

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

На правах рукописи

Пономарев Виктор Андреевич

Разработка биоактивных и бактерицидных покрытий, легированных функциональными элементами (Са, Р, В) и декорированных наночастицами Pt, Fe, Ag и Zn.

05.16.06 – Порошковая металлургия и композиционные материалы

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор

Штанский Д.В.

Москва – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. Аналитический обзор литературы	14
1.1. Материалы имплантатов	14
1.2. Модификация титана	15
1.2.1. Плазменное электролитическое оксидирование	16
1.2.2. Магнетронное распыление	17
1.2.3. Магнетронное распыление СВС мишеней.....	18
1.3. Подходы к созданию бактерицидных поверхностей при разработке материалов	20
1.3.1. Пришивка антибактериальных агентов.....	22
1.3.2. Создание специфической топографии.....	25
1.3.3. Легирование бактерицидными компонентами	27
1.3.4. Декорирование поверхности наноразмерными частицами	29
1.4. Механизмы уничтожения бактерий при использовании наноразмерных поверхностей.....	31
1.4.1. Ингибирование бактериальной адгезии	32
1.4.2. Выделение бактерицидных ионов.....	33
1.4.3. Генерация активных форм кислорода	35
1.4.4. Наличие разницы потенциалов	37
1.5. Постановка задачи	39
ГЛАВА 2. Материалы, оборудование и методика исследований	41
2.1. Исходные материалы подложек	41
2.2. Методики получения покрытий	41
2.2.1. СВС мишень для магнетронного распыления	41
2.2.2. Получение покрытий TiCaPCON	42
2.2.3. Получение покрытий $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-B}$	43
2.2.4. Получение покрытий TiO_2	44
2.2.5. Создание наночастиц Pt, Fe, Ag и Zn на поверхности покрытий	45
2.3. Методики исследований покрытий.....	48
2.3.1. Растровая и просвечивающая электронная микроскопия	48
2.3.2. Рентгеноструктурный фазовый анализ	49
2.3.3. Спектроскопия комбинационного рассеяния и Фурье в инфракрасной области.....	50
2.3.4. Спектроскопия зеркального отражения	51

2.3.5. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия.....	51
2.3.6. Атомно-силовая микроскопия и Кельвин-зондовая силовая микроскопия 52	
2.3.7. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой	53
2.3.8. Методика оценки количества АФК	54
2.3.9. Изучение механических и электрохимических свойств, смачиваемости и сопротивления покрытий.....	55
2.3.10. Исследование биоактивности <i>in vitro</i> в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма	57
ГЛАВА 3. Разработка покрытий в системе TiCaPCON-Ag,Zn и TiCaPCON-Pt,Fe.	59
3.1. Выбор типа частиц металлов	59
3.2. Анализ микроструктуры покрытий TiCaPCON методом ПЭМ	61
3.3. Исследование микроструктуры и состава покрытий методами РЭМ, ЭДС и АСМ после имплантации Ag и Zn	61
3.4. Изучение состава поверхности и НЧ методами ЭДС и РФЭС	63
3.5 Электрохимические испытания покрытий	66
3.6. Исследование кинетики выхода ионов металлов.....	68
3.7. Определение размера, морфологии и распределения наночастиц Pt и Fe методом РЭМ.....	70
3.8. Смачиваемость и коррозионные свойства покрытий в физиологическом растворе	72
3.10. РФЭС анализ поверхности образцов после отжига.....	79
3.11. РФЭС анализ поверхности образцов после выдержки в ФР	89
3.12. Исследование поверхности образцов методами АСМ и КЗСМ.....	97
3.13. Изучение выхода ионов Pt, Fe, Ca и P, в процессе выдержки образцов в ФР	98
3.14. Изучение способности образцов поглощать свет	100
3.15. Исследование генерации АФК.....	101
ГЛАВА 4. Разработка покрытия в системе ПЭО TiO ₂ /Ag,Pt.....	105
4.1. Оптимизация морфологии и элементного состава покрытий	105
4.2. Исследование состава и химии поверхности покрытия.....	107
4.4. Создание НЧ Ag и Pt на поверхности ПЭО TiO ₂ покрытий	112
4.5. Выход ионов.....	114
4.6. Генерация АФК	116
4.7. Исследование влияния НЧ на гидрофильность покрытий.....	118

4.8. Исследование влияния НЧ на биоактивность покрытий <i>in vitro</i>	119
ГЛАВА 5. Разработка покрытий в системе $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-B}$	120
5.1. Исследование влияния бора на состав и структуру покрытий.....	120
5.2. Исследование влияния В на химическое состояние поверхности	126
5.4. Изучение кинетики выхода бора	131
5.5. Создание антибактериального слоя на VO_x	132
ГЛАВА 6. Биологические испытания	135
6.1. Исследование антибактериальных свойств покрытий	135
6.1.1 Методика исследования антибактериальных свойств.....	135
6.1.2. Результаты исследования антибактериальных свойств покрытий TiCaPCON-Ag,Zn и TiCaPCON-Pt,Fe	137
6.1.2.1. Антибактериальные свойства покрытий TiCaPCON-Ag,Zn	137
6.1.2.2. Антибактериальные свойства покрытий TiCaPCON-Pt,Fe	139
6.1.3. Результаты исследования антибактериальных свойств покрытий ПЭО $\text{TiO}_2/\text{Ag,Pt}$	145
6.1.3.1. Антибактериальные свойства. Тест 1.....	145
6.1.3.2. Антибактериальные свойства. Тест 2.....	147
6.1.4. Результаты исследования антибактериальных свойств покрытий $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-B}$	148
6.2. Исследование биосовместимости покрытий	150
6.2.1. Методика исследования биосовместимости покрытий.....	150
6.2.1.1. Площадь и распластывание клеток	150
6.2.1.2. Цитоскелет и фокальные адгезии	151
6.2.1.3. МТТ анализ (жизнеспособность).....	151
6.2.1.4. Пролиферация.....	152
6.2.1.4. Иммуномодуляция на клетки лимфоцитов	153
6.2.2 Результаты исследования биосовместимости покрытий TiCaPCON-Ag,Zn и TiCaPCON-Pt,Fe	154
6.2.2.1. Биосовместимость покрытий TiCaPCON-Ag,Zn	154
6.2.2.1. Биосовместимость покрытий TiCaPCON-Pt,Fe	156
6.2.3. Результаты исследования биосовместимости покрытий ПЭО $\text{TiO}_2/\text{Ag,Pt}$	158
6.2.4. Результаты исследования биосовместимости покрытий $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-B}$	161
6.3. Исследование биоактивности покрытий.....	163

6.3.1. Методика исследования биоактивности покрытий	163
6.2.2 Результаты исследования биоактивности покрытий TiCaPCON-Ag,Zn ..	164
6.2.3. Результаты исследования биоактивности покрытий ПЭО TiO ₂ /Ag,Pt	164
6.2.4. Результаты исследования биоактивности покрытий VO _x /TiCaPCON-B.	167
ВЫВОДЫ	169
Список использованных источников	174

ВВЕДЕНИЕ

Установка имплантата связана с риском возникновения бактериальной инфекции, которая может приводить к осложнениям и отторжению имплантата. Актуальной проблемой является возникновение высокоадгезивной биопленки, с которой не справляется традиционная терапия антибиотиками. Разработка антибактериальных материалов, оказывающих локальное бактерицидное воздействие, является рациональным способом решения этой проблемы.

Основными способами обеспечения антибактериальной активности материала является иммобилизация на его поверхности антибиотиков или функционализация бактерицидными металлами. Однако, антибиотики могут быть неэффективны в случае множественной лекарственной устойчивости бактерий. Недостатки второго подхода связаны с токсичностью ряда бактерицидных металлов при высокой концентрации в отношении клеток организма. Анализ современного состояния исследований показывает, что токсичность бактерицидного металла, во многом, зависит от концентрации его ионов, тогда как антибактериальные свойства определяются множеством взаимозависимых факторов. Благодаря этим факторам антибактериальную активность можно обеспечить при низкой концентрации бактерицидных ионов. Альтернативным способом борьбы с инфекцией является использование материалов, образующих активные формы кислорода (АФК), способные подавлять инфекцию. Количество АФК зависит от нескольких параметров (природа материала, эффективная площадь поверхности, состава материала, состояние поверхности и способ предварительного облучения), роль которых изучена недостаточно. Еще одним новым и перспективным подходом к борьбе с бактериями является использование микрогальванических пар, однако, существует мало литературных данных об их эффективности.

