховатости поверхности (R_a) покрытий до и после выдержки в физиологическом растворе. Среднее значение R_a покрытий 7 и 9 (Таблица 10) составляет 7,2-7,6 нм и практически не меняется после выдержки. Для покрытий, полученных методом со-осаждения (покрытия 3 и 5) характерны более высокие значения шероховатости, которые уменьшаются с 9-10 до 7-8 нм в процессе выдержки в ФР. Как показывают результаты измерений, покрытия 3 и 5 имеют более развитую поверхность, чем образцы 7 и 9, что может ускорять выход ионов серебра.

Таблица 10 – Шероховатость покрытий

№ режима	S_a после осаждения, нм	S_a после выдержки в физиологическом растворе, нм
7	7,2±0.2	7,4±1.6
9	7,5±0.5	7,6±0.4
3	10,2±0.2	8,5±0.5
5	9,0±0.8	6,8±1.2

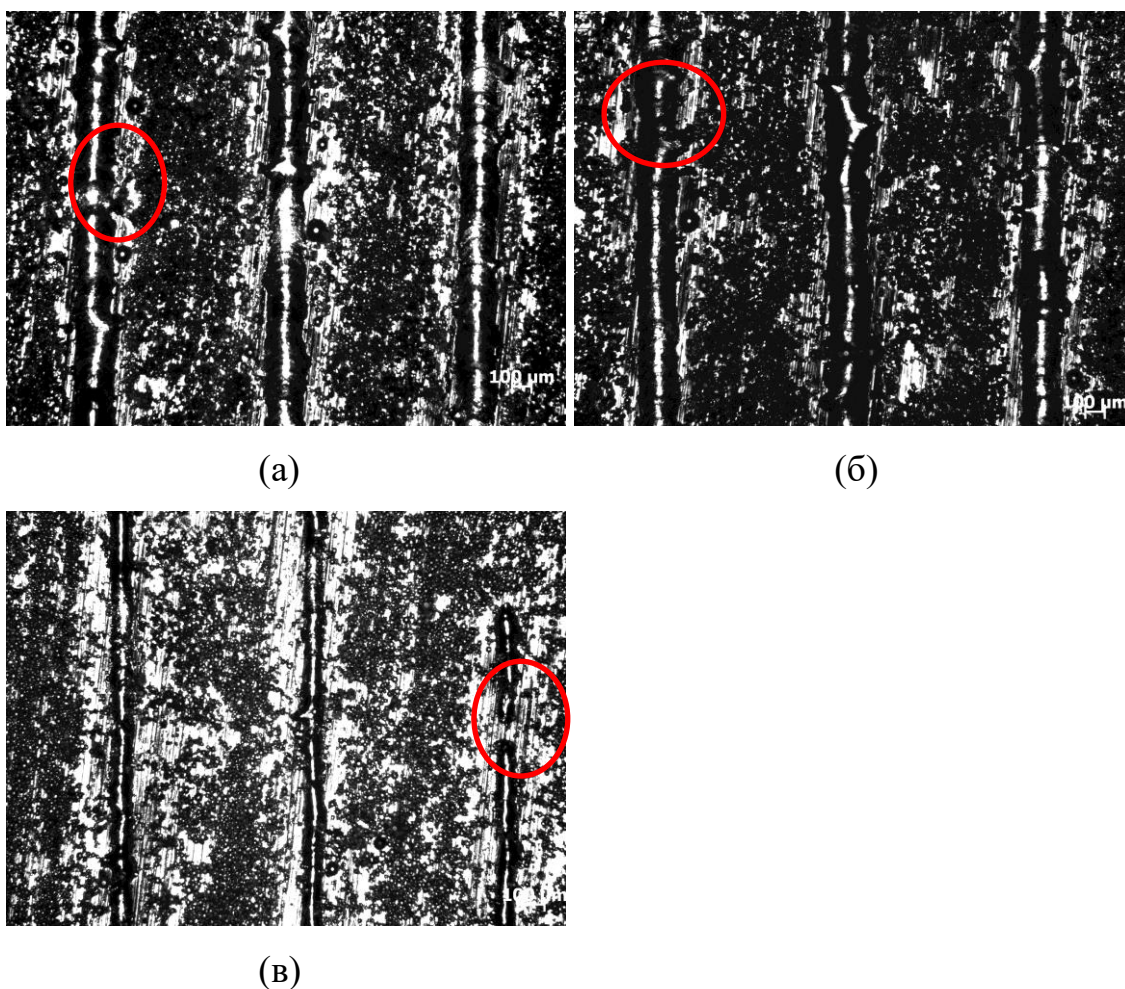
Из полученных результатов следует вывод о том, что кинетика выхода ионов серебра с поверхности материала определяется рядом факторов: концентрацией серебра на поверхности, наличием и плотностью распределения наночастиц серебра на поверхности, шероховатостью подложки. В тоже время, полученные результаты свидетельствуют о том, что путем подбора концентрации серебра, типа его агломерации (наночастицы

или атомарное серебро в объеме покрытия) и шероховатости поверхности можно регулировать процесс выхода ионов серебра в биологическую среду.

Глава 5. Разработка покрытий с высокой открытой пористостью для закрепления лекарственного препарата

5.1. Структура покрытий

Для получения поверхности с контролируемым размером пор, необходимо выбрать оптимальный режим спекания, который должен обеспечивать отсутствие зон каплеобразования (рисунок 39 а), стабильность формы трека (рисунок 39 б), предотвращать его прерывание (рисунок 39 в).



а - каплеобразование; б - нестабильность формы трека; в - прерывание трека

Рисунок 39 - Типичные структуры треков, возникающие при спекании в неоптимальном режиме

В качестве контрольного параметра была выбрана ширина трека и ширина оголения подложки. Зона оголения подложки – это та область, с которой происходит сбор порошка для формирования трека. Если зоны оголения подложки двух соседних треков пересекаются, то может наблюдаться «ненасыщение» треков, т.е. недостаточное количество порошка для их формирования. Слишком малые зоны оголения подложек соседних треков также нежелательны, так как в этом случае процесс будет идти с избыточным количеством порошка. Оптимальным случаем является совпадение границ зон оголения подложек соседних треков. В соответствии с результатами измерения, построены графики зависимости ширины треков (w_1) и ширины зоны оголения подложки (w_2) от скорости сканирования, представленные на рисунке 40.

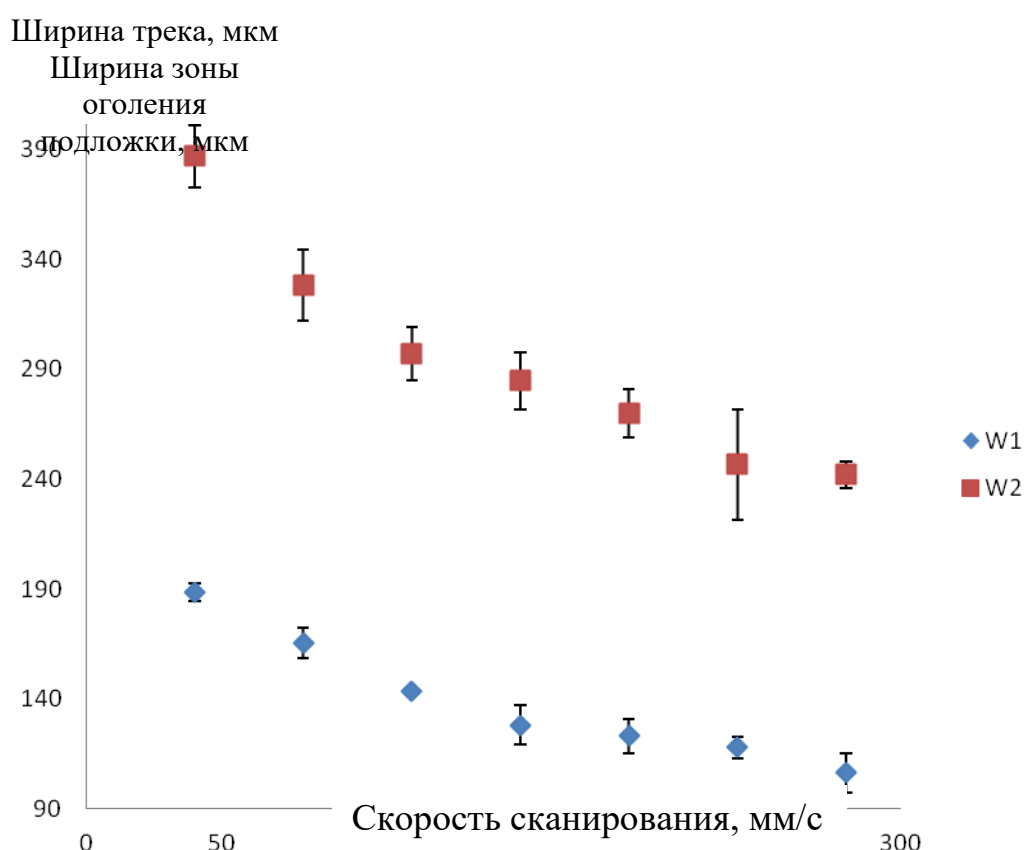
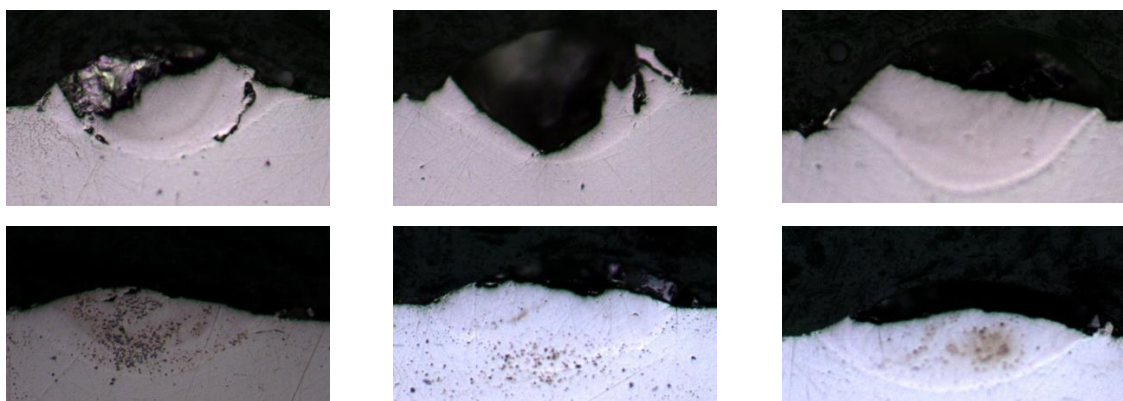
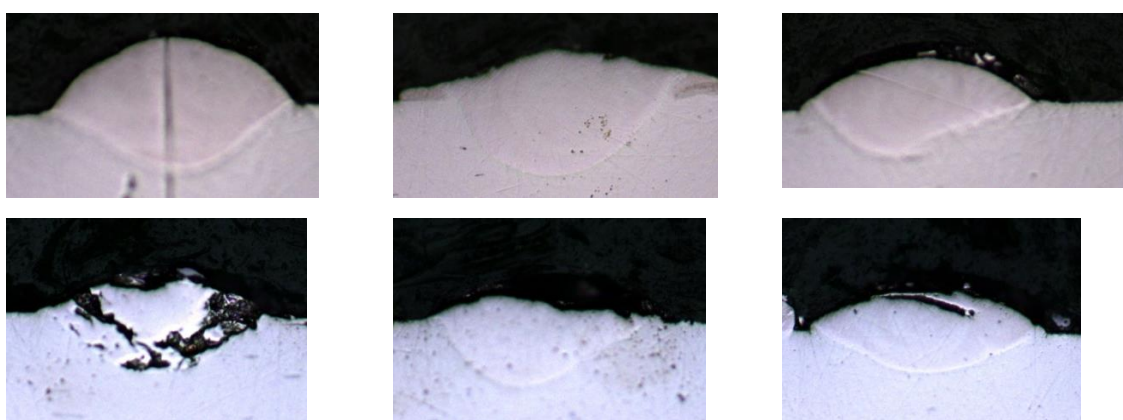


Рисунок 40 – График зависимости геометрических параметров трека w_1 и w_2 от скорости сканирования

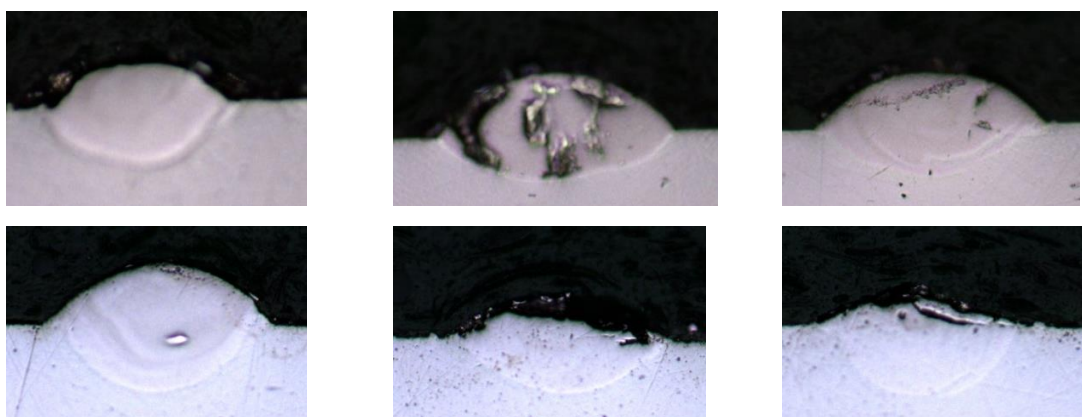
Также была изучена геометрия треков, поперечные сечения которых представлены на рисунке 41.



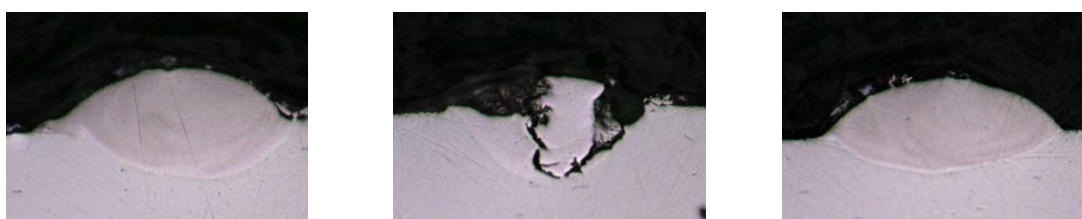
(a)

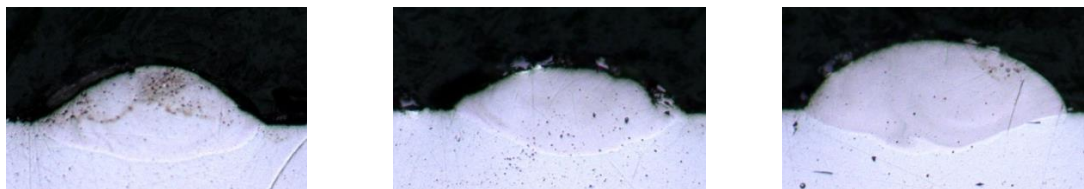


(б)



(B)





а – 80 мм/с; б – 100 мм/с; в – 120 мм/с; г – 140 мм/с.

Рисунок 41 – Оптические изображения поперечного сечения треков в зависимости от скорости сканирования

Результаты измерения геометрии трека представлены в виде графиков зависимости его геометрических параметров от скорости сканирования (рисунок 42). Минимальные значения стандартного отклонения, характерные для всех рассматриваемых параметров, соответствуют скорости сканирования 120 мм/с. Это указывает на стабильность формы треков, полученных в результате спекания при оптимальных условиях.