Таким образом, актуальность работы определяется необходимостью разработки новых покрытий с низким выходом ионов металлов и высокими бактерицидными свойствами за счет синергетического действия нескольких

антибактериальных механизмов и повышения биосовместимости исходных покрытий. Основами для создания новых материалов были выбраны: покрытие TiCaPCON с высоким комплексом химических, механических, трибологических и биологических свойств, необходимым для имплантатов, работающих под нагрузкой и рекомендованное для использования на территории РФ и широко используемое в имплантологии покрытие TiO₂. Биосовместимость улучшали за счет введения в состав покрытия TiO₂ кальция и фосфора, а в покрытие TiCaPCON бора. Антибактериальные свойства обеспечивали за счет последовательного введения в состав покрытия TiCaPCON металлов Ag и Zn, или Pt и Fe и введение в состав покрытия TiO₂ Ag и Pt. Вторым способом обеспечения антибактериальной активности TiCaPCON покрытий было нанесение на их поверхность растворимого антибактериального слоя B₂O₃.

Отличительной особенностью разработанных покрытий является комбинация на их поверхности нескольких типов металлических наночастиц (НЧ), что позволило изменить кинетику выхода бактерицидных компонентов, увеличить генерацию АФК и создать разность потенциалов на поверхности одного материала. Благодаря этим подходам удалось достичь антибактериального эффекта при сохранении высокого уровня биосовместимости.

Актуальность работы

Актуальность работы заключается в необходимости разработки новых типов покрытий и методов их получения для модификации поверхности титановых имплантатов с целью придания материалам бактерицидных характеристик и улучшения биоактивности без ущерба для биосовместимости. Это позволит снизить риск возникновения инфекции на поверхности имплантата и улучшить его остеоинтеграцию с костной тканью, что, в конечном счете, приведет к повышению безопасности металлических имплантатов и увеличению срока их эксплуатации. Актуальность работы подтверждена ее реализацией в рамках нескольких проектов:

1. Программа повышения конкурентоспособности НИТУ «МИСиС» среди ведущих мировых научно-образовательных центров исследований для проведения научного исследования по направлению «Разработка перспективных функциональных неорганических материалов и покрытий с участием ведущих учёных». Грант № К2-2020–004.

2. Грант Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) №19–38–90249 от 23.08.2019 в рамках конкурсе «на лучшие проекты фундаментальных научных исследований, выполняемые молодыми учеными, обучающимися в аспирантуре» по теме: "Создание биоактивного и бактерицидного пористого покрытия на основе TiO_2 , легированного биоактивными компонентами и декорированного бактерицидными металлическим наночастицами".

3. Грант Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) №19–58–45016 от 07.10.2019 в рамках конкурса «на лучшие научные проекты фундаментальных исследований, проводимый совместно РФФИ и Департаментом науки и технологии правительства Индии» по теме: "Разработка биоактивных и бактерицидных покрытий с улучшенной остеоинтеграцией и способностью подавлять инфекцию".

Цель диссертационной работы

Разработка новых составов покрытий, обеспечивающих антибактериальный и противогрибковый эффект за счет выхода бактерицидных ионов, генерации активных форм кислорода, микрогальванического эффекта, или их комбинации, с улучшенными биоактивными характеристиками за счет легирования функциональными элементами.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

- комбинацией методов магнетронного распыления, ионной имплантации и последующего низкотемпературного отжига получить покрытия $TiCaPCON$, декорированные наночастицами Ag, Zn, Pt, Fe;

- методом плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) и последующей ионной имплантации получить покрытия на основе TiO_2 легированные Ca и P, и декорированные наночастицами Ag и Pt;

- методами магнетронного распыления и последующего ионного распыления получить однослойные (TiCaPCON-B) и двухслойные ($\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}$) покрытия;

- выявить вклад наночастиц металлов (Ag, Zn, Pt, Fe и их комбинации) на поверхности покрытия TiCaPCON в общую антибактериальную активность материала в отношении различных бактериальных штаммов с учетом следующих факторов: элементный и фазовый состав поверхности, смачиваемость, выход ионов, генерация АФК, наличие микрогальванических пар на поверхности, окислительные и катодные/анодные процессы, влияющие на скорость растворения частиц;

- изучить влияние различных форм облучения на генерацию АФК покрытиями металл/ TiCaPCON и металл/ TiO_2 ;

- изучить влияние биполярного импульсного режима ПЭО-обработки титана на структуру и морфологию TiO_2 -покрытий, легированных Ca и P, а также их биосовместимость в модельном растворе, имитирующем внутреннюю среду организма (simulated body fluid – SBF);

- изучить влияние бора, как в составе покрытия на основе TiCaPCON , так и в составе двухслойных покрытий $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}$, на биоактивные и бактерицидные свойства покрытий;

- изучить структуру, состав, морфологию и электрохимические свойства покрытий;

- изготовить экспериментальные образцы покрытий и передать их на биологические испытания для оценки биоактивности, биосовместимости, токсичности и бактерицидной активности покрытий.

Научная новизна

1. Показано, что сильный бактерицидный эффект покрытий TiCaPCON-Ag,Zn в отношении бактерий кишечной палочки и золотистого стафилококка при сохранении цитосовместимости достигается при очень низкой концентрации ионов Ag ($0,11 \text{ млрд}^{-1}$) и Zn (15 млрд^{-1}). Медленный выход ионов Ag и Zn связан с тем, что наночастицы на поверхности находятся в окисленном состоянии.

2. Установлена зависимость скорости выхода металлических ионов с поверхности покрытий TiCaPCON, имплантированных элементами Zn, Ag, Pt и Fe, или их комбинацией, от типа и сочетания наночастиц на поверхности, которые выполняют роль активных анодов или катодов, ускоряя или замедляя выход ионов.

3. Методом Кельвин-зондовой силовой микроскопии показано что между наночастицами (Pt,Fe) и покрытием TiCaPCON в физиологическом растворе образуется разность потенциалов. Исключив возможный вклад бактерицидных ионов и активных форм кислорода, впервые показано, что бактерии могут погибать за счет непосредственного микрогальванического взаимодействия с поверхностью.

4. Методом плазменного электролитического оксидирования получены новые составы цитосовместимых, биоактивных и бактерицидных покрытий на основе TiO_2 , легированные Ca, P и декорированные наночастицами Ag и Pt. Показано, что способность покрытий к минерализации в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма, связана с быстрым выходом ионов Ca и P. Отличные бактерицидные свойства покрытий Ag/ TiO_2 объясняются синергетическим эффектом от воздействия ионов серебра и активных форм кислорода на клетки.

5. Получены новые составы борсодержащих покрытий с высокой цитосовместимостью и бактерицидной активностью в отношении бактерий кишечной палочки, которые обеспечиваются за счет введения бора в состав покрытия и формирования слоя оксида бора на поверхности.

Практическая значимость

1. Разработано покрытие $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}-\text{B}$ обладающее антибактериальной активностью и предназначенное для нанесения на поверхность титановых имплантатов, что подтверждено патентом РФ №2697720 от 24.01.2019 «Многокомпонентный двухслойный биоактивный материал с контролируемым антибактериальным эффектом».

2. Разработана технология нанесения двухслойных покрытий $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}-\text{B}$ и зарегистрирована технологическая инструкция на процесс нанесения многофункциональных наноструктурных двухслойных покрытий в системе Ti-Ca-P-C-O-N-B/V-O (ТИ 52-11301236-2021)

2. В Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» проведены биологические испытания титановых имплантатов с покрытием $\text{TiCaPCON}-\text{Ag,Zn}$ и титановых имплантатов с покрытием $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}-\text{B}$. Показано, что имплантаты с покрытием $\text{TiCaPCON}-\text{Ag,Zn}$ обладают 100% антибактериальным эффектом в отношении *E. coli* K-261 и *S. aureus* ATCC 25923, а имплантаты с покрытием $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}-\text{B}$ обладают 100% антибактериальным эффектом в отношении *E. coli* K-261.

3. В Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» проведены биологические испытания титановых имплантатов с покрытием $\text{TiCaPCON}-\text{Ag,Zn}$ и титановых имплантатов с покрытием $\text{TiCaPCON}-11\% \text{ B}$. Показано, что покрытия обладают высоким уровнем биосовместимости, а покрытия обладают высоким уровнем биосовместимости и биоактивности.

Положения выносимые на защиту

1. Установленные закономерности выхода ионов металлов с поверхности покрытий TiCaPCON , декорированных наночастицами Ag, Zn, Pt и Fe;

2. Установленная зависимость количества генерируемых активных форм кислорода от типа наночастиц и способа облучения поверхности покрытий TiCaPCON-(Pt,Fe);

3. Зависимость антибактериальной активности от типа и концентрации бактерицидных ионов.

4. Закономерности влияния бора на структуру, состав, электрохимические и биологические свойства покрытий TiCaPCON;

Апробация работы

Основные положения и результаты работы докладывались на следующих конференциях:

Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2018», г. Москва, 9-13 апреля 2018; XV Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физикохимия и технология неорганических материалов», г. Москва, 16-19 октября 2018; VII международная конференция с элементами научной школы для молодежи "Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества", Суздаль, 1-5 октября 2018; форум «Наука будущего — наука молодых», Сочи, 2019; XV международный симпозиум самораспространяющегося высокотемпературного синтеза, 16-20 сентября 2019, Москва, Россия; VII Всероссийская конференция по наноматериалам «НАНО2020», Москва, 18 мая 2020; Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2020». Москва, 2020; III Всероссийская конференция «Методы исследования состава и структуры функциональных материалов (МИССФМ-3), 1-4 сентября 2020; VII международная конференция с элементами научной школы для молодежи "Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества", Суздаль, 5-9 октября 2020; XI Международная научная конференция «Современные методы в теоретической и экспериментальной электрохимии», Плес, Россия, 7-11 сентября 2020; 12-й международный симпозиум «Порошковая металлургия: инженерия поверхности, новые

порошковые композиционные материалы, сварка», Минск, Беларусь, 7-9 апреля 2021.

Публикации по теме диссертации:

По материалам диссертации имеются 17 публикаций, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в Scopus и WoS, 12 тезисов докладов в сборниках трудов российских и международных конференций, 1 патент РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, общих выводов, списка использованных источников и 3 приложений. Диссертация имеет объем 209 страниц, включая 25 таблицы, 68 рисунков, список использованных источников из 291 наименования.

ГЛАВА 1. Аналитический обзор литературы

Имплантация в медицине означает установку в организм человека или животного имплантатов, которые предназначены для замены утраченных или поврежденных частей тела (протезы). Протезы делятся на закрепляемые снаружи (экзопротезы и эктопротезы) и вводимые в организм (эндопротезы). Наиболее распространенными эндопротезами являются дентальные имплантаты, которые устанавливаются в количестве до 18 миллионов единиц в год (данные 2018 года), а также протезы тазобедренного сустава, позвоночника и различные фиксаторы для челюстно-лицевой хирургии и других частей тела (далее по тексту все они объединены в термин «имплантаты»). К материалам имплантатов применяется больше требований, чем к материалам внешних протезов, так как они взаимодействуют со внутренней средой организма. Вмешательство в эту изолированную систему может вызвать ее реакцию, поэтому первым требованием для материалов является биоинертность. Биоинертность материала является одним из видов биосовместимости и позволяет оградить материал от взаимодействия с окружающей средой организма, что минимизирует вероятность его реакции.

1.1. Материалы имплантатов

Материалы для имплантатов в первую очередь делятся по уровню взаимодействия с организмом на биоинертные, биоактивные и биорезорбируемые. Если основная цель первых – исключить взаимодействие с организмом, то два последних типа нацелены на активную интеграцию в окружающие ткани. Наиболее распространенными биосовместимыми биоинертными материалами являются полиэтилен, диоксид циркония, оксид алюминия, нержавеющая сталь и титан [1]. Такое разнообразие природы материалов (керамика, полимеры и металлы) в первую очередь определяется условиями эксплуатации и окружающими имплантат тканями. Условия эксплуатации диктуют требования к механическим и химическим

характеристикам материала, что и вынуждает использовать конкретный класс материалов.

Металлы являются наиболее распространенным типом материалов для имплантатов (около 50% рынка имплантатов) после керамики (около 25%). Эти материалы применяют для изготовления имплантатов, работающих под нагрузкой, которые используют для замены поврежденных участков кости, или устанавливают в местах контакта с ней. Постоянное взаимодействие материала с костной тканью накладывает, помимо требований биоинертности, отсутствия токсической или аллергической реакции, необходимость, так называемой, механической биосовместимости – подбора механическим свойствам кости [2]. По этому параметру среди металлов наибольшее распространение получил титан (Ti) и его сплавы из-за своих оптимальных механических характеристик [3]. Ti обладает высокой химической стабильностью, коррозионной стойкостью, подходящим модулем Юнга, пределом прочности при растяжении, пластичностью, усталостной долговечностью и износостойкостью [4]. Обширное распространение титана в качестве материала имплантатов и его оптимальные свойства являются причиной его выбора в качестве объекта модификации в данной работе.

1.2. Модификация титана

Следующим уровнем развития биосовместимости материала является переход от биоинертности к биоактивности, которой титан не обладает. Кроме того, коррозия или эрозия титанового имплантата в результате нарушения пассивного слоя могут привести к интенсивному выделению ионов и частиц металла в окружающие ткани и, как следствие, отказу имплантата [5–7]. Известна также проблема гиперчувствительности к титану, которой обладают около 15% людей и которая приводит к возникновению аллергических реакций [8,9]. Эффективным путем решения всех трех перечисленных проблем является нанесение покрытий. Покрытия позволяют сохранить все преимущества

объемного материала, оградить ткани организма от контакта с титаном и стимулировать процессы взаимодействия между имплантатом и костной тканью, удовлетворяя требования биоактивности.

1.2.1. Плазменное электролитическое оксидирование

Титан известен своей способностью вступать во взаимодействие с костной тканью благодаря оксиду на поверхности, однако, оксид присутствует только в виде тонкой пленки [10]. Получить толстый слой оксида можно методом микродугового окисления или плазменного электролитического оксидирования, который осуществляется при напряжениях, превышающих потенциал пробоя барьерного слоя [11]. Главным критерием биоактивного материала является образование плотного соединения с костной тканью – остеоинтеграция [12]. Первым условием, которое определяет биоактивность материала является обеспечения химического подобия поверхности материала составу костной ткани. Основными элементами биохимических реакций костной системы организма являются Са, Р, В, поэтому для придания биоактивных свойств важно обеспечить их наличие в составе покрытия. Возможность изменения состава электролита является одним из преимуществ метода ПЭО [13], которое позволяет модифицировать слой TiO_2 требуемыми элементами [16-17]. Вторым условием биоактивности материала является наличие морфологии поверхности, которая максимально приближена к строению кости [12]. Преимуществом ПЭО является возможность создания слоя оксида титана необходимой толщины и микропор, которые улучшает адгезию, распространение, дифференцировку клеток костной ткани и повышают остеогенную способность материала [14] [15]. Изменение состава электролита и параметров процесса позволяет регулировать плотность покрытия, размер и распределение пор в и достигать желаемой структуры и свойств покрытия [18]. Морфология и состав покрытия зависят от напряжения положительного импульса [19], длительности обработки [20], плотности тока [21] и величины рабочего цикла [22]. Тщательный подбор

параметров процесса способствует получению оптимальной структуры, элементного и фазового состава, что обеспечивает высокую биоактивность материала [23]. Определенные параметры процесса даже позволяют сформировать на поверхности фазы подобные гидроксипатиту (ГА) [24]. Важными параметрами ПЭО покрытий являются: соотношение фазовых составляющих в покрытии (рутил и анатаз) [25], а также форма и размер пор [22]. Было показано, что при наличии наноразмерных пор рост апатита происходит уже после 7 дней выдержки, тогда как в на микропорах он образуется только после 28 дней [26]. Известно, что оптимальным фазовым составом является соотношение анатаза к рутиллу не менее 77:23, которое благоприятствует эффективной остеointegrации [25]. Открытая пористость - важное преимущество ПЭО-покрытий. Микропоры увеличивают степень механической остеointegrации [27]. Перечисленные достоинства метода ПЭО привело к тому, что он активно применяется при производстве покрытий на титане. Широкое применение метода и возможности модификации покрытий стали причиной выбора ПЭО TiO_2 как основы для создания бактерицидных поверхностей.