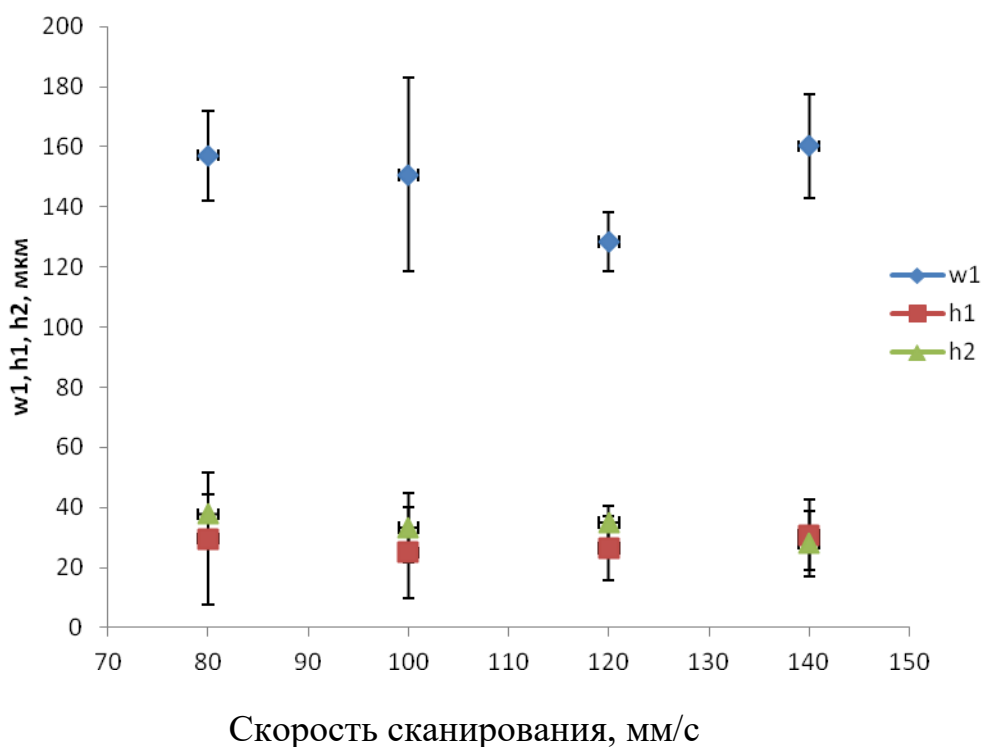


Рисунок 42 – График зависимости геометрических параметров трека от скорости сканирования

Для определения формы и анализа стабильности треков был использован критерий: Fonction Globale Transversale du Cordon (GTC) так называемая целевая функция. Для расчета целевой функции (F) использовалась формула:

$$F = tgD + tgP + tgA$$

$$tgD = \frac{h_1}{w_1 / 2} = \frac{2h_1}{w_1}$$

$$tgP = \frac{h_2}{w_2 / 2} = \frac{2h_2}{w_2}$$

$$tgA = tg \frac{\alpha_1 + \alpha_2}{2}$$

$$F = \frac{2(h_1 + h_2)}{w} + tg(\alpha)$$

Важно было предложить критерий, который учитывает геометрию поперечного сечения треков и на основе этого выявляет диапазон оптимальных параметров. Данный критерий F представляет собой комплексную функцию с целью выявления и анализа устойчивости трека. Первое слагаемое представляет собой "надплавленную зону" трека. Второе слагаемое - "зона проплавления" трека. Третье слагаемое описывает угол контакта. Эмпирически была выведена формула целевой функции F, которая позволяет получить зависимость, учитывающую геометрические характеристики поперечного сечения трека. Если значение целевой функции F слишком большое (значительно выше 1), трек принимает форму «бомбы». Если значение функции F слишком мало (менее 1) форма треков сплюснута. Если значение функции F близко к 1, трек имеет правильные геометрические характеристики. Параметрические графики зависимостей функции F от скоростей сканирования позволяют определить оптимальные параметры процесса. В таблице 11 представлены результаты расчета целевой функции F для разных скоростей сканирования.

Таблица 11 – Результаты расчета целевой функции F для разных скоростей сканирования

V , мм/с	80	100	120	140
F	1,671	1,737	1,372	1,648

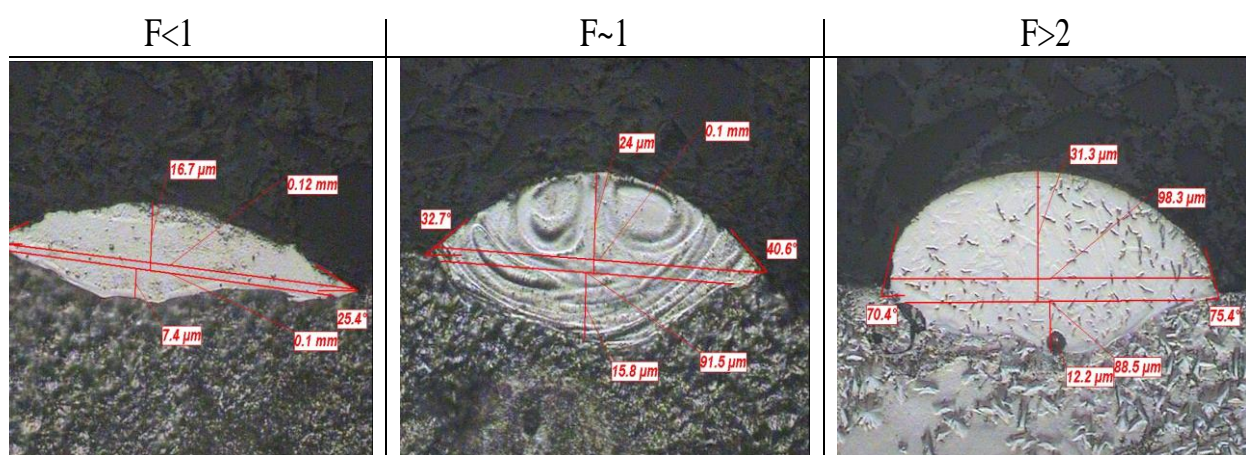


Рисунок 43 – Вид треков при $F < 1$, $F \sim 1$ и $F > 2$

Построим характерную диаграмму для рассматриваемого диапазона скоростей сканирования с указанием значений целевой функции (рисунок 44).

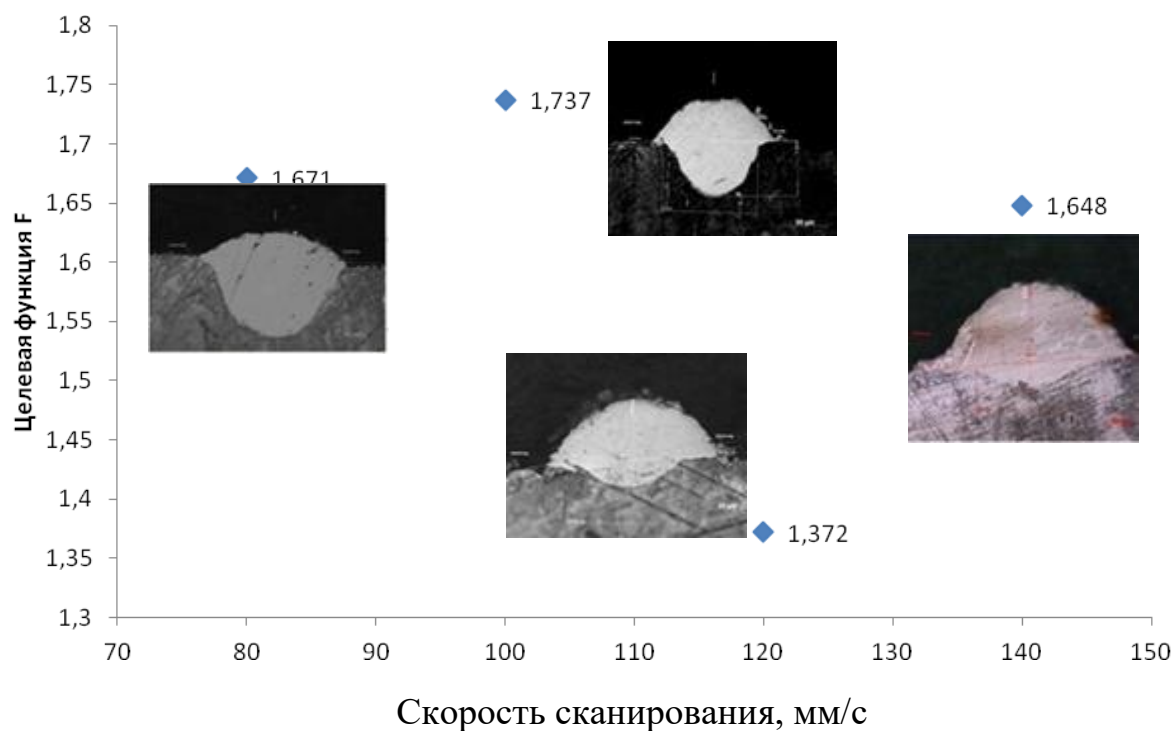
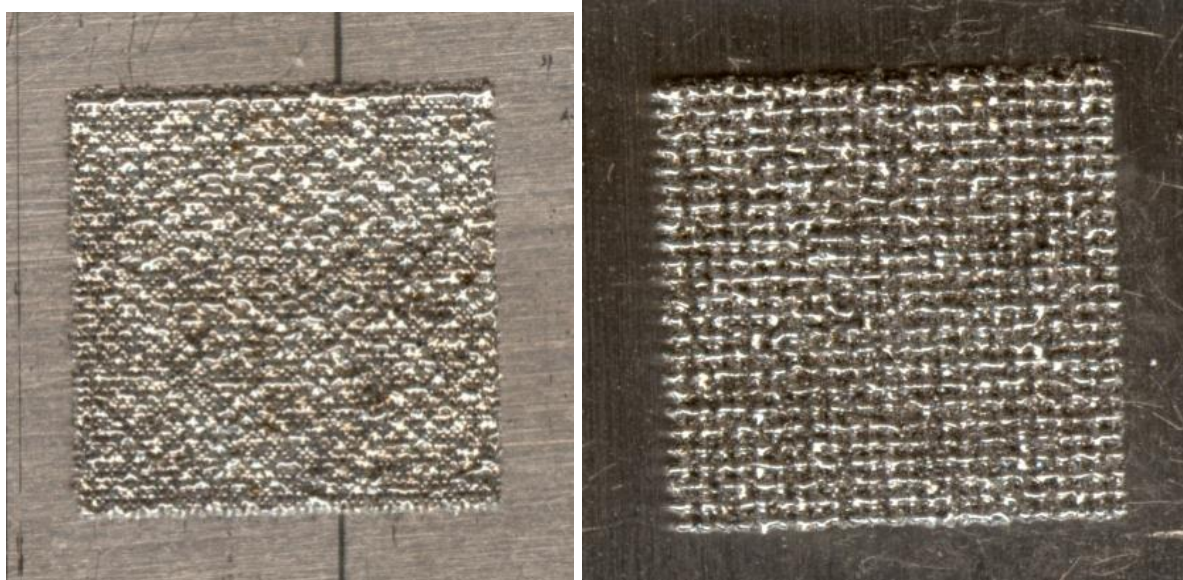


Рисунок 44 – Зависимость целевой функции F от скорости сканирования

Результаты измерений показали нестабильность геометрических параметров для всех значений скорости, за исключением 120 мм/с.

После изучения всех сопутствующих СЛС явлений и определения оптимальной скорости сканирования лазерного луча, были изготовлены образцы с открытыми порами в виде сетки с размером ячеек 10x10 мм за счет варьирования расстояния между треками от 220 до 420 мкм. Фотографии образцов, полученных при минимальном (220 мкм) и максимальном (420 мкм) расстоянии между треками представлены на рисунке 45.



(а)

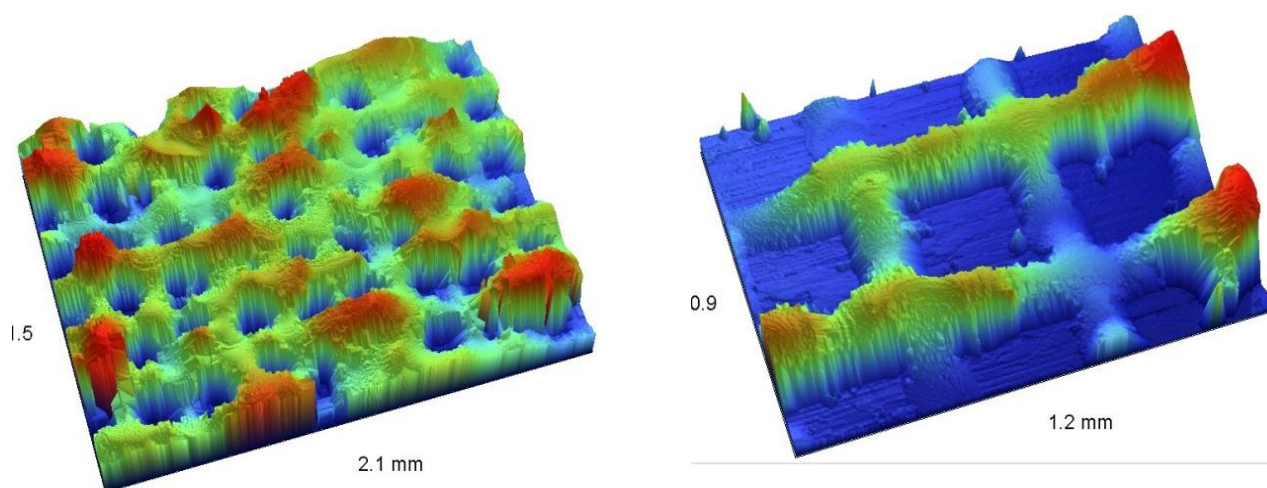
(б)

а – 220 мкм; б - 420 мкм.

Рисунок 45 - Фотографии материалов, полученных при минимальном и максимальном расстоянии между треками

5.2. Топография поверхности

Топография поверхности покрытий, полученных методом СЛС, представлена на рисунке 46. Объем пор рассчитывали с помощью 2D изображений профиля пор по методике, описанной в главе 2, а полученные результаты представлены в таблице 12. Анализ полученных данных показывает, что путем варьирования технологических параметров осаждения покрытий, возможно получать образцы с различным размером пор, причем объем поры зависит не только от расстояния между треками, но и их высоты.



а – 220 мкм; б - 420 мкм.

Рисунок 46 – Топография поверхности покрытий, полученных методом СЛС при минимальном и максимальном расстоянии между треками

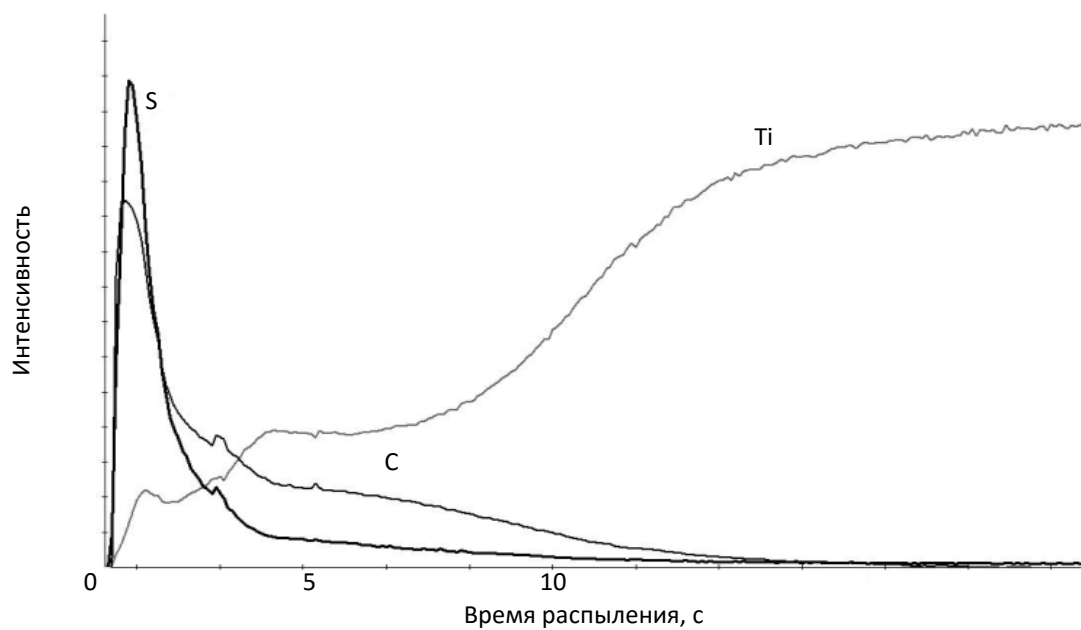
Таблица 12 – Объем пор в образцах, полученных методом СЛС

Расстояние между треками, мкм	V, мм ³
220	0,83±0,47
250	2,84±0,92
270	3,04±0,48
320	1,87±1,03
370	5,11±0,93
420	4,58±0,26

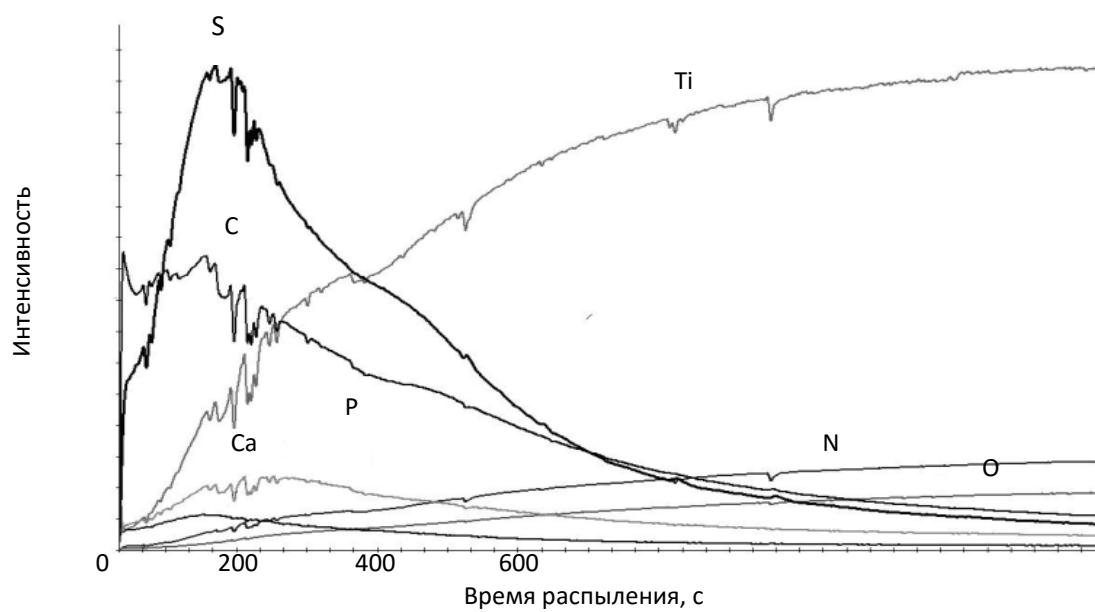
5.3. Использование покрытий с развитым рельефом поверхности в качестве контейнера для лекарств

Рельеф поверхности может быть использован для наполнения впадин лекарственными препаратами с целью придания материалу противовоспалительных характеристик на начальном этапе внедрения имплантата в живые ткани. Оценка профиля распределения лекарственного

препарата (аугментина) представлена на рисунке 47. Распределение лекарственного препарата по объему образца оценивалось по элементному профилю серы, входящего в состав аугментина. Видно, что по сравнению с гладкой шлифованной поверхностью титана (рисунок 47 а), толщина слоя лекарственного препарата на поверхности, модифицированной СЛС, возрастает на порядок (рисунок 47. б). Порошок антибиотика плотно заполняет все углубления поверхности (рисунок 48).