1.2.2. Магнетронное распыление

Нанесение на поверхность титана керамических покрытий на основе известных биоактивных СаР-содержащих материалов, например, гидроксипатита (ГАП) или фосфата кальция (ФК), является другим перспективным путем обеспечения интеграции в кость и защиты организма от контакта с металлом [28]. Однако, сохраняется существенный недостаток подобных материалов – низкие механические свойства. Кроме того, различная природа материала подложки и покрытия негативно сказывается на адгезии этих покрытий, что может быть привести к их отслоению в процессе эксплуатации [29]. Адгезию и механические свойства покрытия повышают за счет введения в состав СаР-содержащих покрытий титана (Ti), который позволяет снизить разницу в модулях упругости и термического расширения между материалом

покрытия и подложки [30]. Износостойкость и коррозионную стойкость покрытий повышают добавлением к С и N, которые образуют с Ti карбидные и нитридные фазы [31]. Необходимость наличия большого количества компонентов в покрытии ограничивает число методов, которыми возможно их получить. Эффективным способом нанесения подобных покрытий являются плазменные методы физического осаждения из газовой фазы (PVD), которые обеспечивают получение беспористого и высокоадгезионного слоя на поверхности подложки [32]. Магнетронное распыление является одним из современных методов нанесения покрытий. Основным его преимуществом является точный перенос состава мишени на подложку независимо от природы элементов [33]. Количество переносимых элементов ограничено только составом материала мишени и реакционного газа.

1.2.3. Магнетронное распыление СВС мишеней

Современные методы получения мишеней: литье или классическая порошковая металлургия имеют технологические ограничения на возможный состав мишени. Литье не позволяет ввести в состав материала мишени неметаллические и легкоиспаряемые элементы, а также затрудняет равномерное распределение нескольких элементов по всему объему расплава, поэтому часто применяется при создании только однокомпонентных металлических мишеней [34]. Классическая порошковая металлургия позволяет получить мишени с несколькими элементами в составе, но ограничена возможностями прессования и спекания конкретной порошковой смеси [35]. Расширить количество вводимых в покрытие элементов возможно при одновременном применении нескольких мишеней, однако, это усложняет и удорожает технологический процесс. Технология самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) является эффективным путем решения проблемы создания многокомпонентных мишеней и позволяет расширить возможности технологии магнетронного распыления. СВС технология позволяет получить плотные и однородные

композиционные материалы с электрическими и термическими характеристиками оптимальными для использования в методах PVD [36]. Магнетронное распыление СВС мишеней позволяет осуществить перенос на подложку большого количества элементов, как металлической, так и неметаллической природы [37]. Существуют мишени на основе TiC различного состава, которые позволяют наносить покрытия, значительно увеличивающие механические и трибологические свойства титанового сплава [38]. Состав этих мишеней был улучшен добавлением различных CaP-содержащих материалов (ГА, ФК). Это способствовало повышению пролиферации остеобластов на поверхности полученных с помощью мишеней TiCN покрытий [39]. Применение модифицированных мишеней позволило получить TiCaPCON покрытия, которые обладают, высокой твердостью, пределом усталостной прочности, адгезионной прочностью и модулем Юнга, приближенным к костной ткани [40]. Было продемонстрировано, что поверхность этих пленок является биоактивной *in vivo* и *in vitro* и индуцирует образование слоя апатита в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма (Simulated body fluid – SBF), что в сочетании с высокими механическими характеристиками, износостойкостью, коррозионной стойкостью и гидрофильностью делает их перспективными кандидатами для нанесения на титановые имплантаты [41]. Эти достоинства покрытий стали причиной их выбора, как основы для дальнейшей модификации, с целью создания бактерицидных поверхностей.

Таким образом, в настоящей работе уделялось внимание приданию антибактериальных и биоактивных свойств покрытиям на основе TiO₂, полученным ПЭО и покрытиям на основе TiCaPCON, полученным методом магнетронного распыления композиционных СВС мишеней.

1.3. Подходы к созданию бактерицидных поверхностей при разработке материалов

Успех имплантации зависит от множества факторов, основная часть которых поддается прогнозированию и контролю в отличие от проблемы бактериальной угрозы, которая может стать непредвиденным осложнением. Развитие имплантат-ассоциированной инфекции (ИАИ) часто требует извлечения установленного имплантата [42]. По данным некоторых исследований риск ИАИ составляет 1-2% и 2-52% для открытого перелома, а также до 2%, до 1,5% и до 9% при замене коленного, тазобедренного и голеностопного суставов, соответственно [43,44]. Бактерии могут попадать в преимплантационную область в результате внешнего или внутреннего инфицирования и приводить к воспалению [45,46]. Эффективной профилактикой бактериального заражения по первому пути являются дезинфекция и стерилизация медицинских изделий и помещения, а по второму – антисептическая обработка области имплантации и удаление зараженных участков ткани. Вероятность заражения при подобных мероприятиях лимитируется только условиями проведения операции и квалификацией врача, поэтому при текущем уровне медицины минимальна. Однако, существует шанс бактериального заражения уже после установки имплантата и связан он, как правило, с физиологическими особенностями и качеством жизни пациента: низкий уровень иммунитета, привычки курения (увеличивает шанс развития ИАИ в 5 раз), несоблюдение гигиены полости рта и другие [47]. Эти факторы являются причиной того, что опасность бактериального заражения и последующих осложнений все еще остается актуальной проблемой. Поверхность биоактивных материалов особенно сильно подвержена бактериальному заражению из-за своей привлекательности для бактерий [48]. Бактериальное заражение в области имплантации приводит к возникновению воспалительного процесса, который может затрагивать не только мягкие ткани, но и вызывать воспаление костной ткани с развитием переимплантата [49]. Основными видами

бактерий на поверхности имплантата являются *S. aureus* и *S. epidermidis* (49% случаев), *E. Faecalis* (около 6%), *Acinetobacter spp.* и *P. Aeruginosa* (около 11%) и *E. cloacae*, *K. Pneumoniae* и *E. Coli* (около 4%).

Наибольшую опасность представляют не единичные бактерии, а высокоадгезивная биопленка, которую они образуют на поверхности при объединении в колонии [50]. Биопленка представляет собой комбинацию бактерий одного или нескольких видов (5–35%) и особой среды – экзополимерного матрикса, которая прикрепляется к поверхности материала и увеличивает физическую и химическую устойчивость бактерий в 100–1000 раз [51,52]. Биопленка может стать причиной развития острого и хронического воспаления [53]. Основным способом борьбы с внутренней инфекцией является лечение антибиотиками, которые могут назначать системно или вводить инвазивно в область имплантации. Однако, терапия антибиотиками является нежелательной по нескольким причинам [54]. (а) Многие бактерии имеют резистивность к большинству антибиотиков, а биопленка дополнительно усиливает ее [55,56]. (б) Антибиотики приводят к сопутствующему уничтожению полезной микрофлоры организма. (в) Состояние здоровья отдельных больных может не позволять применение сильнодействующих антибиотиков в эффективной для гибели бактерий дозе. Требуется найти иные способы подавить рост бактерий и предотвратить образование биопленки [57]. Рациональным решением является создание антибактериальной поверхности имплантатов, которая будет противодействовать как отдельным бактериям, так и ингибировать образование биопленки непосредственно в месте установки.