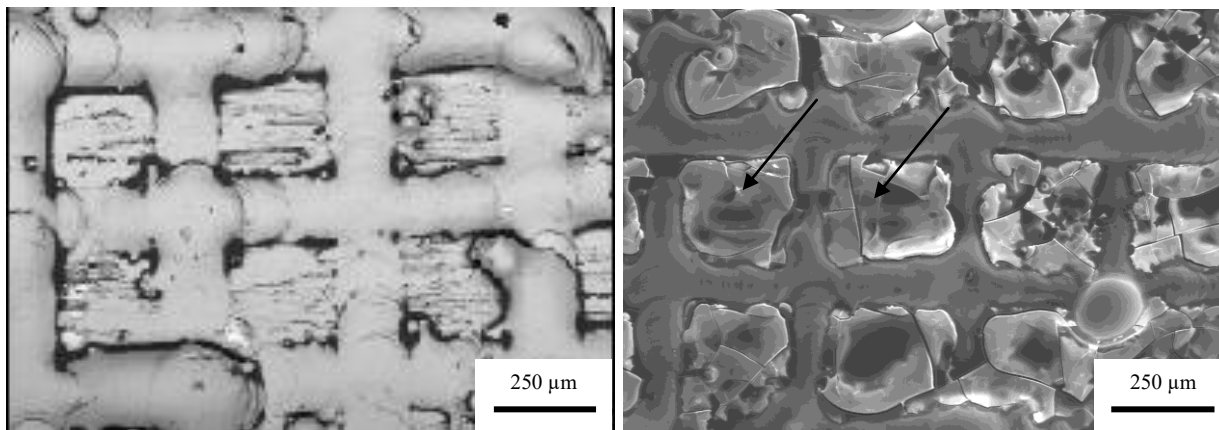
(a)



(б)

А – полированный титан; б – СЛС/TiCaPCON ($V_{\text{п}}=0,83\text{мм}^3$)

Рисунок 47– Профили распределения элементов



(a)

(б)

а – без лекарства; б – с лекарством

Рисунок 48– СЭМ изображение образцов СЛС

Полученные результаты показывают возможность использования материалов с развитой поверхностью в качестве имплантатов-контейнеров с лекарственным препаратом.

Глава 6. Исследование биологических свойств

В рамках настоящей работы были проведены две группы биологических испытаний. В федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина») были проведены испытания биосовместимости имплантатов с покрытием TiCaPCON-Ag. Полученные акты испытаний представлены в приложениях А-В.

В Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) проведены испытания бактериостатического эффекта имплантатов с покрытием TiCaPCON-Ag. Полученные акты испытаний представлены в приложениях Г-Е. Ниже изложены методики проведения испытаний и основные полученные результаты.

6.1 Антибактериальные свойства покрытий

6.1.1 Методика исследования антибактериальных свойств

6.1.1.1 Исследование бактериостатической активности покрытий TiCaPCON-Ag

Культивирование микроорганизмов проводили в стерильном культуральном 12-луночном планшете «Corning® Costar®». Образцы помещали в лунки планшета и добавляли по 1,7 мл стерильного физиологического раствора (ФР). Микробную взвесь исследуемого штамма готовили путем суспендирования изолированных колоний из 24-часовой культуры с последующим культивированием на ГРМ среде. Методом серийных 10-кратных разведений в забуференном ФР (ЗБФР) концентрацию микроорганизмов доводили до 10^6 КОЕ/мл. Далее в каждую из лунок планшета добавляли по 170 мкл полученной суспензии. Содержимое лунок хорошо перемешивали и помещали планшет в термостат при 37⁰ С.

Первый отбор проб производили через 3 часа экспозиции. Содержимое каждой лунки титровали методом серийных 10-кратных разведений. Затем высевали по 100 мкл из каждой лунки на чашки со средой ГРМ-агар. Чашки инкубировали в термостате в течение суток при температуре 37⁰С и затем подсчитывали титр культуры. Второй отбор проб производили через сутки после добавления в планшет культуры и инкубации при 37⁰С. Пробы отбирали по той же схеме, что и предыдущие.

Бактерицидную активность образцов изучали для штаммов: клинический изолят кишечной палочки *E.coli* и клинический изолят золотистого стафилококка *S.aureus*.

6.1.1.2 Исследование бактериостатической активности покрытий Ti/TiCapCON/Аугментин методом диффузии в агар

Целью данного типа испытаний являлась оценка угнетения образования колоний микроорганизмов на плотной питательной среде вокруг пластинки с нанесенным исследуемым покрытием. Исследования проводили на бактериях типа эпидермальный стафилококк *S.epidermidis*, золотистый стафилококк *S. aureus* и клебсиелла пневмонии *K. pneum. ozanae*. Культуры бактерий были выделены из организма больных хирургического профиля. Было установлено, что для выделенных и идентифицированных тест культур минимальная подавляющая концентрация амоксициллин/клавулановой кислоты (МПК) в питательной среде соответствует: *S. aureus* - 1 мкг/мл; *S. epidermidis* - 4 мкг/мл; *K. pneum. ozanae* – 8 мкг/мл.

Перед началом исследования бактерицидных свойств образцов идентифицированные штаммы культур микроорганизмов высевали на скошенный мясо-пептонный агар (МПА). Через 18-20 ч с поверхности агара делали смывы для приготовления бактериальной взвеси - 0,5 единиц по шкале McFarland. На поверхность агара Мюллер-Хинтона высевали газоном инокулят бактериальной культуры. Поверхность среды подсушивали в течение 1-2 минуты, затем на нее помещали испытуемые образцы,

обеспечивая контакт среды и анализируемого образца, а также стандартизированные диски с амоксициллин/клавулановой кислотой – 20/10 мкг (BD BBL, USA). Посевы помещали в термостат при 37°C. Учет результатов проводили через 24 ч и 48 ч, измеряя ширину зоны задержки роста колоний микроорганизма вокруг диска или пластинки.

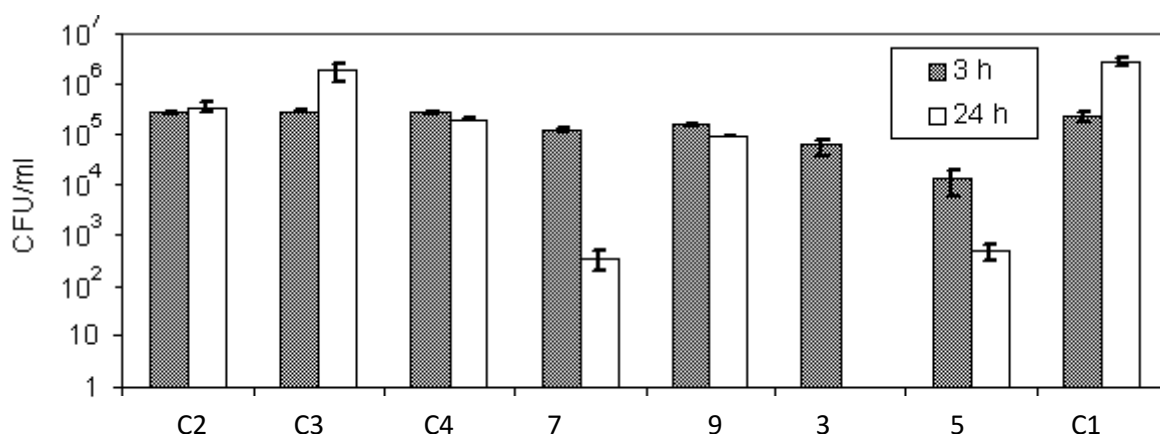
Статистический анализ проводили в Statistica 6.0, StatSoft с использованием критериев непараметрической статистики. Сравнение с группой контроля проводили с использованием критерия Wolf- Wolfowitz (Wolf- Wolfowitz rans test). Отличие считали достоверным при $p < 0,05$.

6.1.2 Результаты исследования покрытий TiCaPCON-Ag

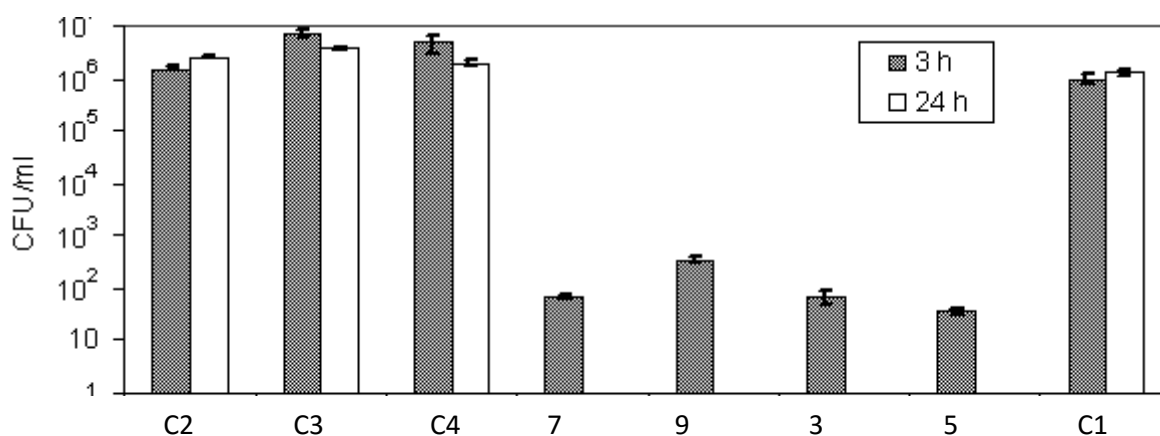
На рисунке 49 представлены результаты изучения бактериостатического эффекта покрытий TiCaPCON-Ag в отношении бактерий типа E.coli. Описание исследуемых образцов представлено в таблице 13.

Таблица 13 – Описание исследуемых контрольных образцов и образцов покрытий TiCaPCON-Ag

№	Образец	Метод получения покрытия	Ионное травление
C1	Стекло		-
C2	Контроль Ti		-
C3	TiCaPCON		-
C4	TiCaPCON		+
7	TiCaPCON-Ag	Ионная имплантация ионов Ag в ранее сформированное покрытие TiCaPCON	-
9			+
3		Одновременное распыление композиционной СВС-мишени $Ti_{0.5}-Ca_3(PO_4)_2$ и мишени Ag	-
5			+



(a)



(б)

а – без предварительной выдержки; б – с предварительной выдержкой в ФР

Рисунок 49 – Антибактериальная активность покрытий TiCaPCON-Ag по отношению к бактериям *E. coli*

Все покрытия за исключением покрытия, полученного по режиму 9, показали значительную антибактериальную активность. В случае покрытия 5 количество выживших колоний сокращается уже через 3 часа по сравнению с контрольным образцом. После 24 часов инкубации антибактериальная активность покрытия 3 достигает 100%. После предварительной выдержки в стерильном растворе в течение 7 дней, все серебросодержащие покрытия оказывали заметный антибактериальный эффект уже после 3 часов инкубации.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все покрытия имеют сильный антибактериальный эффект в отношении *E. coli*. Однако стоит отметить, что прямой корреляции между выходом ионов серебра и антибактериальным эффектом не наблюдалось. Например в случае покрытия 9, полученного методом ионной имплантации с последующим ионным травлением, концентрация ионов серебра в растворе через 1-3 суток наблюдений была низкой и оставалась таковой в течение 7 суток. Это почти на порядок ниже, чем в случае покрытий 3 и 5, полученных методом соосаждения. Тем не менее покрытие 9 обладало 100% антибактериальным эффектом после предварительной выдержки в растворе в течение 7 дней до добавления в него бактериальной культуры. Это можно объяснить следующим образом. Известно, что антибактериальный эффект зависит не только от концентрации ионов серебра, но также и от времени инкубации. Наши результаты показывают, что достаточно короткое время требуется для инактивации бактерий при инкубации в растворе, который уже насыщен ионами серебра (в процессе предварительной выдержки). Но для покрытий с медленной кинетикой выхода ионов серебра требуется больше времени для подавления бактерий в той же степени, чем для покрытий с ускоренным выходом.

Еще одним интересным результатом проведенных экспериментов является то, что покрытия 3 и 5 при одинаковой кинетике выхода серебра, демонстрируют различный антибактериальный эффект спустя 24 часа после инкубации. Известно, что наночастицы серебра сами по себе могут оказывать антибактериальное действие, при этом их активность может быть сопоставима с действием ионов серебра [215]. Механизм антибактериальной действия наночастиц серебра объясняется поглощением их бактериями или точечному повреждению клеточных мембран, что приводит их разрушению и смерти [216]. При низких концентрациях наночастицы не токсичны для человеческого организма. Именно наличием на поверхности покрытий наночастиц серебра, которые оказывают дополнительное антибактериальное

действие, можно объяснить разницу в антибактериальной эффективности покрытий 7/9 и 3/5.

Также определенное влияние оказывает и шероховатость покрытий. Как показывают результаты исследований, покрытия 3 и 5 имеют более развитую поверхность, чем образцы 7 и 9, что может способствовать прикреплению микроорганизмов к поверхности покрытия. Результаты исследований оформлены в виде акта испытаний (Приложение А).

6.1.3 Результаты исследований покрытий Ti/TiCaPCON/Аугментин

Изучение антибактериальной активности образцов Ti/TiCaPCON/Аугментин проводили методом диффузии в агар, в процессе которого оценивали диаметр зоны подавления бактериальных колоний различного типа. Данный тест хорошо применим к оценке бактерицидного действия материалов. Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Диаметр зоны подавления бактериальных колоний вокруг образцов СЛС

No	Образец	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>K. pneum. ozaenae</i>	
		24 h	48h	24 h	48 h	24 h	48 h
1	Контрольный диск (антибиотик)	12,1±2	11,3±0,5	7,5±0,5	8,2±0,5	6,5±0,5	6,4±0,5
2	СЛС/2,4 мг Аугментина	11,5±0,5	11,3±0,5	14,7±0,5	15,7±3	7,9±0,5	8,1±0,5
3	СЛС/TiCaPCON/2,4 мг Аугментина	8,0±2	10,1±0,5	7,2±1	11,3±0, 5	6,5±1,5	7,7±0,5
4	СЛС/4 мг Аугментина	18,8±2	18,7±0,5	15,3±1	16,4±1	9,1±0,5	9,7±0,5
5	СЛС/TiCaPCON/4 мг Аугментина	31,1±1	30,7±0,5	11,3±1,5	11,8±1	9,3±1,5	10,6±0, 5

Полученные результаты свидетельствуют о том, что образцы с сформированной методом СЛС ячеистой структурой и загруженные большим количеством Аугментина, обладают сильной бактериальной активностью, что подтверждается увеличением диаметра зоны подавления колониобразования бактерий *S. epidermidis*, *S. aureus*, и *K. pneum. Ozaenae* после 24 и 48 часов. Бактериостатический эффект через 24 и 48 часов практически не отличается, что свидетельствует о том, что основное действие антибиотик оказывает в первые 24 часа.

Нанесение покрытий TiCaPCON на поверхность СЛС-образцов оказывало некоторое влияние на диаметр зоны подавления бактериальных колоний. В случае бактерий типа *S. Epidermidis* нанесение покрытия приводит к уменьшению зоны подавления колоний. На распространение бактерий типа *K. pneum. Ozaenae* нанесение покрытий TiCaPCON влияние не оказывает. Однако в случае бактерий типа *S. aureus* и только при большей концентрации антибиотика наблюдается существенно увеличение диаметра зоны ингибирования бактерий.