Антибактериальные поверхности классифицируются на антибиотические, препятствующие прикреплению росту и развитию бактерий, бактерицидные, вызывающие гибель клеток при контакте, и бактериальные, высвобождающие адсорбированные бактерии [58,59]. Идеальная антибактериальная поверхность должна комбинировать в себе все три качества: предотвращать прикрепление бактерий, уничтожать бактерии, которые смогли адсорбироваться, и удалять

мертвые клетки [60]. Существует несколько основных стратегий создания антибактериальных поверхностей:

(а) легирование бактерицидными ионами (Ag, Zn и др.) [61,62];

(б) изготовление гетерогенных поверхностей, украшенных бактерицидными металлическими НЧ [63-65];

(в) прививка различных антибиотиков, антибактериальных пептидов (АМП), четвертичных аммониевых и фосфониевых соединений, антикоагулянтов и радикалов NO на поверхности, [65-67];

(г) разработка специфической топографии поверхности и шероховатости. [68-70].

1.3.1. Пришивка антибактериальных агентов

Необходимость борьбы с воспалительным процессом, вызванным бактериальным заражением, вынуждает искать пути доставки лекарственного препарата к очагу воспаления. Этого можно достичь за счет иммобилизации терапевтического агента на поверхности материала, что является перспективной стратегией создания антибактериальных поверхностей [71]. Существует три основных пути иммобилизации антибактериальных агентов на поверхности материалов: электростатическое [72], ковалентное [73] и механическое связывание [74]. Способ иммобилизации определяется состоянием поверхности материала: наличием необходимых активных групп, химических соединений, неоднородностей рельефа или пор.

Антибактериальные свойства поверхности обеспечивают за счет иммобилизации соединений различной природы: антимикробные пептиды (АМП) [73-79], антибиотики (гентамицин [80], ванкомицин [81] и др.[82-83]), антиадгезивные молекулы [84], галогены (фторид, [85] йод [86]) и другие соединения [87,88]. Выбор конкретного терапевтического агента опирается на способ введения, безопасность, эффективность и конечную стоимость. Наиболее распространенным клиническим антикоагулянтом является сульфатированный

полисахарид - Гепарин [89], который часто применяется для создания антибактериальных покрытий [90]. Гентамицин один из самых распространенных антибиотиков, который показывает эффективность против широкого спектра бактерий и часто используется для создания антибактериальных поверхностей [80]. Существует большое количество работ, где антибиотики были иммобилизованы на поверхности имплантата, но успех этой стратегии зависит от способности антибиотика сохранять функциональность после прикрепления [84]. Проблемой является обеспечение постепенного выхода антибиотика с поверхности покрытий в течение всего времени интеграции имплантата с костной тканью.

Основными преимуществами АМП перед антибиотиками является оригинальная амфипатическая природа и иммуномодулирующая способность [91]. Применяется большое количество разновидностей пептидов от искусственно синтезированных до экстрагированных из животных и человеческой крови. Литературные данные показывают, что маганин и низин были успешно иммобилизованы на поверхности материала с помощью ковалентных связей, что позволило уменьшить адгезию бактерий и ингибировать образование биопленки [74]. Однако, не все поверхности предоставляют возможность иммобилизации пептидов ввиду отсутствия необходимых связей на поверхности. Предварительная силанизация является наиболее частым способом функционализации поверхности требуемыми соединениями для последующего прикрепления пептидов [74,76]. Существуют также исследования, где предварительная обработка была использована для последующего формирования электростатической связи между пептидом и подложкой [72]. Использование промежуточных соединений, которые образуют связи как с подложкой так и с пептидом является эффективным способом иммобилизации пептида на поверхности [78]. Некоторые исследователи пытались комбинировать несколько способов закрепления пептида на поверхности материала: силанизация, пескоструйная обработка и кислотное травление [79]. Пептиды, как и другие антибактериальные агенты, также

успешно закрепляются на поверхности при наличии углублений [74]. Недостатком этого метода является быстрое высвобождение агента с поверхности и, следовательно, короткий антибактериальный эффект [92].

Скорость высвобождения антибиотиков и других агентов снижают за счет нанесения биоразлагаемого полимера. Это позволяет пролонгировать антибактериальную активность и свести к минимуму локальную и общую токсичность, возникающую от переизбытка антимикробного соединения [52,93]. Показано, что покрытие трикальцийфосфатных (ТКФ) материалов ПЭГ-подобными пленками позволяет снизить скорость высвобождения антибиотика ампициллина в 10 раз по сравнению с поверхностью необработанной полимерами [94]. Применение полимеров позволяет не просто снизить скорость высвобождения агента, но и управлять ей [95,96]. Например, скорость разложения покрытия из биоразлагаемого полиметакрилового ангидрида (ПМАН), нагруженного рифампицином [95], показала чувствительность к pH (в 15 раз быстрее при pH 10 по сравнению с pH 1). Третьим преимуществом применения полимеров является возможность функционализации их группами – COOH или -NH₂ для последующей иммобилизации различных терапевтических агентов: антибиотики [82,83], антиадгезивные молекулы [97,98], АМП [84] и другие бактерициды.

Известны исследования где молекулы NO применяли для создания антибактериальных покрытий [100-102]. Существуют данные о том, что низкая концентрация NO (10^{-12} - 10^{-9} М) способна подавлять развитие биопленки и разрушать существующую путем перевода бактерии в дисперсное состояние [103]. Существенным недостатком NO является его высокая реакционная способность (период полураспада 0,1–5 с), что приводит к нестабильности его молекул. Решением этой проблемы является использование нитроксильных радикалов в которых радикальные группы стабилизированы за счет включения NO в гетероцикл [104]. Эффективность нитроксильных радикалов зависит от цикла и типа замещающих радикалов [105]. Эффективная антибактериальная активность NO составляет не менее 10^{-3} М [106].

Заключение

Подход к высвобождению антибиотиков имеет определенные ограничения, такие как краткосрочный антибактериальный эффект, множественная лекарственная устойчивость и, возможно, неблагоприятные побочные эффекты. Эти недостатки устраняют, используя такие агенты как пептиды и нитроксильные радикалы, которые также проявляются бактерицидные свойства. Основной проблемой использования материалов с этими агентами является сложный технологический цикл их получения и зависимость активности агента от его химического состояния на поверхности и параметров среды.

1.3.2. Создание специфической топографии

Взаимодействие материала с поверхностью бактерий определяется двумя основными параметрами: химией поверхности и топографией [107]. Оба этих параметра взаимосвязаны, поскольку топографические особенности вызывают локальные изменения химического состава поверхности, тем самым влияя на взаимодействие клеток и их бактериологическую популяцию. Множество исследований уделяет внимание вопросу влияние морфологии и топографии поверхности материала на цитотоксичность и скорость формирования связей между имплантатом и костной тканью [108-110]. Однако, бактерицидная активность поверхности также сильно зависит от параметров рельефа поверхности имплантата [111,112]. Показано, что противодействовать бактериальной инфекции можно путем предотвращения адгезии и колонизации бактерий с последующим образование биопленки [113,114]. Антиадгезионные поверхности с определенной шероховатостью являются эффективным препятствием для колонизации поверхности бактериями [115]. Бактерии, которым не удастся прикрепиться к поверхности, не могут образовать биопленку и легко устраняются иммунной системой организма [116]. Решающее значение имеют параметры шероховатости, так как определенные макро- и