Отметим, что величина антибактериального эффекта различна для трех типов бактерий, что связано с различной минимальной ингибирующей концентрацией. Бактерии *K. pneum. Ozaenae* (клебсиелла пневмонии) наиболее устойчивы к антибиотикам, поэтому зона ингибирования бактерий для исследованного типа материала была наименьшей. Результаты исследований оформлены в виде акта испытаний (Приложение В).

6.2. Биосовместимость покрытий TiCaPCON-Ag

6.2.1 Методика исследования биосовместимости покрытий

Морфометрический анализ распластывания клеток на поверхности тестируемых материалов был проведен с использованием программы ImageJ, которая позволяет провести первичный экспресс-анализ биосовместимости

покрытий. Клетки MC3T3-E1 рассеивали на поверхность тестируемых образцов, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия). Культуры выращивали в термостате при 37°C в атмосфере с добавлением 5% CO₂. Через 24 часа после посева клетки фиксировали 3,7% параформом, мембрану фиксированных клеток экстрагировали 0,5% Тритоном X100 в течение 3 мин.

Препараты инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами к белку фокальных адгезий паксиллину (BD Transduction Laboratories, США) в разведении 1:200 в течение 30 мин, после чего антитела отмывали три раза фосфатным буферным раствором. Препараты инкубировали с вторичными козлиными антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуоресцентным красителем TRITC (Sigma, США) и фаллоидином, флуоресцентно-меченным Alexa488 (Molecular Probes, США), специфически связывающим филаментный актин. Далее препараты отмывали три раза фосфатным буферным раствором и, поместив на предметные стекла, погружали в фиксирующую среду.

Препараты исследовали с использованием микроскопа AxioPlan (Zeiss, Германия) с масляным объективом х63 и камеры высокого разрешения C8484-05 (Hamamatsu, Япония). 30 индивидуальных клеток фотографировали с помощью камеры C8484-05 в двух каналах флуоресценции (ex/em - 488 nm/515 nm и ex/em - 570 nm/602 nm) для морфометрического анализа и анализа актинового цитоскелета и фокальных адгезий. В программе Image J обрисовывали контуры клеток и определяли их площади, после чего определялось среднее значение площади клеток для каждого образца. В экспериментах была определена средняя площадь распластывания клеток на тестируемом образце.

Исследование организации актинового цитоскелета и фокальных адгезий с использованием флуоресцентно меченного фаллоидина и моноклональных антител к белку фокальных адгезий паксиллину позволяет

оценить адгезивность тестируемых материалов. При анализе организации актинового цитоскелета и распределения фокальных адгезий в клетках MC3T3-E1 был использован метод двухканальной флуоресцентной микроскопии.

Жизнеспособность клеток, растущих на тестируемых подложках оценивали с помощью теста на пролиферацию. Остеогенные клетки MC3T3-E1 рассевали на поверхность пластинок, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия). Культуры росли в термостате при 37°C, среду меняли на свежую на третий и на пятый день инкубации. Через 1, 3, 5 дней после посева клетки фиксировали 3,7% раствором параформальдегида, мембрану фиксированных клеток экстрагировали 0,5% Тритоном X100. Клетки MC3T3-E1 окрашивали ядерным флуоресцентным красителем DAPI (Sigma, США) и заключали в фиксирующую среду на предметных стеклах. Препараты исследовали с помощью микроскопа AxioPlan (Zeiss, Германия) с объективом x40, камеры высокого разрешения C8484-05 (Hamamatsu, Япония). Подсчитывали количество клеток в 30 полях зрения и определяли среднее значение плотности клеточной популяции.

6.2.2 Результаты исследования биосовместимости покрытий TiCaPCON-Ag

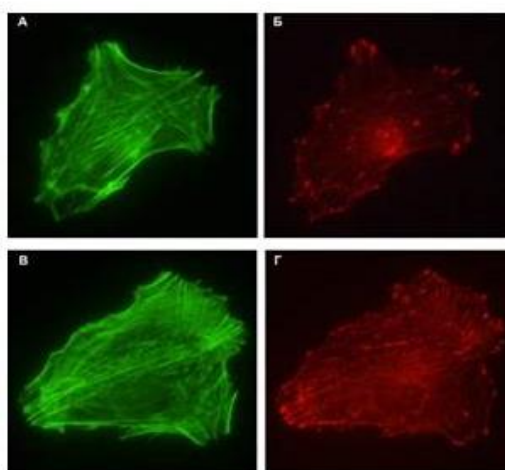
Оценка средней площади распластывания остеобластов линии MC3T3-E1 на поверхности покрытий показало, что поверхность покрытия TiCaPCON является высокоадгезивной для клеток (таблица 15). Ионная имплантация серебра в покрытие TiCaPCON не оказывала негативного влияния на адгезию клеток. Площадь распластывания клеток на поверхности данных покрытий как до, так и после ионного травления, не отличалась от площади распластывания на адгезивном стекле. Напротив, покрытия, полученные одновременным распылением композиционной СВС-мишени $\text{TiC}_{0.5}\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и мишени Ag, оказывали негативное влияние на клетки, проявляющееся в

уменьшении их площади. Дополнительная ионное травление поверхности покрытия не влияла на адгезивные характеристики покрытий.

Таблица 15 - Площадь распластывания клеток MC3T3-E1 на поверхности покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag

Ре ж и м	Образец	Метод получения покрытия	Ионное травлени е	Площадь одиночных клеток, мкм ²
	Стекло			1480±117,7
	Контроль Ti		-	1791±105,7
	TiCaPCON		-	1654±117,4
7	TiCaPCON-Ag	Ионная имплантация ионов Ag в ранее сформированное покрытие TiCaPCON	-	1567±96,6
9			+	1567±160,4
3		Одновременное распыление композиционной СВС- мишени $\text{TiC}_{0.5}\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и мишени Ag	-	1213±74,8
5			+	1182±107,9

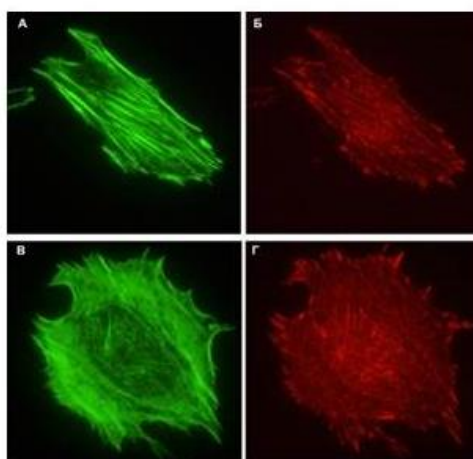
Также об адгезивной способности поверхности покрытий свидетельствует организация актинового цитоскелета (окрашивание зеленым) и фокальных адгезий (окрашивание красным) (рисунок 50-53). В клетках, культивируемых на контрольных образцах наблюдаются хорошо выраженные прямые актиновые пучки (рисунок 50 а, в), которые на периферии клеток заканчивались зрелыми фокальными адгезиями (рисунок 50 б, г).



а, б – стекло; в, г – титан

Рисунок 50 - Организация актинового цитоскелета (а, в) и фокальных адгезий (б,г) клеток MC3T3-E1 на поверхности контрольных образцов

В клетках, культивируемых на поверхности покрытий TiCaPCON, актиновый цитоскелет был также хорошо организован. Актиновые пучки были ассоциированы с многочисленными фокальными адгезиями (рисунок 51).

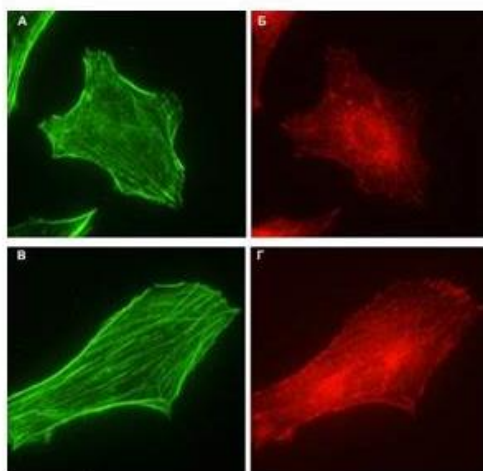


а, б – TiCaPCON;
в, г – TiCaPCON с ионным травлением

Рисунок 51 - Организация актинового цитоскелета (а, в) и фокальных адгезий (б, г) клеток MC3T3-E1 на поверхности покрытий TiCaPCON

При культивировании клеток на покрытиях TiCaPCON-Ag, полученных методом ионной имплантации, изменялась организация актинового

цитоскелета (рисунок 52 а). В клетках уменьшалось количество прямых актиновых пучков. Актиновые пучки были короткими и прерывистыми. Фокальные адгезии были более мелкими (рисунок 52 б). После дополнительного ионного травления наблюдались изменения распределения сети актиновых микрофиламентов (рисунок 52 в). В клетках были выражены прямые актиновые пучки, количество и размер фокальных адгезий также возрастало (рисунок 52 г).



а, б – ионная имплантация;
в, г – ионная имплантация с ионным травлением

Рисунок 52 - Организация актинового цитоскелета (а, в) и фокальных адгезий (б, г) клеток MC3T3-E1 на поверхности покрытий TiCaPCON-Ag, полученных ионной имплантацией ионов Ag в ранее сформированное покрытие TiCaPCON.

В клетках, культивируемых на поверхности покрытий, полученных методом со-осаждения, наблюдалась резко выраженная дезорганизация актинового цитоскелета. В клетках были видны редкие, тонкие и прерывистые актиновые пучки и мелкие фокальные адгезии (рисунок 53 а,б). Дополнительное ионное травление не приводило к улучшению цитосовместимости. Клетки на таких подложках часто имели округлую нераспластанную форму, в цитоплазме не обнаруживались актиновые

структуры, мелкие фокальные адгезии были крайне немногочисленными (рисунок 53 в, г).

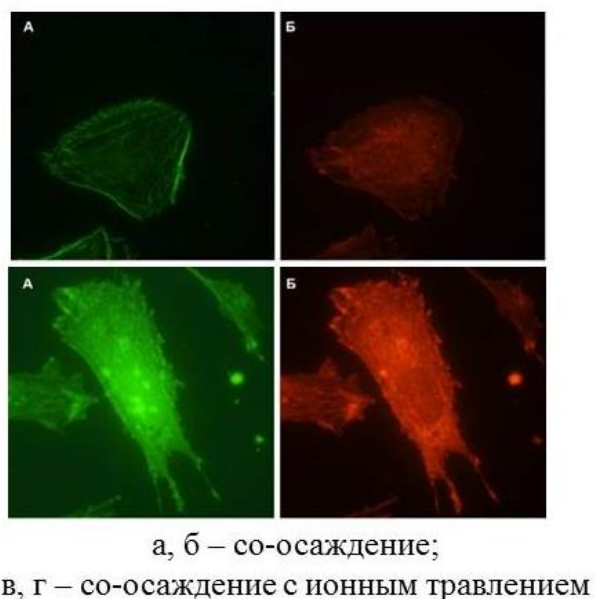


Рисунок 53 - Организация актинового цитоскелета (а, в) и фокальных адгезий (б, г) клеток MC3T3-E1 на поверхности покрытий TiCaPCON-Ag, полученных одновременным распылением композиционной СВС-мишени $\text{TiC}_{0.5}\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и мишени Ag

Жизнеспособность клеток MC3T3-E1, культивируемых на поверхности покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag, была изучена с помощью теста на пролиферацию, результаты которого представлены в таблице 16. На контрольных образцах (титан, стекло), а также на поверхности покрытия TiCaPCON, клетки хорошо размножались. На поверхности покрытий TiCaPCON-Ag, полученных методом магнетронного распыления и ионной имплантации, уровень пролиферации был несколько ниже, чем в контрольном образце, однако покрытие способно поддерживать жизнеспособность клеток. Покрытия, полученные методом со-осаждения (одновременное распыление мишеней $\text{TiC}_{0.5}\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и Ag), оказывали цитотоксическое действие на клетки, которое было максимально выражено

для образцов полученных методом со-осаждения и дополнительного ионного травления.

Таблица 16 - Динамика пролиферации клеток MC3T3-E1 на поверхности покрытий TiCaPCON-Ag

№	Образец	Метод получения покрытия	Ионное травление	1 день	3 день	5 день
1	Стекло			$28,0 \pm 1,6$	$33,1 \pm 2,6$	$41,5 \pm 2,2$
2	Контроль Ti		+	$31,3 \pm 2,6$	$36,0 \pm 1,5$	$39,3 \pm 1,8$
3	TiCaPCON		-	$28,4 \pm 2,5$	$40,1 \pm 1,4$	$41,8 \pm 1,6$
4			+	$28,0 \pm 2,1$	$36,3 \pm 1,6$	$39,2 \pm 1,8$
5	TiCaPCON-Ag	Ионная имплантация ионов Ag в ранее сформированное покрытие TiCaPCON	-	$21,1 \pm 1,5$	$22,4 \pm 1,4$	$29,9 \pm 2,4$
6			+	$33,0 \pm 2,2$	$28,7 \pm 2,1$	$27,8 \pm 1,3$
7		Одновременное распыление композиционной СВС-мишени $\text{TiC}_{0,5}$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и мишени Ag	-	$33,7 \pm 2,2$	$25,7 \pm 2,5$	$24,6 \pm 2,5$
8			+	$33,9 \pm 1,5$	$18,3 \pm 2,5$	$5,4 \pm 0,6$

Результаты исследований оформлены в виде акта испытаний (Приложение Б).

6.2.3 Методика исследования биоактивности образцов

Клетки MC3T3-E1 рассевали на поверхность тестируемых подложек, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки.

На следующий день среду меняли на α -MEM (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицерофосфата. Культуры росли в термостате при 37°C, через каждые три дня среду заменяли на свежую.

Остеобласты, растущие в течение 14 дней на тестируемых подложках и на контрольных адгезивных стеклах, снимали с поверхности подложки 0,1% трипсином на ЭДТА и промывали фосфатным буфером. После центрифугирования при 7000 об/мин в течение 3 мин в центрифуге Эппендорф при +4°C осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл 0,1% раствора тритона X100 в 10 мМ буфере Трис-HCl с 5 мМ MgCl₂. Далее осадок клеток лизировали в 3-х циклах последовательного замораживания-оттаивания (в морозильнике при - 30°C, в воде комнатной температуры). После центрифугирования клеток при 13 000 об/мин в течение 15 мин в центрифуге Эппендорф отбирали 150 мкл аликвоты супернатантов. В супернатантах определяли содержание белка по методу Брэдфорда с помощью кита BioRad Laboratories (США) и с использованием спектрофотометра Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США) при 630 нм.

В качестве субстрата колориметрической реакции использовали *p*-нитрофенилфосфат (BioRad Laboratories, США). В 96-луночных планшетах к 20 мкл супернатанта (в трех повторях) добавляли 100 мкл *p*-нитрофенилфосфата, реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин. При ферментативном расщеплении бесцветного *p*-нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой остеобластов образуется *p*-нитрофенол, имеющий желтое окрашивание. Продукт реакции определялся в области поглощения 405 нм с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200. Активность щелочной фосфатазы оценивали по концентрации *p*-нитрофенола, освобождающегося в результате реакции в единицу времени на миллиграмм клеточного белка (нМ *p*-нитрофенола /мин/мг белка).

6.2.4 Результаты исследования биоактивности покрытий TiCaPCON-Ag

Для исследования влияния различных способов введения серебра в состав покрытий на их биоактивность, были оценена способность покрытий поддерживать остеогенную дифференцировку с помощью раннего маркера дифференцировки - щелочной фосфатазы (ЩФ). Проведенные исследования показали, что пленки, полученные с помощью ионной имплантации Ag в готовое покрытие, биоактивны и стимулируют остеогенную дифференцировку.

Таблица 17 - Активность щелочной фосфатазы

Режим	Образец	Метод получения покрытия	Ионное травление	Активность щелочной фосфатазы
	F12 (недифференцирующая среда)			35 ± 4
	Alpha-MEM (дифференцирующая среда)			245 ± 22
	Контроль Ti		+	304 ± 40
	TiCaPCON		-	251 ± 16
			+	274 ± 30
7	TiCaPCON-Ag	Ионная имплантация ионов Ag в ранее сформированное покрытие TiCaPCON	-	336 ± 13
9			+	309 ± 27
3		Одновременное распыление композиционной СВС-мишени $\text{TiC}_{0.5}\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и мишени Ag	-	265 ± 24
5			+	175 ± 23

Результаты исследований оформлены в виде акта испытаний (Приложение Б).

6.2.5 Результаты исследования биоактивности образцов СЛС/TiCaPCON/Антибиотик

При исследовании биоактивности образцов СЛС/TiCaPCON/Аугментин, было установлено, что для всех доз антибиотика активность ЩФ немного

снижается по сравнению с контрольным образцом. Тем не менее, высокий уровень активности ЩФ свидетельствует о том, что образцы СЛС/TiCaPCON/Антибиотик способны поддерживать высокий уровень остеокондуктивных свойств на ранних этапах взаимодействия клеток и материала.

Таблица 18 – Активность щелочной фосфатазы клеток MC3T3-E1 на поверхности СЛС-образцов с различной дозой антибиотика

Образец	Концентрация, аугментина	Активность ЩФ (нмоль/мг протеин/мин)
F12 (недифференцирующая среда)		83 ± 8
Alpha-MEM (дифференцирующая среда)		331 ± 15
Титан		360 ± 18
TiCaPCON покрытие		418 ± 41
СЛС		408 ± 43
СЛС/TiCaPCON		459 ± 29
СЛС/TiCaPCON/антибиотик	0,3	393 ± 25
	0,03	338 ± 22
	2,4	279 ± 24
	2,4	279 ± 36

* предварительная выдержка в растворе Хэнка в течение 48 часов

Результаты исследований оформлены в виде акта испытаний (Приложение Г).

Таким образом, результаты биологических испытаний свидетельствуют о том, что за счет введения бактерицидного компонента (Аугментин,

серебро) в состав покрытия удалось получить материалы, обладающие биоактивностью и антибактериальной активностью. Например, покрытие, полученное методом ионной имплантации (режим 7) демонстрирует значительный бактерицидный эффект по отношению к кишечной палочке при относительно низком содержании серебра в покрытиях, которое не оказывает токсического эффекта. Антибактериальный эффект данного покрытий сопоставим с покрытием, полученным методом со-осаждения с последующим ионным травлением (режим 5), для которого наблюдается существенно более высокий уровень ионов серебра, приводящий к появлению токсичности. Гибридные материалы СЛС/TiCaPCON/Аугментин также продемонстрировали ярко выраженный бактерицидный эффект и способность поддерживать высокий уровень osteoconductive свойств.

Таким образом, установлен оптимальный диапазон содержания серебра в покрытии TiCaPCON-Ag для обеспечения высокой антибактериальной активности в отношении бактерий кишечной палочки (*E.coli*), биосовместимости и биоактивности, что проявляется в том, что покрытия обеспечивают высокий уровень адгезии, распластывания, пролиферации и остеогенной дифференцировки остеобластических клеток.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ ПО РАБОТЕ:

1. Разработаны новые составы нанокomпозиционных покрытий TiCaPCON-Ag с высокой антибактериальной активностью при сохранении биоактивности за счет оптимальной концентрации серебра в покрытии и типа его агломерации.
2. Разработаны различные методы введения Ag в состав покрытий TiCaPCON-Ag: а) одновременное распыление мишеней $\text{TiC-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и Ag и б) ионная имплантация Ag в ранее осажденное TiCaPCON покрытие. Установлено, что за счет варьирования технологических параметров осаждения (напряжения ионного источника, диаметр

селекторной диафрагмы, ограничивающей ионный пучок, время обработки) можно обеспечить различное распределение Ag в объеме покрытия.

3. Изучение морфологии покрытий в системе TiCaPCON-Ag, показало, что покрытия обладают плотной и однородной колонной структурой. Введение Ag в количестве 1-4 ат% приводит к образованию наночастиц серебра на поверхности покрытий размером 5-10 нм. Фазовый анализ показал, что основной структурной составляющей покрытий является гцк фаза TiCN с размером кристаллитов 25 нм. Остальные элементы (Ca, P и O), в основном, содержатся в аморфной фазе. Легирование Ag не влияет на размер кристаллитов гцк фазы. При максимальном содержании серебра в покрытии (4 ат.%) образуется фаза металлического Ag.
4. Покрытия обладали высокой твердостью 18-28 ГПа, модулем упругости 185-230 ГПа и высокой стойкостью к циклическим, ударно-динамическим нагрузкам. Анализ характера разрушения в зоне нагружения показал, что разрушение покрытий происходит по механизму когезионного растрескивания в результате существенной пластической деформации подложки.
5. Изучение трибологических характеристик показало, что покрытия обладали низким коэффициентом трения как на воздухе (0,19-0,23), так и в физиологическом растворе (0,18-0,27). Установлено, что при испытании на воздухе скорость износа покрытий TiCaPCON-Ag возрастала с 0,77 до 9,33 мм³/Н/м по мере увеличения содержания серебра с 0,4 до 4,0%, а при проведении испытаний в физиологическом растворе оставалась неизменной.
6. В результате электрохимических испытаний установлено, что покрытия TiCaPCON обладают высокой коррозионной стойкостью за счет образования на его поверхности плотной пассивной пленки.

Введение серебра в количестве 0,4-4% не ухудшало электрохимические характеристики покрытий.

7. Измерение краевого угла смачивания показало, что покрытия TiCaPCON-Ag непосредственно после напыления являются гидрофильными (краевой угол смачивания 38-61°) и сохраняют эти характеристики в течении 3 часов выдержки на воздухе.
8. Эксперименты *in vitro* в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма, показали, что поверхность покрытий TiCaPCON-Ag является биоактивной и способствует образованию и росту сплошного слоя апатита на поверхности в течение 28 дней.
9. Показано, что процесс выхода ионов серебра в биологическую среду зависит от его концентрации в покрытии, наличия или отсутствия наночастиц серебра на поверхности и шероховатости подложки.
10. Разработаны гибридные покрытия Ti/TiCaPCON/Аугментин с ячеистой структурой поверхности, обладающие антибактериальной активностью и биоактивностью. Установлен критерий (целевая функция), описывающая форму и стабильность треков при селективном лазерном спекании (СЛС). Определенные зависимости целевой функции от скоростей сканирования позволили определить оптимальные параметры процесса СЛС, при которых на поверхности Ti имплантата формируется ячеистая структура с размером ячеек 0,83-5,11 мм³, обеспечивающая загрузку дозы лекарственного препарата (Аугментина) необходимой для обеспечения антибактериальных характеристик.
11. Получено ноу-хау на «Процесс получения металлокерамических материалов с контролируемой топографией, открытой пористостью и составом поверхности». Авторы: Д.В.Штанский, Е.А.Левашов, А.Н.Шевейко, А.Е.Кудряшов, И.В.Батенина. №11-164-2012 ОИС от 16.04.2012

12. Получен патент РФ на изобретение Д.В. Штанский, Е.А. Левашов, И.В. Батенина, Ф.В. Кирюханцев-Корнеев, А.Н. Шевейко, Многокомпонентное биоактивное наноконпозиционное покрытие с антибактериальным эффектом, Патент РФ №2524654 от 21 июня 2013 г.
13. Биологические испытания титановых имплантатов с покрытием TiCaPCON-Ag, проведенные в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», показали их высокие бактерицидные характеристики. Выявлено, что в отношении бактерий кишечной палочки (*E.coli*) антибактериальная активность покрытий TiCaPCON-Ag достигает 100% через 24 часа инкубации. Покрытия TiCaPCON/Аугментин обладали сильной бактериальной активностью против золотистого стафилокока (*S. Aureus*), эпидермального стафилокока (*S.epidermis*) и клебсиеллы пневмонии *K.pneum.ozanae*.
14. Биологические испытания титановых имплантатов с покрытием TiCaPCON-Ag, проведенные в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина», показали, что покрытия обладают высоким уровнем биосовместимости и биоактивности. Показано, что поверхность покрытий TiCaPCON-Ag, полученных методом магнетронного распыления мишени $TiC-Ca_3(PO_4)_2$ с последующей ионной имплантацией Ag, является адгезивной для клеток линии MC3T3-E1. В клетках, культивируемых на поверхности покрытий TiCaPCON-Ag наблюдался хорошо организованный актиновый цитоскелет. Актиновые пучки были ассоциированы с многочисленными фокальными адгезиями. Показано, что покрытия способны поддерживать высокий уровень пролиферации, что свидетельствует о его биосовместимости. Исследование биоактивности с помощью раннего маркера дифференцировки - щелочной фосфатазы,

показало, что покрытие стимулируют остеогенную дифференцировку, что указывает на его биоактивность. При исследовании биоактивности образцов TiCaPCON/Аугментин наблюдался высокий уровень активности щелочной фосфатазы, свидетельствующий о том, что они способны поддерживать высокий уровень остеокондуктивных свойств.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor and P. Thomsen, *Titanium in Medicine*, Springer, Berlin, (2001).
2. J. Long, L. Sim, S. Xu, K. Ostrikov, *Chem. Vap. Deposition*, 2007, **13**, 299-306.
3. S. Xu, J. Long, L. Sim, C.H. Diong, K. Ostrikov, *Plasma Process. Polym.* 2005, **2**, 373-390.
4. J.D. Long, S. Xu, J.W. Cai, N. Jiang, J.H. Lu, K.N. Ostrikov, C.H. Diong, *Mater. Sci. Eng.*, 202, **C20**, 175–180.
5. M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev, V. F. Pichugin, S. S. Chernousova, and M. Epple, *J. Surf. Invest.*, 2011, **5**, 1202–1207.
6. V. F. Pichugin, M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev, I. A. Khlusov, and M. Epple, *J. Surf. Invest.*, 2011, **5**, 863–869.
7. Z. Zyman, M. Tkachenko, M. Epple, M. Polyakov, M. Naboka, *Materialwiss. Werkstofftech.* 2006, **37**, 474-477.
8. L.J. Chen, M. Wang, *Biomaterials*, 2002, **23**, 2631-2639.
9. W. Linhart, W. Lehmann, M. Siedler, F. Peters, A.F. Schilling, K. Schwarz, M. Amling, J.M. Rueger, M. Epple, *J. Mater. Sci.*, 2006, **41**, 4806-4813.
10. C. Schiller, M. Epple, *Biomaterials*, 2003, **24**, 2037-2043.
11. R.A. Surmenev, *Surf. Coat. Technol.*, 2012, **206**, 2035-2056.
12. P.K. Chu, *Surf. Coat. Technol.*, 2007, **201**, 8076-8082.
13. P.K. Chu, *Surf. Coat. Technol.*, 2007, **201**, 5601-5606.
14. P.K. Chu, *Surf. Coat. Technol.*, 2010, **204**, 2853-2863.
15. E.A. Levashov, A.G. Merzhanov, D.V. Shtansky, *Galvanotechnik*, 2009, **9**, 2102-2114.
16. E.A. Levashov, Y.S. Pogozhev, V.V. Kurbatkina. *Advances in ceramics – synthesis and characterization, processing and specific application*, edited by Costas Sikalidis, INTECH, ISBN 978-953-307-505-1, 2011, 3-48.
17. E.A. Levashov, A.S. Rogachev, V.I. Ukhvid, I.P. Borovinskaya, *Physico-chemical and technological bases of self-propagating high-temperature synthesis*, Moscow: Binom, 1999, 134-47 (in Russian).
18. E.A. Levashov and D.V. Shtansky, *Rus. Chem. Rev.*, 2007, **76**, 463-470.
19. E.A. Levashov, V.V. Kurbatkina, A.S. Rogachev, N.A. Kochetov, E.I. Patsera and N.V. Sachkova, *Rus. J. Non-Ferrous Met.*, 2008, **49**, 404–413.
20. E.A. Levashov, A.S. Rogachev, V.V. Kurbatkina, Y.K. Epishko and N.A. Kochetov, *Int. J. SHS*, 2007, **16**, 218–24.
21. D.V. Shtansky, N.A. Gloushankova, I.A. Bashkova, M.A. Kharitonova, T.G. Moizhess, A.N. Sheveiko, F.V. Kiryukhantsev-Korneev, M.I. Petrzhik and E.A. Levashov, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3519-3531.
22. D.V. Shtansky, N.A. Gloushankova, A.N. Sheveiko, M.A. Kharitonova, T.G. Moizhess, E.A. Levashov and F. Rossi, *Biomaterials*, 2005, **26**, 2909-2924.
23. D.V. Shtansky, E.A. Levashov, N.A. Gloushankova, N.B. D'yakonova, S.A. Kulinich, M.I. Petrzhik, F.V. Kiryukhantsev-Korneev and F. Rossi, *Surf. Coat. Technol.*, 2004, **182**, 101-111.
24. D.V. Shtansky, N.A. Gloushankova, I.A. Bashkova, M.I. Petrzhik, A.N. Sheveiko, F.V. Kiryukhantsev-Korneev, I.V. Reshetov, A.S. Grigoryan and E.A. Levashov, *Surf. Coat. Technol.*, 2006, **201**, 4111-4118.
25. A. Leyland and A. Matthews, *Wear*, 2000, **246**, 1-11.
26. Решетов И.В., Штанский Д.В., Левашов Е.А., Филюшин М.М., Васильев В.Н., Сухарев С.С., *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*, 2010, **3**, 63-71.
27. А.Н. Шевейко, Ф.В. Кирюханцев-Корнеев, Д.В. Штанский, *Физикохимия поверхности и защита материалов*, 2013, **49**, 277-283.
28. D. Buser, R.K. Schenk, S. Steinemann, J.P. Fiorellini, C.H. Fox, H. Stich, *J. Biomed.*

- Mater. Res.*, 1991, **25**, 889–902.
29. S. Hansson, M. Norton, *J. Biomech.*, 1999, **32**, 829–36.
 30. A.J. García, C.D. Reyes, *J. Dent. Res.*, 2005, **84**, 407–413.
 31. F. Marco, F. Milena, G. Gianluca, O. Vittoria, *Micron*, 2005, **36**, 630–644.
 32. K. Anselme, M. Bigerelle, *Acta Biomater.*, 2005, **1**, 211–222.
 33. D. Khang, J. Lu, C. Yao, K.M. Haberstroh, T.J. Webster, *Biomaterials*, 2008, **29**, 970–983.
 34. E.K.F. Yim, R.M. Reano, S.W. Pang, A.F. Yee, C.S. Chen, K.W. Leong, *Biomaterials*, 2005, **26**, 5405–5413.
 35. O. Zinger, G. Zhao, Z. Schwartz, J. Simpson, M. Wieland, D. Landolt, B. Boyan, *Biomaterials*, 2005, **26**, 1837–1847.
 36. K. Suzuki, K. Aoki, K. Ohya, *Bone*, 1997, **21**, 507–514.
 37. L. Le Guerhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq, *Dental Materials Journal*, 2007, **23**, 844–54.
 38. K. Anselme, *Biomaterials*, 2000, **21**, 667–81.
 39. V. Borsari, G. Giavaresi, M. Fini, *Biomaterials*, 2005, **26**, 4948–4955.
 40. G. Zhao, O. Zinger, Z. Schwartz, *Biomaterials*, 2007, **28**, 2821–2829.
 41. O. Zinger, K. Anselme, A. Denzer, P. Habersetzer, M. Wieland, J. Jeanfils, P. Hardouin, D. Landolt, *Biomaterials*, 2004, **25**, 2695–2711.
 42. G. Mendonça, D.B.S. Mendonça, F.J.L. Aragão, L.F. Cooper, *Biomaterials*, 2008, **29**, 3822–3835.
 43. C.J. Bettinger, R. Langer, J.T. Borenstein, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, **48**, 5406–5415.
 44. E.K. Yim, S.W. Pang, K.W. Leong, *Exp. Cell Res.*, 2007, **313**, 1820–1829.
 45. H. Liu, E.B. Slamovich, T.J. Webster, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, **78**, 798–807.
 46. S. Kubota, K. Johkura, K. Asanuma, Y. Okouchi, N. Ogiwara, K. Sasaki, T. Kasuga, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004, **15**, 1031–1035.
 47. J.Y. Lim, A.D. Dreiss, Z. Zhou, J.C. Hansen, C.A. Siedlecki, R.W. Hengstebeck, J. Cheng, N. Winograd, H.J. Donahue, *Biomaterials*, 2007, **28**, 1787–1797.
 48. M.J. Dalby, M.O. Riehle, H. Johnstone, S. Affrossman, A.S.G. Curtis, *Cell Biol. Int.*, 2004, **28**, 229–236.
 49. N.R. Washburn, K.M. Yamada, C.G. Simon Jr, S.B. Kennedy, E.J. Amis, *Biomaterials*, 2004, **25**, 1215–1224.
 50. J.P. Li e.a. *Biomaterials*, 2007, **28**, 2810–2820.
 51. V. Karageorgiou, D. Kaplan. *Biomaterials*, 2005, **26**, 5474–5491.
 52. M. Navarro, A. Michiardi, O. Castan, J.A. Planell, *J. R. Soc. Interface*, 2008, **5**, 1137–1158.
 53. Y.-T. Sula, C. Johanssonb, E. Byonc, T. Albrektsson, *Biomaterials*, 2005, **26**, 6720–6730.
 54. G. Akay, M.A. Birch, M.A. Bokhari, *Biomaterials* 25, 3991–4000.
 55. Y.S. Chang, G. Ho, M. Kobayashi, M. Oka, *J. Arthroplasty*, 1998, **13**, 816–825.
 56. V. Karageorgiou, D. Kaplan, *Biomaterials*, 2005, **26**, 5474–5491.
 57. S.F. Hulbert, F.A. Young, R.S. Mathews, J.J. Klawitter, C.D. Talbert, F.H. Stelling., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1970, **4**, 433–456.
 58. H.E. Götz, M. Müller, A. Emmel, U. Holzwarth, R.G. Erben, R. Stangl, *Biomaterials*, 2004, **25**, 4057–4064.
 59. M. Svehla, P. Morberg, W. Bruce, B. Zicat, W.R. Walsh, *J. Arthroplasty*, 2002, **17**, 304–311.
 60. U. Meyer, U. Joos, J. Mythili, T. Stamm, A. Hohoff, T. Fillies, U. Stratmann, H.P. Wiesmann, *Biomaterials*, 2004, **25**, 1959–1967.
 61. A. Georgi, F. Grinnel, T. Groth, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, **30**, 385–391.
 62. K. Webb, V. Hlady, P.A. Tresco, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, **41**, 422–430.
 63. P.T. Oliveira, S.F. Zalzal, M.M. Beloti, A.L. Rosa, A. Nanci, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2007, **80**, 554–564.