микроструктурированные поверхности могут, наоборот, способствовать взаимодействию бактерий с поверхностью [117,118]. Микроразмерные бактерии успешно закрепляются и формируют биопленку на неровностях микрорельефа, который по этой причине считается нежелательным для обеспечения антибактериальной защиты [119]. Результаты исследований по влиянию наноразмерной шероховатости на взаимодействие с бактериями в основном указывают либо на предотвращение бактериальной инфекции [120], либо на отсутствие какого-либо значимого эффекта [122]. Однако, есть данные, что наличие наноразмерной шероховатости может быть благоприятно для образования плотного белкового слоя на поверхности, который препятствует дальнейшей адгезии бактерий [121]. Снижение вероятности адгезии не единственный вид взаимодействия нанорельефа с бактериями. Существуют данные об антибактериальной активности материала за счет нарушения целостности мембраны при контакте с нанорельефом поверхности, что приводит к механической инактивации и гибели бактерий [122,123]. Гибель клеток, как предполагается, возникает из-за адсорбции мембраны на неровности рельефа, что вызывает ее сильное растяжение и приводит к разрыву из-за этих внешних механических сил, превышающих верхнюю границу эластичности мембраны [124]. Топография поверхности может также косвенно влиять на антибактериальные свойства материала, например, при легировании поверхности бактерицидными ионами. Рельеф поверхности оказывает влияние на скорость высвобождения ионов бактерицидных элементов, а значит и на общий антибактериальный эффект [125].

Заключение

Антиадгезионные поверхности при определенных условиях показывают антибиотические свойства, однако, они выражены слабо в сравнении с другими методами обеспечения антибактериальной активности. Стратегия уничтожения бактерий за счет механического взаимодействия с поверхностью является новой и изучена в недостаточной мере. Однако, создание контролируемой топографии поверхности в комбинации с другими антибактериальными механизмами может

быть перспективным путем обеспечения универсальных бактерицидных свойств материала.

1.3.3. Легирование бактерицидными компонентами

Существуют химические элементы, демонстрирующие выраженный антибактериальный эффект против бактерий и грибов различной природы. Уровень их бактерицидной активности зависит от конкретного штамма, а ее природа изучена слабо. Однако, легирование приповерхностных слоев материала этими элементами является распространенным путем создания антибактериальных поверхностей. Например, такие элементы как серебро (Ag), цинк (Zn), цирконий (Zr), медь (Cu), золото (Au), фтор (F), и бор (B) часто вводят в состав различных материалов для борьбы с инфекцией [126-128]. Легирование осуществляют множеством способов: имплантация ионов, диффузия, золь-гель, литье. Цель легирования – обеспечить выход ионов этих элементов из материала в окружающее пространство, так как именно их считают основной причиной антибактериальной активности [129]. Например, покрытия TiO_2 , легированные B, Ag, Zr, Zn, Cu, F и I, показали повышенную антибактериальную активность в отношении различных патогенных бактерий [130-136]. Антибактериальные свойства ГА также повышали включая в его состав различные бактерицидные ионы, такие как Cu^{2+} , Zn^{2+} , и Ag^+ [137]. Бактерицидным металлом также полностью покрывают область материала, где требуется антибактериальная активность [138].

Среди перечисленных бактерицидных элементов Ag является самым известным и мощным из-за широкого спектра его антибактериальных свойств и слабой вероятности у штаммов развить устойчивость [132,139,140]. Известен бактерицидный эффект Ag при различной концентрации против *E.coli* и *S.aureus* [141]. Есть данные о том, что именно ионы Ag проявляют высокую эффективность против различных видов бактерий и грибов [142], поэтому важным параметром является скорость высвобождения ионов. Скорость высвобождения очень сильно зависит от параметров поверхности (топография,

шероховатость) [143]. Тогда как прямой зависимости между количеством высвобождаемых ионов и концентрацией Ag в материале не выявлено [144]. Бактерицидное действие ионов серебра связывают со снижением проницаемости мембраны, что нарушает дыхательные процессы бактерий, и изменением процессов ионного обмена в клетке, что приводит к образованию свободных радикалов и гибели клеток [141].

Известны материалы, где в качестве бактерицидного элемента используется бор (В). Показано, что легирование наночастиц TiO_2 бором повышает их антибактериальную активность при облучении видимым светом [145]. Образование гидроксильных групп на поверхности покрытий из TiO_2 , легированных В, приводило к разрыву мембраны бактериальной клетки [146]. Предполагалось, что бактерицидная активность этих материалов обусловлена реакцией свободного В и кислорода с образованием B_2O_3 [147]. Образование борного ангидрида (B_2O_3), борной кислоты (H_3BO_3) и тетрагидрата динатбората ($Na_2B_8O_{13} \cdot 4H_2O$), которые обладают противовоспалительными, антисептическими и противоопухолевыми свойствами, часто приводится как основная причина антибактериальной активности материалов с бором [148-150]. Другим возможным механизмом антибактериальных свойств В является образование В-содержащих комплексов с гликопротеинами и гликолипидами, которые влияют на целостность мембраны бактериальной клетки и ее функцию [150]. Существуют также данные, что соединения бора ингибируют образование биопленок с высокой степенью адгезии, подавляя самоорганизацию бактерий [128]. Таким образом, существует три возможных фактора антибактериальной активности В: соединения на основе бора, бор-содержащие комплексы и ионы.

Заключение

Ингибирование образования бактериальной биопленки до полной остеоинтеграции имплантата требует стабильных антибактериальных свойств материала в течение продолжительного времени. Однако, концентрация бактерицидного компонента в приповерхностном слое быстро снижается, что приводит к ухудшению антибактериальных характеристик материала. Кроме

того, иногда выход ионов бактерицидных элементов при обычном легировании достаточно низкий для значительного антибактериального эффекта. Это вынуждает искать пути повышения как концентрации высвобождаемых ионов, так и обеспечения стабильности их выхода во времени. Данные об антибактериальной активности материалов с бором делают его перспективным кандидатом для замены классических бактерицидных элементов.

1.3.4. Декорирование поверхности наноразмерными частицами

Легирование поверхности бактерицидным элементом часто не позволяет достичь достаточного уровня антибактериальной активности. Поиск путей повышения эффективности подобных материалов привел к идее создания поверхностей декорированных НЧ бактерицидных металлов. Основным преимуществом создания НЧ перед легированием тем же металлом, является увеличенная эффективная площадь поверхности [151]. Увеличение эффективной площади позволяет повысить скорость и удельное количество выходящих бактерицидных компонентов. Кроме того, наличие неровностей рельефа поверхности (наночастицы) может выступать в качестве дополнительного фактора бактерицидной защиты – антиадгезивного эффекта, который был описан в п.1.3.2. Совокупность этих возможностей привела к росту исследовательского интереса к разработке материалов с НЧ на поверхности. Как правило, материалом НЧ являются те же бактерицидные элементы, что используются при легировании поверхности [43, 152, 155].

Антибактериальные свойства Ag – самого распространённого бактерицидного элемента – были известны с древних времен. Недостатком стратегии с добавлением Ag является вероятность токсичного эффекта высоких концентраций его ионов [156]. Тогда как НЧ Ag на поверхности обеспечивают значительный антибактериальный эффект при относительно низкой концентрации Ag^+ без ущерба для биосовместимости материала [157-158].

Наночастицы платины (Pt) также могут быть эффективны против некоторых патогенов [156]. Нанокристаллы/нанокластеры Pt продемонстрировали способность убивать раковые клетки посредством высвобождения ионов Pt^{2+} [157,158], а Pt-содержащие НЧ проявили антибактериальную активность против клеток *E. coli*, *S. aureus* и *P. aeruginosa* [159]. Ионы Zn и НЧ оксида цинка, которые могут генерировать АФК, проявляют антибактериальную активность против различных штаммов бактерий и грибов [160,161]. Однако, точные механизмы их антибактериальной активности, как и для НЧ Ag и Pt, не известны. Есть данные, что, кроме высвобождения ионов, НЧ благородных металлов (Ag, Au, Pt) повреждают мембрану клеток за счет своего отрицательного дзетта-потенциала [162]. Другим механизмом антибактериальной активности может быть наличие микрогальванических пар на поверхности [163].

Антибактериальные свойства НЧ определяются не только их материалом, но морфологией и химическим состоянием поверхности. Взаимодействие бактерий и материала может зависеть от размера, распределения и окисления НЧ [164-166]. При более высокой плотности НЧ площадь контакта НЧ с бактериями увеличивается, что может усиливать бактерицидный эффект. Стоит отметить, что имеющиеся данные об оптимальном размере НЧ довольно противоречивы и в основном относятся к растворам НЧ [167,168]. Природа антибактериального механизма НЧ Ag еще не изучена. Следует ли рассматривать НЧ Ag только как источник ионов или за этим стоит какой-то дополнительный механизм еще не установлено [169].

Наночастицы можно сформировать на поверхности несколькими методами: золь-гель, электролитическое окисление, отжиг, ионная имплантация [170]. Поверхность ПЭО покрытий декорируют НЧ, подбирая состав электролита при их производстве. Обычно бактерицидные элементы добавляют в электролит в виде уже готовых НЧ или растворимых соединений [153]. Перспективным способом создания НЧ на поверхности может стать ионная имплантация. Этот метод часто используют для введения в материал

контролируемой дозы бактерицидного элемента [171,172]. Большая доза имплантируемого материала при определенных условиях приводит к формированию на поверхности НЧ [173].

Помимо усиленного антибактериального эффекта, наночастицы могут оказывать влияние на биоактивность материала. Формирование НЧ на поверхности микропористого покрытия может приводить к образованию иерархической структуры, которая улучшает распространение клеток костной ткани и усиливает их остеогенную дифференцировку [27,174].

Заключение.

Создание НЧ на поверхности материалов является современным и перспективным способом создания бактерицидной поверхности. Наночастицы позволяют реализовать несколько механизмов антибактериальной активности в одном материале. Однако, слабо изучено влияние этих механизмов и различных типов НЧ на общий уровень бактерицидных свойств материала. Разработка покрытий с НЧ, которые обеспечивают один или несколько механизмов бактерицидной активности материала, может привести к созданию оптимальной антибактериальной поверхности для имплантатов.

1.4. Механизмы уничтожения бактерий при использовании наноразмерных поверхностей

Несмотря на значительный прогресс в области разработки антибактериальных покрытий, в настоящее время нет четкого понимания основной причиной гибели конкретного типа бактерий. Различные подходы к уничтожению или сдерживанию роста бактериальных культур были неоднократно рассмотрены многими авторами. [58,174,176] Большинство работ направлено на придание антибактериальной активности конкретному материалу, но только некоторые из них рассматривали факторы, определяющие бактерицидность материала в отношении различных бактерий. Бактерии различаются по форме, размеру, толщине клеточной стенки, составу внешней

мембраны и многим другим характеристикам, поэтому причины их гибели могут быть разными [152]. Антибактериальные материалы с наноразмерной поверхностью могут приводить к гибели бактерий за счет:

а) ингибирования бактериальной адгезии и образования биопленок из-за электростатического взаимодействия с бактериями (так называемая антиадгезионная, бактерицидная или противообрастающая поверхность),

б) высвобождения ионов бактерицида, приводящих к гибели бактерий через один из известных механизмов (повреждение клеточной оболочки и цитоплазматического компонента, блокирование способности пептидогликана переносить кислород, инактивация ферментативных функций белков, нарушение репликации ДНК),

в) генераций активных форм кислорода, которые, вероятно, вызывают окислительное стресс у бактерий.

г) формирования разницы в потенциалах между областями на поверхности материала, что может привести к гибели бактерий посредством прямого микрогальванического взаимодействия.

1.4.1. Ингибирование бактериальной адгезии

Развитие бактериальной инфекции начинается с миграции бактерий в область имплантации и последующей адгезии на поверхности инородного тела. Бактерии в свободном состоянии, как правило, не представляют угрозы для организма [176]. Адсорбция бактерий — это первый этап образования биопленки, за которым следует прикрепление, и колонизация [177]. Механизм бактериальной адгезии зависит от типа бактериальных организмов, но самым распространённым является возникновение электростатического взаимодействия с поверхностью [176]. Антиадгезионный подход основан на предотвращении адсорбции бактерий на поверхность, что позволяет избежать развития их колоний. Клеточная мембрана большинства бактерий имеет отрицательный заряд, поэтому обеспечение отрицательного заряда поверхности

может приводить к отталкиванию бактерий из-за электростатических сил [178]. Снизить вероятность адгезии также можно через создание определенного рельефа поверхности, который будет неблагоприятен для прикрепления бактерий [179]. Уровень шероховатости рельефа (макро, микро, нано) определяет успешность адгезии бактерии и вероятность формирования биопленки. Третьим способом контроля антибактериальной адгезии является изменение смачиваемости материала [180,181]. Гидрофобные поверхности являются наиболее привлекательными для бактерий, поэтому создание гидрофильных, сильно гидратированных и незаряженных поверхностей может значительно снизить вероятность бактериальной адгезии. Другим преимуществом хорошей смачиваемости поверхности является повышение ее биосовместимых свойств за счет активного прикрепления, распространения и пролиферации костных клеток [182]. Одним из способов обеспечения гидрофильности материалов является создание пористой структуры, что позволяет осуществить метод ПЭО [183].

1.4.2. Выделение бактерицидных ионов

Уничтожение бактерий вблизи поверхности биоматериала ионами бактерицидных агентов является еще одним эффективным способом предотвращения образования биопленки. Существует несколько основных версий природы антибактериального действия ионов. Ионы бактерицидов могут ингибировать бактерии, (а) повреждая их оболочку и цитоплазматический компонент, (б) блокируя способность пептидогликана переносить кислород, (в) инактивируя ферментативные функции белков и/или (г) нарушая репликацию ДНК. Высвобождение ионов – один из наиболее важных факторов, влияющих на взаимодействие бактерий и материала. Стратегия, основанная на высвобождении, подразумевает присутствие противомикробных агентов либо в верхнем слое материала, либо в виде наночастиц (Ag, [184-186] Cu, [187,188] Au, [189,190] Zn [191]). Предполагается, что ионы таких элементов как Ag, Cu, Zr и

Zn проникают через мембрану клетки и вступают во взаимодействия с белками. Взаимодействие металлических ионов с белками приводит к ослаблению связи между аминокислотами в белках и снижает их способность к метаболизму, что и приводит к гибели [192]. Другая теория предполагает нарушение структуры клеточной мембраны ионами металлов [193]. Третий механизм связан с нарушением функций дыхания клетки, образованием свободных радикалов и повреждением ДНК клетки. [187]

Концентрация ионов, которая необходима для успешной инактивации бактерий зависит от вида бактерицидного элемента и от штамма бактерии, поэтому точно не определена [144]. Сообщалось, что минимальная бактерицидная концентрация (МБК) пяти типов бактерицидных ионов (Ag, Cu, Pt, Au и Pd) против трех различных типов бактерий (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *E. faecium*) находится на уровне млн⁻¹ [194]. Однако, другие исследователи сообщают, что заметный антибактериальный эффект многие бактерицидные ионы демонстрируют даже при существенно более низких концентрациях (в диапазоне млрд⁻¹). Некоторые исследования показывают, что нет четкой корреляции между концентрацией высвобождаемых ионов Ag и их антибактериальной активностью [177]. В таблице 1.1 сравниваются известные концентрации ионов Ag, приводящие к инактивации бактерий.