64. R. Carbone, I. Marangi, A. Zanardi, L.Giorgetti, E. Chierici, G. Berlanda, A. Podestà, F. Fiorentini, G. Bongiorno, P. Piseri, P.G. Pelicci, P. Milani, *Biomaterials*, 2006, 27, 3221–3229.
65. D.S.Kommireddy, S.M.Sriram, Y.M. Lvov, D.K.Mills, *Biomaterials*, 2006, 27, 4296–4303.
66. H.H. Huang, S.J.Pan, Y.J.Lai, T.H.Lee, C.C.Chen, F.H.Lu, *Scripta Mater.*, 2004, 51, 1017–1021; 57. K. Anselme, M.Bigerelle, *Acta Biomat.*, 2005, 1, 211–222.
67. Стоматологическая имплантология : учеб. пособие / А.В. Иванов [и др.]. - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000. – 96 с.
68. Jansen e.a. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *Journal of Controlled Release* 101 (2005) 127–136
69. Svehla e.a. The Effect of Substrate Roughness and Hydroxyapatite Coating Thickness on Implant Shear Strength. *The Journal of Arthroplasty* Vol. 17 No. 3 2002. 304-311
70. Chang YS, Gu HO, Kobayashi M, Oka M. Influence of various structure treatments on histological fixation of titanium implants. *J Arthroplasty* 1998;13(7):816–25
71. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis Vassilis Karageorgiou, David Kaplan. *Biomaterials* 26 (2005) 5474–5491
72. Jia Ping Li e.a. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. *Biomaterials* 28 (2007) 2810–2820
73. Meyer U, Joos U, Mythili J, Stamm T, Hohoff A, Fillies T, et al. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomaterials* 25 (2004) 1959–1967
74. Akay G, Birch MA, Bokhari MA. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. 2004
75. S.I. Shen, B.R. Jasti, X. Li. Chapter 22, Design of controlled release drug delivery systems. *Standard handbook of biomedical engineering and design*, McGRAW-HILL (2003).
76. J. S. Price, A. F. Tencer, D. M. Arm, G.A. Bohach. Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (1996) 281-286.
77. K.C. Popat, M. Eltgroth, T.J. La Tempa, C.A. Grimes, T.A. Desai. Decreased *Staphylococcus* epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes, *Biomaterials* 28 (2007) 4880–4888.
78. H. Kang, D. J. Kim , S. Park, J. Yoo, Y.S. Ryu. Controlled drug release using nanoporous anodic aluminum oxide on stent, *Thin Solid Films* 515 (2007) 5184–5187.
79. Ketul C. Popat, Matthew Eltgroth, Thomas J. LaTempa, Craig A. Grimes, Tejal A. Desai. Decreased *Staphylococcus* epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials* 28 (2007) 4880–4888
80. Ho-Jae Kang, Deug Joong Kim , Sung-Joon Park, Ji-Beom Yoo, Y.S. Ryu. Controlled drug release using nanoporous anodic aluminum oxide on stent. *Thin Solid Films* 515 (2007) 5184–5187
81. C.R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J. W. Costerton. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33 (2012) 5967-5982.
82. Susmita Bose , Mangal Roy, Amit Bandyopadhyay. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology.* 30, 2012, 546–554
83. Kun Mediaswanti, Cuie Wen , Elena P Ivanova , Christopher C Berndt , François Malherbe , Vy Thi Hong Pham and James Wang. A Review on Bioactive Porous Metallic Biomaterials. Mediaswanti et al., *J Biomim Biomater Tissue Eng* 2013, 18:1
84. P.H. Warnke, et al. Rapid prototyping: porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering *Tissue Eng C*, 15 (2009), pp. 115–124
85. A. Fukuda, M. Takemoto, T. Saito, S. Fujibayashi, M. Neo, Deepak K. Pattanayak, T. Matsushita, K. Sasaki, N. Nishida, T. Kokubo, T. Nakamura. Osteoinduction of porous

- Ti implants with a channel structure fabricated by selective laser melting. *Acta Biomaterialia* Volume 7, Issue 5, May 2011, Pages 2327–2336
86. Alida Mazzoli . Selective laser sintering in biomedical engineering. *Medical & Biological Engineering & Computing* March 2013, Volume 51, Issue 3, pp 245-256
 87. Бондаренко В.М. Механизмы формирования патогенности оппортунистическими микроорганизмами // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. — М., 2010. — С. 42-43
 88. Carla Renata Arciola, Davide Campoccia, Pietro Speziale, Lucio Montanaro, John William Costerton. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, Volume 33, Issue 26, September 2012, Pages 5967-5982;
 89. Herbert O Gbejuade, Andrew M Lovering, Jason C Webb. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthopaedica* Volume 86, Issue 2, 2015, 147-158
 90. I. Olsen. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* May 2015, Volume 34, Issue 5, pp 877-886
 91. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-93
 92. Qu Y., Daley A.J, Istivan T.S, Garland S.M, Deighton M.A. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010; 27:9-16
 93. Andrea Montali. Antibacterial coating systems. *Injury, Int. J. Care Injured* (2006) 37, S81—S86
 94. Hideyuki Kanematsu, Michiko Yoshitake. Nanocomposite Coating for Antibacterial Purposes. CHAPTER 23. *Handbook of Nanoceramic and Nanocomposite Coatings and Materials*, Elsevier, 2015
 95. Jiri Gallo , Martin Holinka1 and Calin S. Moucha. Antibacterial Surface Treatment for Orthopaedic Implants. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 13849-13880
 96. M. Katsikogianni and Y.F. Missirlis. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteriamaterial interactions. *European Cells and Materials* Vol. 8. 2004 37-57
 97. Davide Campoccia, Lucio Montanaro, Carla Renata Arciola. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* Volume 34, Issue 34, November 2013, Pages 8533–8554
 98. Bridgett MJ, Davies MC, Denyer SP, Eldridge PR. In vitro assessment of bacterial adhesion to Hydromer coated cerebrospinal fluid shunts. *Biomaterials* 1993; 14: 184;
 99. Kristinsson KG. Adherence of staphylococci to intravascular catheters. *J Med Microbiol* 1989; 28: 249-57
 100. Morra M, Cassineli C. Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1999; 10 (10): 1107-24
 101. Song, C.; Zheng, Y. Wetting-controlled strategies: From theories to bio-inspiration. *J. Colloid Interface Sci.* 2013, doi:10.1016/j.jcis.2013.10.067.;
 102. MacCallum, J.L.; Tieleman, D.P. Hydrophobicity scales: A thermodynamic looking glass into lipid-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* 2011, 36, 653–662;
 103. Bieser, A.M.; Tiller, J.C. Mechanistic considerations on contact-active antimicrobial surfaces with controlled functional group densities. *Macromol. Biosci.* 2011, 11, 526–534.;
 104. Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L.; Costerton, B.; DeMeo, P.; Shirtliff, M.; Gawalt, E.; Kathju, S. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*;
 105. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Academic Press (Elsevier): Waltham, MA, USA, 2013; pp. 565–583.

106. Liu Wai-Kin, Tebbs SE, Byrne PO, Elliott TSJ. The effect of electric current on bacteria colonising intravenous catheters. *J Infect* 1993; 27: 261-9
107. Badihi Hauslich, L.; Sela, M.N.; Steinberg, D.; Rosen, G.; Kohavi, D. The adhesion of oral bacteria to modified titanium surfaces: Role of plasma proteins and electrostatic forces. *Clin. Oral Implants Res.* 2013, 24, 49–56.
108. Singh, A.V.; Vyas, V.; Patil, R.; Sharma, V.; Scopelliti, P.E.; Bongiorno, G.; Podestà, A.; Lenardi, C.; Gade, W.N.; Milani, P. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS One* 2011, 6, e25029.
109. Visai L, De Nardo L, Punta C, Melone L, Cigada A, Imbriani M, Arciola CR. Titanium oxide antibacterial surfaces in biomedical devices. *Int J Artif Organs* 2011; 34: 929-946.
110. Buchholz HW, Gartmann HD. Infection prevention and surgical management of deep insidious infection in total endoprosthesis [German]. *Chirurg.* 1972; 43:446-453.
111. Klemm K. Gentamicin-PMMAbeads in treating bone and soft tissue infections [German]. *Zentralbl Chir.* 1979; 104:934-942
112. Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE, et al (1997) Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. *J Bone Joint Surg Br*; 79(4):590–95;
113. Walenkamp GH, Kleijn LL, de Leeuw M (1998) Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. *Acta Orthop Scand*; 69(5): 518–522;
114. Wininger DA, Fass RJ (1996) Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. *Antimicrob Agents Chemother*; 40(12):2675–2679.
115. Forster H, Marotta JS, Heseltine K, et al (2004) Bactericidal activity of antimicrobial coated polyurethane sleeves for external fixation pins. *J Orthop Res*; 22(3):671–677
116. Alexander N. Zelikin. Drug Releasing Polymer Thin Films: New Era of Surface-Mediated Drug Delivery. *ACS Nano*, 2010, 4 (5), pp 2494–2509
117. Price JS, Tencer AF, Arm DM, et al (1996) Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. *J Biomed Mater Res*; 30(3):281–286
118. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, et al (2003) Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone*; 32(5):52–531
119. K.C. Popat, M. Eltgroth, T.J. La Tempa, C.A. Grimes, T.A. Desai. Decreased *Staphylococcus epidermis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes, *Biomaterials* 28 (2007) 4880–4888.
120. H. Kang, D. J. Kim , S. Park, J. Yoo, Y.S. Ryu. Controlled drug release using nanoporous anodic aluminum oxide on stent, *Thin Solid Films* 515 (2007) 5184–5187.
121. J. Salonen, A.M. Kaukonen, J. Hirvonen, V. Lehto. Mesoporous Silicon in Drug Delivery Applications, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 632-653.
122. J.M. Rogers-Foy, D.L. Powers, D.A. Brosnan, S.F. Barefoot, R.J. Friedman, M. LaBerge. Hydroxyapatite composites designed for antibiotic drug delivery and bone reconstruction: a caprine model. *J. Invest. Surg.* 12 (1999) 263-275.
123. X. Chen, Q.W. Li, X.M. Wang. Chapter 8: Gold nanostructures for bioimaging, drug delivery and therapeutics, *Precious Metals for Biomedical Applications* (2014) 163–176.
124. Zalavras CG, Patzakis MJ, Holtom P (2004) Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*; 427:86–93;
125. Gristina A (1987) Biomaterial centred infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*; 237:1588–1595;

126. Springer BD, Lee GC, Osmon D, et al (2004) Systemic safety of high-dose antibiotic-loaded cement spacers after resection of an infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*; 427:47–51
127. Scott CP, Higham PA, Dumbleton JH (1999) Effectiveness of bone cement containing tobramycin. An in vitro susceptibility study of 99 organisms found in infected joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br*; 81(3):440–43;
128. Stemberger A, Grimm H, Bader F, et al (1997) Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagengentamicin sponge. *Eur J Surg Suppl*; 578:17–26
129. Ho-Jae Kang, Deug Joong Kim, Sung-Joon Park, Ji-Beom Yoo, Y.S. Ryu. Controlled drug release using nanoporous anodic aluminum oxide on stent. *Thin Solid Films* 515 (2007) 5184–5187
130. P. Horcajada, A. Ramila, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Reg. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Microporous and Mesoporous Materials* 68 (2004) 105–109
131. Catalina Marambio-Jones, Eric M. V. Hoek. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Review Paper *Journal of Nanoparticle Research* June 2010, Volume 12, Issue 5, pp 1531-1551
132. Svetlana Chernousova and Prof. Dr. Matthias Epple. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angewandte Chemie International Edition* Volume 52, Issue 6, pages 1636–1653, 2013
133. V. Stranak, H. Wulff, H. Rebl, C. Zietz, K. Arndt, R. Bogdanowicz, B. Nebe, R. Bader, A. Podbielski, Z. Hubicka, R. Hippler. *Materials Science and Engineering C* 31 (2011) 1512–1519;
134. W. Chen, S. Oh, A.P. Ong, N. Oh, Y. Liu, H.S. Courtney, M. Appleford and J.L. Ong. Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 82A, 899–906, 2007
135. Akhavan. Lasting antibacterial activities of Ag–TiO₂/Ag/a-TiO₂ nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336, 2009, 117–124
136. Hyung-Jun Jeon, Sung-Chul Yi, Seong-Geun Oh. Preparation and antibacterial effects of Ag–SiO₂ thin films by sol–gel method. *Biomaterials* 24, 2003, 4921–4928
137. Niall Stobie, Brendan Duffy, Declan E. McCormack, John Colreavy, Martha Hidalgo, Patrick McHale, Steven J. Hinder. Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol–gel coating. *Biomaterials* 29, 2008, 963–969
138. The chemistry of metal CVD/ ed. by Toivo Kodas and Mark Hampden-Smith. - Weinheim; New York ;Base1 ; Cambridge ; Tokyo : VCH, 1994
139. Сыркин В.Г. CVD-метод. Химическое парофазное осаждение, М., Наука, 2000
140. H.A. Foster, D.W. Sheel, P. Sheel, P. Evans, S. Varghese, N. Rutschke, H.M. Yates. Antimicrobial activity of titania/silver and titania/copper films prepared by CVD. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 216 (2010) 283–289;
141. Jitti Mungkalasiri, Laurent Bedel, Fabrice Emieux, Jeanne Doré, François N. R. Renaud, Christos Sarantopoulos, Francis Maury. CVD Elaboration of Nanostructured TiO₂-Ag Thin Films with Efficient Antibacterial Properties. *Chemical Vapor Deposition* 16, 35–41, 2010
142. S. Varghese, S. Elfakhri, D.W. Sheel, P. Sheel, F.J. Bolton, H.A. Foster. Novel antibacterial silver-silica surface coatings prepared by chemical vapour deposition for infection control. *Journal of Applied Microbiology* 115, 1107–1116, 2013;
143. Cook, Ian; Sheel, David W; Foster, Howard A; Varghese, Sajnu. Durability of Silver Nanoparticulate Films Within a Silica Matrix by Flame Assisted Chemical Vapour

- Deposition for Biocidal Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11, 2011, 8337-8342(6)
144. David W. Sheel, Lucy A. Brook, and Heather M. Yates. Controlled Nanostructured Silver Coated Surfaces by Atmospheric Pressure Chemical Vapor Deposition. *Chemical Vapor Deposition* 14, 2008, 14-24
 145. G.J Chi, S.W Yao, J Fan, W.G Zhang, H.Z Wang. Antibacterial activity of anodized aluminum with deposited silver. *Surface and Coatings Technology* 157, 2–3, 2002, 162–165
 146. F. Pishbin, V. Mouriño, J.B. Gilchrist, D.W. McComb, S. Kreppel, V. Salih, M.P. Ryan, A.R. Boccaccini. Single-step electrochemical deposition of antimicrobial orthopaedic coatings based on a bioactive glass/chitosan/nano-silver composite system. *Acta Biomaterialia* 9, 2013, 7469–7479
 147. Xiong Lu, Bailin Zhang, Yingbo Wang, Xianli Zhou, Jie Weng, Shuxin Qu, Bo Feng, Fumio Watari, Yonghui Ding, Yang Leng. Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition. *J. R. Soc. Interface* (2011) 8, 529–539
 148. J L Endrino, A Anders, J M Albella, J A Horton, T H Horton, P R Ayyalasomayajula and M Allen. Antibacterial efficacy of advanced silver-amorphous carbon coatings deposited using the pulsed dual cathodic arc technique. *Journal of Physics: Conference Series*, 252, 012012, 2010;
 149. S.C.H. Kwok, W. Zhang, G.J. Wan, D.R. McKenzie, M.M.M. Bilek, Paul K. Chu. Hemocompatibility and anti-bacterial properties of silver doped diamond-like carbon prepared by pulsed filtered cathodic vacuum arc deposition. *Diamond and Related Materials* 16, 2007, 1353–1360
 150. Powell R.A., Rossmagel S.M. *Thin Films*. San Diego, Academic Press, 1999. - 419 p.
 151. G. Bräuer, B. Szyszka, M. Vergöhl, R. Bandorf. Magnetron sputtering – Milestones of 30 years. *Vacuum* 84, Issue 12, 25 2010, 1354–1359
 152. P.J Kelly, R.D Arnell. Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. *Vacuum* 56, Issue 3, 2000, 159–172
 153. D.V. Shtansky, N.A. Gloushankova, A.N. Sheveiko, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev, I.A. Bashkova, B.N. Mavrin, S.G. Ignatov, S.Yu. Filipovich and C.Rojas, *Surf. Coat. Technol.*, 2010, **205**, 728-739.
 154. D.V. Shtansky, N.A. Gloushankova, I.A. Bashkova, M.A. Kharitonova, T.G. Moizhess, A.N. Sheveiko, F.V. Kiryukhantsev-Korneev, A. Osaka, B.N. Mavrin, E.A. Levashov, *Surf. Coat. Technol.*, 2008, **202**, 3615-3624.
 155. W. Kulisch, P. Colpo, P.N. Gibson, G. Ceccone, D.V. Shtansky, E.A. Levashov, M. Jelinek, P.J.M. Philip and F. Rossi, *Appl. Phys. A*, 2006, **A82**, 503-507.
 156. W. Kulisch, P. Colpo, P.N. Gibson, G. Ceccone, D.V. Shtansky, E.A. Levashov and F. Rossi, *Surf. Coat. Technol.*, 2004, **188-189**, 735-740.
 157. W. Kulisch, P. Colpo, F. Rossi, D.V. Shtansky and E.A. Levashov, *Surf. Coat. Technol.*, 2004, **188-189**, 714-720.
 158. J.C. Imbert, L. de Pouques, C. Boisse-Laporte, J. Bretagne, M.C. Hugon, L. Teule-Gay, M. Touzeau, D. Shtansky and O. Voldoire, *Surf. Coat. Technol.*, 2005, **200**, 717-720.
 159. W. Chen, Y. Liu, H.S Courtney, M. Bettenga, C.M. Agrawal, J.D. Bumgardner, J.L. Ong. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 27, 2006, 5512–5517
 160. K. Jamuna-Thevi, S.A. Bakar, S. Ibrahim, N. Shahab, M.R.M. Toff. Quantification of silver ion release, in vitro cytotoxicity and antibacterial properties of nanostructured Ag doped TiO₂ coatings on stainless steel deposited by RF magnetron sputtering. *Vacuum* 86, 2011, 235–241
 161. V Zaporozhchenko, R Podschun, U Schürmann, A Kulkarni and F Faupel.

- Physico-chemical and antimicrobial properties of co-sputtered Ag–Au/PTFE nanocomposite coatings. *Nanotechnology* 17 (2006) 4904–4908
162. P.J. Kelly, H. Li, K.A. Whitehead, J. Verran, R.D. Arnell, I. Iordanova. A study of the antimicrobial and tribological properties of TiN/Ag nanocomposite coatings *Surface and Coatings Technology* 204, 6–7, 25 2009, 1137–1140
 163. P.J. Kelly, H. Li, P.S. Benson, K.A. Whitehead, J. Verran, R.D. Arnell, I. Iordanova. Comparison of the tribological and antimicrobial properties of CrN/Ag, ZrN/Ag, TiN/Ag, and TiN/Cu nanocomposite coatings. *Surface and Coatings Technology* 205, 2010, 1606–1610
 164. [Heng-Li Huang, Yin-Yu Chang, Meng-Cheng Lai, Cai-Rong Lin, Chih-Ho Lai, Tzong-Ming Shieh. Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants. *Surface and Coatings Technology* 205, 2010, 1636–1641
 165. K. Baba, R. Hatada, S. Flege, W. Ensinger, Y. Shibata, J. Nakashima, T. Sawase, T. Morimura. Preparation and antibacterial properties of Ag-containing diamond-like carbon films prepared by a combination of magnetron sputtering and plasma source ion implantation. *Vacuum* 89, 2013, 179–184
 166. Берлин Е.В. Получение тонких пленок реактивным магнетронным распылением / Е.В. Берлин, Л.А. Сейдман. - М.: Техносфера, 2014. - 255 с. - (Мир материалов и технологий).
 167. P.J. Kelly, H. Li, K.A. Whitehead, J. Verran, R.D. Arnell, I. Iordanova. A study of the antimicrobial and tribological properties of TiN/Ag nanocomposite coatings. *Surface & Coatings Technology* 204 (2009) 1137–1140
 168. O. Baghriche, J. Kiwi, C. Pulgarin, R. Sanjines. Antibacterial Ag-ZrN Surfaces Promoted by Subnanometric ZrN-clusters Deposited by Reactive Pulsed Magnetron Sputtering. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Accepted Manuscript
 169. J.C. Sánchez-López M.D. Abad, I. Carvalho, R. Escobar Galindo, N. Benito, S. Ribeiro, M. Henriques, A. Cavaleiro f, S. Carvalho. Influence of silver content on the tribomechanical behavior on Ag-TiCN bioactive coatings. *Surface & Coatings Technology* 206 (2012) 2192–2198
 170. P.J. Kelly, H. Li, P.S. Benson, K.A. Whitehead, J. Verran, R.D. Arnell, I. Iordanova Comparison of the tribological and antimicrobial properties of CrN/Ag, ZrN/Ag, TiN/Ag, and TiN/Cu nanocomposite coatings. *Surface & Coatings Technology* 205 (2010) 1606–1610
 171. C. Dai, Y. Yuan, C. Liu, J. Wei, H. Hong, X. Li, X. Pan, *Biomaterials* 30 (2009) 5364.
 172. M. Kawashita, S. Tsuneyama, F. Miyaji, T. Kokubo, H. Kozuka, K. Yamamoto, *Biomaterials* 21 (2000) 393.
 173. F. Furno, K.S. Morley, B. Wong, B.L. Sharp, P.L. Arnold, S.M. Howdle, R. Bayston, P.D. Brown, P.D. Winship, H.J. Reid, *J. Antimicrob. Chemother.* 54 (2004) 1019.
 174. L.Chen, L. Zheng, Y. Lv, H. Liu, G. Wang, N. Ren, D. Liu, J. Wang, R.I. Boughton, *Surf. Coat. Technol.* 204 (2010) 3871.
 175. V. Stanic, D. Janackovi, S. Dimitrijevic, S.B. Tanaskovic, M. Mitric, M.S. Pavlovic, A. Krstic, D. Jovanovic, S. Raicevi, *Appl. Surf. Sci.* 527 (2011) 4510.
 176. V.Ilić, Z. Šaponjić, V. Vodnik, B. Potkonjakc, P. Jovančić, J. Nedeljković, M. Radetić, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 564.
 177. R. Kumar, H. Munstedt, *Biomaterials* 26 (2005) 2081.
 178. B. Mahltig, U. Soltmann, H. Haase, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 979.
 179. X. Xu, Q. Yang, Y. Wang, H. Yu, X. Chen, X. Jing, *Eur. Polym. J.* 42 (2006) 2081.
 180. Q. Shi, N. Vitchuli, J. Nowak, J.M. Caldwell, F. Breidt, M. Bourham, X. Zhang, *Mccord, M. Eur. Polym. J.* 47 (2011) 1402.

181. C. Zhao, B. Feng, Y. Li, J. Tan, X. Lu, J. Weng, *Appl. Surf. Sci.* 280 (2013) 8.
182. D.-H. Song, S.-H. Uhm, S.-E. Kim, J.-S. Kwon, J.-G. Han, K.-N. Kim, *Mater. Res. Bull.* 47 (2012) 2994.
183. S. Jaiswal, K. Bhattacharaya, M. Sullivan, M. Walsh, B.S. Creaven, F. Laffir, B. Duffy, P. McHale, *Colloids Surf. B* 102 (2013) 412.
184. B.S. Necula, J.P.T.M. van Leeuwen, L.E. Fratila-Apachitei, S.A.J. Zaat, I. Apachitei, J. Duszczek, *Acta Biomater.* 8 (2012) 4191.
185. O. Akhavana, E. Ghaderi, *Surf. Coat. Technol.* 204 (2010) 3676.
186. Y. Chen, X. Zheng, Y. Xie, C. Ding, H. Ruan, C. J. Fan, *Mater. Sci. - Mater. Med.* 19 (2008) 3603.
187. K. Jamuna-Thevi, S.A. Bakar, S. Ibrahim, N. Shahab, M.R.M. Toff, *Vacuum* 86 (2011) 235.
188. B. Li, X. Liu, F. Meng, J. Chang, C. Ding, Preparation and antibacterial properties of plasma sprayed nano-titania/silver coatings. *Mater. Chem. Phys.* 118 (2009) 99.
189. D.H. Munstedt, A. Rosch, The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Mater. Chem. Phys.* 108 (2008) 61.
190. D.-H. Song, S.-H. Uhm, S.-B. Lee, J.-G. Han, K.-N. Kim, *Thin Solid Films* 519 (2011) 7079.
191. J. Wang, Z. Wang, S. Guo, J. Zhang, Y. Song, X. Dong, X. Wang, J. Yu, *Microporous Mesoporous Mater.* 146 (2011) 216.
192. S. Jaiswal, P. McHale, B. Duffy, *Colloids Surf. B* 94 (2012) 170.
193. H.J. Ruan, C.Y. Fan, X.B. Zheng, Y. Zhang, Y.K. Chen, *Chin. Sci. Bull.* 54 (2009) 4438.
194. Q.L. Feng, T.N. Kim, J. Wu, E.S. Park, J.O. Kim, D.Y. Lim, F.Z. Cu, *Thin Solid Films* 335 (1998) 214.
195. A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M. Ferreira, *Dent. Mater.* 24 (2008) 1343.
196. N. Stobie, B. Duffy, S.J. Hinder, P. McHale, D.E. McCormack, *Colloids Surf. B* 72 (2009) 62.
197. D.V. Shtansky, I.V. Batenina, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev, A.N. Sheveyko, K.A. Kuptsov, I.Y. Zhitnyak, N.Yu. Anisimova, N.A. Gloushankova, *Appl. Surf. Sci.* 285P (2013), 331.
198. Baoye Li, Xuanyong Liu, Fanhao Meng, Jiang Chang, Chuanxian Ding. Preparation and antibacterial properties of plasma sprayed nano-titania/silver coatings. *Materials Chemistry and Physics* 118 (2009) 99–104
199. W. Chen, Y. Liu, H.S. Courtney, M. Bettenga, C.M. Agrawal, J.D. Bumgardner, J.L. Ong. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 27 (2006) 5512–5517
200. Venkateswarlu Kotharu, Rameshbabu Nagumothu, Chandra Bose Arumugam, Muthupandi Veerappan, Subramanian Sankaran, MubarakAli Davoodbasha, Thajuddin Nooruddin. Fabrication of corrosion resistant, bioactive and antibacterial silver substituted hydroxyapatite/titania composite coating on Cp Ti. *Ceramics International* 38 (2012) 731–740
201. Chenglong Dai, Yuan Yuan, Changsheng Liu, Jie Wei, Hua Hong, Xiaosheng Li, Xiaohua Pan. Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control. *Biomaterials* 30 (2009) 5364–5375
202. Yu-Jie Chang, Chia-Lin Li, Jyh-Wei Lee, Fan-Bin Wu, Li-Chun Chang. Evaluation of antimicrobial abilities of Cr₂N/Cu multilayered thin films. *Thin Solid Films* 518 (2010) 7551–7556.
203. Heng-Li Huang, Yin-Yu Chang, Meng-Cheng Lai, Cai-Rong Lin, Chih-Ho Lai, Tzong-Ming Shieh. Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants. *Surface & Coatings Technology* 205 (2010) 1636–1641;

204. Simon H. Stelzig, Christin Menneking, Michael S. Hoffmann, Klaus Eisele, Stephan Barcikowski, Markus Klapper, Klaus Mullen. Compatibilization of laser generated antibacterial Ag- and Cu-nanoparticles for perfluorinated implant materials. *European Polymer Journal* 47 (2011) 662–667;
205. Chao-Hua Xue, Jia Chen, Wei Yin, Shun-Tian Jia, Jian-Zhong Ma. Superhydrophobic conductive textiles with antibacterial property by coating fibers with silver nanoparticles. *Applied Surface Science* 258 (2012) 2468–2472;
206. Vesna Ilić, Zoran Šaponjić, Vesna Vodnik, Branislav Potkonjak, Petar Jovančić, Jovan Nedeljković, Maja Radetić. The influence of silver content on antimicrobial activity and color of cotton fabrics functionalized with Ag nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 78 (2009) 564–569;
207. Ivan Sondi, Branka Salopek-Sondi. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275 (2004) 177–182;
208. Mahendra Rai, Alka Yadav, Aniket Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27 (2009) 76–83
209. J.H. Hsieh, C.C. Chang, C. Li, S.J. Liu, Y.K. Chang Effects of Ag contents on antibacterial behaviors of TaON–Ag nanocomposite thin films. *Surface & Coatings Technology* 205 (2010) S337–S340
210. Masse A, Bruno A, Bosetti M, et al (2000) Prevention of pin track infection in external fixation with silver coated pins: clinical and microbiological results. *J Biomed Mater Res*; 53(5):600–604;
211. Kraft CN, Hansis M, Arens S, et al (2000) Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res*; 49(2):192–199
212. Y.F. Zheng, B.B. Zhang, B.L. Wang, Y.B. Wangb, L. Li, Q.B. Yang, L.S. Cui. Introduction of antibacterial function into biomedical TiNi shape memory alloy by the addition of element Ag. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 2758–2767
213. P.V. AshaRani, G.L.K. Mun, M.P. Hande, S. Valiyaveetil, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3 (2009) 279. K. Kawata, M. Osawa, S. Okabe, In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 6046
214. Marques MRC, Laobenberg R, Almukainzi M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolut Technol* 2011;**18**:15-28.
215. H. H. Lara, E. N. Garza-Treviño, L. Ixtapan-Turrent, D.K. Singh, J. Nanobiotechnology 9 (2011) 30.; G.A. Sotiriou, S.E. Pratsinis, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 5649
216. J.R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J. T. Ramirez, M.J. Yacaman, *Nanotechnology* 16 (2005) 2346.; S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash, *Nanotechnology* 18 (2007) 225103.; I. Sondi, B.J. Salopek-Sondi, *Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 177



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, 142279

тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

e-mail: info@obolensk.org, <http://www.obolensk.org>

ОКПО 78095326 ОГРН 1055011113772 ИНН 5077018190 КПП 507701001

АКТ ИСПЫТАНИЙ ИМПЛАНТАТОВ С ПОКРЫТИЕМ TiCaPCON-Ag

Проведены испытания бактериостатического эффекта имплантатов с многокомпонентными наноструктурными покрытиями TiCaPCON-Ag, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». В ФБУН ГНЦ ПМБ на испытания было передано 7 групп образцов по 10 образцов в каждой группе:

Группа 1: Подложки титана марки BT1-0 производства ООО «Конмет» - образец сравнения.

Группа 2: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON, полученном методом магнетронного распыления композиционной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - образец сравнения.

Группа 3: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON, полученном методом магнетронного распыления композиционной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, и дополнительным ионным травлением поверхности - образец сравнения.

Группа 4: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON-Ag, полученным путем ионной имплантацией Ag в ранее осажденное покрытие TiCaPCON.

Группа 5: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON-Ag, полученным путем ионной имплантацией Ag в ранее осажденное покрытие TiCaPCON, и дополнительным ионным травлением поверхности.

Группа 6: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON-Ag, полученным путем одновременного магнетронного распыления композиционной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и ионного распыления мишени Ag.

Группа 7: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON-Ag, полученным путем одновременного магнетронного распыления композиционной мишени $TiC+10\%Ca_3(PO_4)_2$ и ионного распыления мишени Ag, и дополнительным ионным травлением поверхности.

Культивирование микроорганизмов проводили в стерильном культуральном 12-луночном планшете «Corning® Costar®». В лунки планшета вносили образцы и добавляют по 1,7 мл стерильного физиологического раствора. Микробную взвесь исследуемого штамма готовили путем суспендирования изолированных колоний из 24-часовой культуры с последующим культивированием на ГРМ среде. Методом серийных 10-кратных разведений в забуференном физиологическом растворе (ЗБФР) доводили концентрацию микроорганизмов до 10^6 КОЕ/мл. Далее в каждую из лунок планшета добавляли 170 мкл полученной суспензии. Содержимое лунок хорошо перемешивали и помещали планшет в термостат при 37°С. Отбор проб производили через 3 и 24 часа экспозиции. Содержимое каждой лунки титровали методом серийных 10-кратных разведений. Затем высевали по 100 мкл из каждой лунки на чашки со средой ГРМ-агар. Чашки инкубировали в термостате в течение суток при температуре 37°С и затем подсчитывали титр культуры. Бактерицидную активность образцов изучали для штамма E.coli.

Результаты испытаний приведены в Таблице 1.

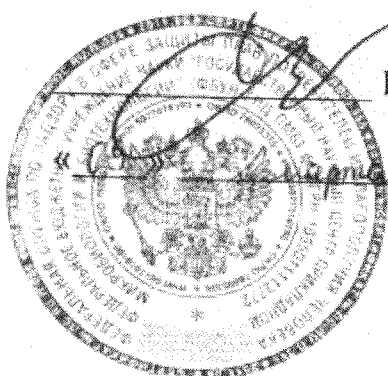
Таблица 1 – Количество колоний микроорганизмов после инкубации с тестируемыми образцами

Образец	Титр культуры, КОЕ/мл	
	Без предварительной выдержки образцов в физиологическом растворе	
	3 ч	24 ч
Стекло	$(8 \pm 1) \times 10^5$	$(12 \pm 3) \times 10^5$
Группа 1	$(11 \pm 0,5) \times 10^5$	$(12 \pm 4) \times 10^5$
Группа 2	$(16 \pm 4) \times 10^5$	$(8 \pm 2) \times 10^6$
Группа 3	$(14 \pm 4) \times 10^5$	$(14 \pm 1) \times 10^6$
Группа 4	$(4 \pm 1) \times 10^5$	$(5 \pm 1) \times 10^2$
Группа 5	$(11 \pm 2) \times 10^5$	$(6 \pm 4) \times 10^5$
Группа 6	$(7 \pm 1) \times 10^5$	<0,01
Группа 7	$(7 \pm 3) \times 10^5$	$(3 \pm 1) \times 10^3$
	С предварительной выдержкой образцов в физиологическом растворе	
	3 ч	24 ч
Стекло	$(4 \pm 1) \times 10^5$	$(12 \pm 1) \times 10^5$
Группа 1	$(6 \pm 2) \times 10^5$	$(8 \pm 4) \times 10^5$
Группа 2	$(3 \pm 1) \times 10^5$	$(11 \pm 3) \times 10^5$

Группа 3	$(4 \pm 0.5) \times 10^5$	$(9 \pm 1) \times 10^5$
Группа 4	$(4 \pm 1) \times 10^2$	<0,01
Группа 5	$(5 \pm 1) \times 10^3$	<0,01
Группа 6	$(4 \pm 1) \times 10^2$	<0,01
Группа 7	$(6 \pm 2) \times 10^2$	<0,01

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все покрытия обладают значительной антибактериальной активностью. Наибольший эффект проявляется в случае покрытий из группы 6, антибактериальная активность которого достигла 100% через 24 часа после инкубации.

Директор
ФБУН ГНЦ ПМБ



И.А.Дятлов

2015 г.

Зав. лаб. нанобиотехнологии
ФБУН ГНЦ ПМБ
д.б.н.

С.Г.Игнатов

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

115478 Москва, Каширское шоссе, д.24
Тел. +7(499)324-11-14, +7(499)324-11-24, факс +7(499)323-57-77
ОГРН 1037739447525, ИНН/КПП 7724075162/772401001

АКТ ИСПЫТАНИЙ

г. Москва

« » 2015 г.

Проведены испытания биосовместимости и биоактивности *in vitro* имплантатов с многокомпонентными наноструктурными покрытиями TiCaPCON-Ag, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете МИСИС. В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» на испытания было передано 7 групп образцов по 15 образцов в каждой группе.

Группа 1: Подложки титана марки BT1-0 производства ООО «Конмет» - образец сравнения.

Группа 2: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON, полученным методом магнетронного распыления композиционной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – образец сравнения.

Группа 3: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON, полученным методом магнетронного распыления композиционной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, и дополнительным ионным травлением поверхности - образец сравнения.

Группа 4: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON-Ag, полученным путем ионной имплантацией Ag в ранее осажденное покрытие TiCaPCON.

Группа 5: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON-Ag, полученным путем ионной имплантацией Ag в ранее осажденное покрытие TiCaPCON, и дополнительным ионным травлением поверхности.

Группа 6: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON-Ag, полученным путем одновременного магнетронного распыления композиционной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и ионного распыления мишени Ag.

Группа 7: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON-Ag, полученным путем одновременного магнетронного распыления композиционной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и ионного распыления мишени Ag, и дополнительным ионным травлением поверхности.

Исследование организации актинового цитоскелета и фокальных адгезий с использованием флуоресцентно меченного фаллоидина и моноклональных антител к белку фокальных адгезий паксиллину позволяет оценить адгезивность тестируемых материалов. При анализе организации актинового цитоскелета и распределения фокальных адгезий в клетках MC3T3-E1 был использован метод двухканальной флуоресцентной микроскопии. Клетки MC3T3-E1 рассеивали на поверхность тестируемых образцов, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия). Культуры росли в термостате при 37°C в атмосфере с добавлением 5% CO_2 . Через 24 часа после посева клетки фиксировали 3,7% параформом, мембрану фиксированных клеток экстрагировали 0,5% Тритоном X100 в течение 3 мин.

Препараты инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами к белку фокальных адгезий паксиллину (BD Transduction Laboratories, США) в разведении 1:200 в течение 30 мин, после чего антитела отмывали три раза фосфатным буферным раствором. Препараты инкубировали с вторичными козыными антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуоресцентным красителем TRITC (Sigma, США) и фаллоидином, флуоресцентно-меченным Alexa488 (Molecular Probes, США), специфически связывающим филаментный актин. Далее препараты отмывали три раза фосфатным буферным раствором и заключали в фиксирующей среде, поместив на предметные стекла.

Препараты исследовали с использованием микроскопа Axioplan (Zeiss, Германия) с масляным объективом х63 и камеры высокого разрешения C8484-05 (Hamamatsu, Япония). 30 индивидуальных клеток фотографировали с помощью камеры C8484-05 в двух каналах флуоресценции (ex/em - 488 nm/515 nm и ex/em - 570 nm/602 nm) для морфометрического анализа и анализа актинового цитоскелета и фокальных адгезий. В программе Image J обрисовывали контуры клеток и определяли их площади, после чего определялось среднее значение площади клеток для каждого образца.

Жизнеспособность клеток, растущих на тестируемых подложках оценивали с помощью теста на пролиферацию. Остеогенные клетки MC3T3-E1 рассеивали на поверхность пластинок, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки

(РАА, Австрия). Культуры росли в термостате при 37°C, среду меняли на свежую на третий и на пятый день инкубации. Через 1, 3, 5 дней после посева клетки фиксировали 3,7% раствором параформальдегида, мембрану фиксированных клеток экстрагировали 0,5% Тритоном X100. Клетки MC3T3-E1 окрашивали ядерным флуоресцентным красителем DAPI (Sigma, США) и заключали в фиксирующую среду на предметных стеклах. Препараты исследовали с помощью микроскопа Axioplan (Zeiss, Германия) с объективом х40, камеры высокого разрешения C8484-05 (Hamamatsu, Япония). Подсчитывали количество клеток в 30 полях зрения и определяли среднее значение плотности клеточной популяции.

Исследование биоактивности было осуществлено с использованием раннего маркера остеогенной дифференцировки – активности щелочной фосфатазы. Для этого клетки MC3T3-E1 рассеивали на поверхность тестируемых подложек, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. На следующий день среду меняли на α -MEM (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицерофосфата. Культуры росли в термостате при 37°C, через каждые три дня среду заменяли на свежую.

Остеобласты, растущие в течение 14 дней на тестируемых подложках и на контрольных адгезивных стеклах, снимали с поверхности подложки 0,1% трипсином на ЭДТА и промывали фосфатным буфером. После центрифугирования при 7000 об/мин в течение 3 мин в центрифуге Эппендорф при +4°C осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл 0,1% раствора тритона X100 в 10 мМ буфере Трис-HCl с 5 мМ MgCl₂. Далее осадок клеток лизировали в 3-х циклах последовательного замораживания-оттаивания (в морозильнике при - 30°C, в воде комнатной температуры). После центрифугирования клеток при 13 000 об/мин в течение 15 мин в центрифуге Эппендорф отбирали 150 мкл аликвоты супернатантов. В супернатантах определяли содержание белка по методу Брэдфорда с помощью кита BioRad Laboratories (США) и с использованием спектрофотометра Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США) при 630 нм.

В качестве субстрата колориметрической реакции использовали р-нитрофенилфосфат (BioRad Laboratories, США). В 96-луночных планшетах к 20 мкл супернатанта (в трех повторях) добавляли 100 мкл р-нитрофенилфосфата, реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин. При ферментативном расщеплении бесцветного р-нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой остеобластов образуется р-нитрофенол, имеющий желтое окрашивание. Продукт реакции определялся в области поглощения 405 нм с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200. Активность щелочной

фосфатазы оценивали по концентрации р-нитрофенола, освобождающегося в результате реакции в единицу времени на миллиграмм клеточного белка (нМ р-нитрофенола /мин/мг белка).

В таблицах 1-3 представлены результаты испытаний.

Таблица 1 - Площадь распластывания клеток линии МСЗТЗ на разных типах подложек

Образец	Площадь, мкм ²
Стекло	1480±117,7
Группа 1	1791±105,7
Группа 2	1654±117,4
Группа 3	1605±140,5
Группа 4	1567±96,6
Группа 5	1567±160,4
Группа 6	1213±74,8
Группа 7	1182±107,9

Таблица 2 - Пролиферация клеток МСЗТЗ-Е1

Образцы	1 день	3 день	5 день
Стекло	28,0 ± 1,6	33,1 ± 2,6	41,5 ± 2,2
Группа 1	31,3 ± 2,6	36,0 ± 1,5	39,3 ± 1,8
Группа 2	28,4 ± 2,5	40,1 ± 1,4	41,8 ± 1,6
Группа 3	28,0 ± 2,1	36,3 ± 1,6	39,2 ± 1,8
Группа 4	21,1 ± 1,5	22,4 ± 1,4	29,9 ± 2,4
Группа 5	33,0 ± 2,2	28,7 ± 2,1	27,8 ± 1,3
Группа 6	33,7 ± 2,2	25,7 ± 2,5	24,6 ± 2,5
Группа 7	33,9 ± 1,5	18,3 ± 2,5	5,4 ± 0,6

Таблица 3 - Активность щелочной фосфатазы

Образец	Активность щелочной фосфатазы
F12 (недифференцирующая среда)	35 ± 4
Alpha-MEM (дифференцирующая среда)	245 ± 22
Группа 1	304 ± 40
Группа 2	251 ± 16
Группа 3	274 ± 30
Группа 4	336 ± 13
Группа 5	309 ± 27
Группа 6	265 ± 24
Группа 7	175 ± 23

Полученные результаты свидетельствуют о том, что образцы групп 1-6 обладают высоким уровнем биосовместимости и биоактивности. Образцы групп 7-8 проявляют цитотоксический эффект.

УТВЕРЖДАЮ


Заместитель директора
ФБГНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Академик РАН, проф.



М.Р.Личиницер

2015 г.

Зав. лабораторией механизмов канцерогенеза
РОНЦ им. Н.Н. Блохина
д.б.н.

 Н.А. Глушанкова

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России)

115478 Москва, Каширское шоссе, д.24
Тел. +7(499)324-11-14, +7(499)324-11-24, факс +7(499)323-57-77
ОГРН 1037739447525, ИНН/КПП 7724075162/772401001

АКТ ИСПЫТАНИЙ

г. Москва

« » _____ 2015 г.

Проведены испытания биоактивности *in vitro* имплантатов с гибридным покрытием Ti/TiCaPCON/Аугментин, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». В «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» на испытания было передано 7 групп образцов по 6 образцов в каждой группе:

Группа 1: Подложки титана марки BT1-0 производства ООО «Конмет» - образец сравнения

Группа 2: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием TiCaPCON, полученном методом магнетронного распыления композиционной мишени $TiC+10\%Ca_3(PO_4)_2$ – образец сравнения.

Группа 3: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием Ti, полученным методом селективного лазерного спекания – образец сравнения.

Группа 4: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием Ti с ячеистой структурой, полученным методом селективного лазерного спекания, и финишным покрытием TiCaPCON, полученным методом магнетронного осаждения – образец сравнения.

Группа 5: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием Ti с ячеистой структурой, полученным методом селективного лазерного спекания, и финишным покрытием TiCaPCON, полученным методом магнетронного осаждения. Нагрузка Аугментина составляла $0,3 \text{ мг/см}^2$.

Группа 6: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием Ti с ячеистой структурой, полученным методом селективного лазерного спекания, и финишным покрытием

TiCaPCON, полученным методом магнетронного осаждения. Нагрузка Аугментина составляла $0,03 \text{ мг/см}^2$.

Группа 7: Подложки титана марки BT1-0 с покрытием Ti с ячеистой структурой, полученным методом селективного лазерного спекания, и финишным покрытием TiCaPCON, полученным методом магнетронного осаждения. Нагрузка Аугментина составляла $2,4 \text{ мг/см}^2$.

Исследование биоактивности было осуществлено с использованием раннего маркера остеогенной дифференцировки – активности щелочной фосфатазы (ЩФ). Клетки MC3T3-E1 рассевали на поверхность тестируемых подложек, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. На следующий день среду меняли на α -MEM (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10 мМ глицерофосфата. Культуры росли в термостате при 37°C , через каждые три дня среду заменяли на свежую. Остеобласты, растущие в течение 14 дней на тестируемых подложках и на контрольных адгезивных стеклах, снимали с поверхности подложки 0,1% трипсином на ЭДТА и промывали фосфатным буфером. После центрифугирования при 7000 об/мин в течение 3 мин в центрифуге Эппендорф при $+4^\circ\text{C}$ осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл 0,1% раствора тритона X100 в 10 мМ буфере Трис-HCl с 5 мМ MgCl_2 . Далее осадок клеток лизировали в 3-х циклах последовательного замораживания-оттаивания (в морозильнике при -30°C , в воде комнатной температуры). После центрифугирования клеток при 13 000 об/мин в течение 15 мин в центрифуге Эппендорф отбирали 150 мкл аликвоты супернатантов. В супернатантах определяли содержание белка по методу Брэдфорда с помощью кита BioRad Laboratories (США) и с использованием спектрофотометра Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США) при 630 нм.

В качестве субстрата колориметрической реакции использовали р-нитрофенилфосфат (BioRad Laboratories, США). В 96-луночных планшетах к 20 мкл супернатанта (в трех повторях) добавляли 100 мкл р-нитрофенилфосфата, реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин. При ферментативном расщеплении бесцветного р-нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой остеобластов образуется р-нитрофенол, имеющий желтое окрашивание. Продукт реакции определялся в области поглощения 405 нм с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200. Активность щелочной фосфатазы оценивали по концентрации р-нитрофенола, освобождающегося в результате реакции в единицу времени на миллиграмм клеточного белка (нМ р-нитрофенола /мин/мг белка). Результаты испытаний представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Активность щелочной фосфатазы клеток MC3T3-E1 на поверхности покрытий Ti/TiCaPCON/Аугментин с различной дозой антибиотика

Образец	Активность ЩФ (нмоль/мг протеин/мин)
F12 (недифференцирующая среда)	83 ± 8
Alpha-MEM (дифференцирующая среда)	331 ± 15
Группа 1	360 ± 18
Группа 2	418 ± 41
Группа 3	408 ± 43
Группа 4	459 ± 29
Группа 5	393 ± 25
Группа 6	338 ± 22
Группа 7	279 ± 24

Полученные результаты свидетельствуют о том, что независимо от нагрузки Аугментина, образцы покрытий способны поддерживать высокий уровень активности ЩФ, что свидетельствует об биоактивности их поверхности.

УТВЕРЖДАЮ


Заместитель директора
ФБГНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Академик РАН, проф.



М.Р.Личиницер

2015 г.

Зав. лабораторией механизмов канцерогенеза
РОНЦ им. Н.Н. Блохина
д.б.н.

 Н.А. Глушанкова

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский технологический университет "МИСиС"

УТВЕРЖДАЮ

Проректор НИТУ «МИСиС»
по науке и инновациям



М.Р. Филонов

2012 г.

Лабораторный регламент

На процесс получения методами селективного лазерного спекания, газодинамического напыления, электроискрового легирования и магнетронного распыления, наноструктурированных биосовместимых покрытий с заданным составом, топографией и пористостью для модификации поверхности костных имплантатов.

Разработан в рамках Государственного контракта № 16.513.11.3092 от «10» мая 2011 г.

ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы»

Шифр темы «2011-1.3-513-043-004»

Срок действия регламента до 31 декабря 2017 г.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский технологический университет "МИСиС"»

УТВЕРЖДАЮ

Проректор НИТУ «МИСиС»
по науке и инновациям

Филонов



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

получения экспериментальных образцов имплантатов с покрытием

Соглашение о предоставлении субсидии №14.578.21.0086 от «24» ноября 2014 г. и дополнительное соглашение №1 от «30 апреля» 2015 г. «Создание имплантируемых трехмерных биоконструкций из титановых сплавов с развитым рельефом поверхности и биоактивным наноструктурным покрытием с антибактериальным эффектом»