Таблица 1.1. Концентрация ионов Ag, необходимая для подавления бактерий

Штаммы бактерий	Концентрация Ag ⁺ , млрд ⁻¹	Ссылка
<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	60 000	[196,197]
<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	39 000	[198]
<i>E. coli</i>	5 400	[199]
<i>S. aureus</i>	50	[200]
<i>S. epidermidis</i>	18	[201]
<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	10	[164,165]
<i>S. aureus</i>	5	[185]

Таблица 1.1 показывает, что нет единого мнения о минимально необходимой концентрации ионов. Диапазон концентраций, в которых наблюдался антибактериальный эффект ионов, составляет более чем четыре

порядка. Антибактериальная активность Ag зависит от отношения площади бактерицида, к объему бактериальной культуры, типа используемых бактерий, степени агломерации Ag на поверхности и других факторов. Известно, что вероятность токсичного действия на клетки организма тем выше, чем больше содержание Ag [197]. Покрытия, высвобождающие приблизительно 10 млн^{-1} ионов Ag^+ , не были токсичными для остеобластических клеток человека, в то время как при более высоком выщелачивании ионов Ag^+ ($30\text{--}50 \text{ млн}^{-1}$) материал становился чрезвычайно цитотоксичным.

Цитосовместимость материалов сильно зависит от дозы ионов, поэтому ее нужно тщательно контролировать. В частности, токсическое действие ионов Ag^+ , адсорбированных на клеточных стенках, приводящее к их повреждению, сообщалось во многих исследованиях [202,203]. Контролируемого высвобождения ионов металлов трудно достичь, потому что скорость выхода не всегда зависит от содержания бактерицидных элементов, на нее влияют такие дополнительные факторы, как степень агломерации металла, шероховатость и кинетика окисления поверхности [195].

1.4.3. Генерация активных форм кислорода

В последнее время возрос интерес к АФК, как потенциальным антибактериальным средствам [204]. АФК представляют собой свободные радикалы, которые являются очень реакционноспособными соединениями. Высокая реакционная способность позволяет им активно взаимодействовать с клетками, вызывая в них окислительный стресс. Эта особенность сделала их перспективными кандидатами на роль терапевтических агентов в борьбе с бактериальной инфекцией. Основным путем образования АФК является разложение воды. Небольшая антибактериальная активность TiO_2 связана именно с его способностью образовывать АФК, однако, их концентрация очень мала [205]. Образование АФК происходит из-за полупроводниковой природы TiO_2 с шириной запрещенной зоны $3,2\text{--}3,4 \text{ эВ}$ [206]. Энергетическое воздействие

на материал способствует перераспределению электронов из зоны валентности в зону проводимости, что приводит к возникновению носителей положительного заряда (дырок) в валентной зоне и отрицательных носителей заряда (электронов) в зоне проводимости. Дырки пытаются компенсировать недостаток электрона приводят к окислению соединений вокруг материала и образованию АФК [207]. Антибактериальная активность АФК может быть связана не только с индукцией окислительного стресса, но и с повреждением биомолекул (белок и ДНК). Легирование TiO_2 некоторыми элементами позволяет снизить скорость рекомбинации фотогенерируемых зарядов [219].

В работе [55] показано, что комбинация поверхностных НЧ Ag и полупроводниковой матрицы TiO_2 позволила обеспечить генерацию активных форм кислорода из-за фотоэлектрической реакции. Другие исследователи модифицировали покрытия ПЭО TiO_2 множеством методов: гидротермальная обработка, ионное распыление (Ag, Sn, Zn, Pt) [208] и ионная имплантация (Ca, F, N, Fe) [167]. Итоговый антибактериальный эффект полученных ПЭО TiO_2 с НЧ был связан либо с образованием комплекса фторида металла, либо с образованием АФК [209]. Композиты металл/ TiO_2 обычно демонстрируют хорошую антибактериальную активность в основном при УФ облучении. Однако, есть данные, что Au/ TiO_2 проявляют антибактериальный эффект из-за АФК, которые образуются в результате фотокаталитического эффекта в видимом свете [210]. Au/ TiO_2 покрытия частично разрушали клетки бактерий даже в темноте [211]. Предполагается, что НЧ Ag и Au в покрытиях Ag/ TiO_2 [212] и Au/ TiO_2 [213] захватывали электроны, образующие барьер Шоттки на границе раздела металл/керамика, тем самым уменьшая скорость рекомбинации заряда.

НЧ оксида Fe очень активны для генерации АФК. Например, Fe^{2+} легко реагирует с H_2O_2 с образованием гидроксильных радикалов через классическую гомогенную реакции Фентона [215,216]. Реакции образования АФК НЧ оксида Fe в биологической среде были неоднократно рассмотрены при облучении солнечным светом [217],[218].

Заключение

Бактерии можно уничтожить с помощью АФК, что было показано во множестве работ, однако, важно обеспечить достаточную концентрацию радикалов. Создание на поверхности материала НЧ металлов позволяет усилить генерацию АФК. Материал, образующий достаточный уровень АФК или комбинирующий их с другими антибактериальными механизмами, потенциально может стать универсальной антибактериальной поверхностью.

1.4.4. Наличие разницы потенциалов

Поиск альтернативы стандартным методам предотвращения бактериальной колонизации привел к разработке поверхностей, которые убивают бактерии при контакте за счет микрогальванического эффекта. Микрогальванический эффект может возникать между металлической НЧ и окружающей матрицей покрытия. Например, недавно сообщалось, что частицы Mg-Ti эффективнее уничтожали клетки в сравнении с одиночными частицами Mg [220]. Фагоцитоз частиц был невозможен ввиду их большого размера, поэтому единственным объяснением их цитотоксического эффекта стал микрогальванический эффект. Сообщалось также об антибактериальном эффекте тонких покрытий из Mg в отношении *S. epidermis*, который объясняли несколькими факторами, включая влияние микрогальванических взаимодействий [221,222]. Факт образования микрогальванических пар между НЧ Ag и матрицей TiO₂ в жидкости подтверждали в нескольких работах через измерение электрохимической поляризации и дзета-потенциала [163,168]. Результаты исследований показали, что модифицированные НЧ Ag поверхности значительно уменьшали распространение бактерий *S. aureus* и *E. Coli*, несмотря на очень низкое содержание ионов Ag⁺ (<10 млрд⁻¹) в воде после выдержки 70 дней. Антибактериальную активность объяснили физическим контактом бактерий с металлическими НЧ, что привело к переносу электронов от бактерий к НЧ и далее к носителю TiO₂ [211,213]. Предполагается, что бактерии могут

погибнуть из-за потери электронов [213] или из-за образования непосредственно АФК, которые атакуют клеточную мембрану и нарушают ее целостность [214]. Существуют также данные, что Ag и Cu металлы, кроме действия ионов, могут уничтожать бактерии за счет поверхностных контактных эффектов при низкоинтенсивном облучении [209]. Механизм межфазного переноса заряда между CuO и Ag₂O предположительно основан на разделении электронно-дырочных пар под облучением. Было также высказано предположение, что антибактериальный механизм вызван нарушением протонного электрохимического градиента в межмембранном пространстве бактерий из-за образования обедненных протонами областей во время катодных реакций [223]. Известна гипотеза, что обедненные протонами области могут формироваться вокруг НЧ Ag и нарушать трансмембранный протонный электрохимический градиент у бактерий [224]. Однако, Ag является бактерицидным элементом, поэтому данные о действии микрогальванических пар в его случае следует рассматривать скептически. Микрогальванический эффект покрытия TiO₂ с НЧ Ag был усилен за счет легирования Zn [225,126]. Покрытия, модифицированные Zn и Ag, продемонстрировали повышенный бактерицидный эффект по сравнению с образцами, содержащими только Ag или Zn. Однако, сделать утвердительный вывод о влиянии микрогальванических процессов на антибактериальный эффект невозможно, поскольку оба элемента являются бактерицидами.

Заряженная поверхность материала может ингибировать образование биопленки не только за счет теоретического воздействия микрогальванических пар. Наиболее распространённым и доказанным механизмом ингибирования бактериальной адгезии является электростатическое взаимодействие между бактериями и поверхностью имплантата [227,228]. В физиологических условиях поверхность грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток несет отрицательный заряд, который возникает в результате диссоциации или протонирования карбоксила (-COOH), фосфата (-HPO₄, -H₂PO₄, -HPO₄-) и амино (NH₃⁺). группы. При приближении к заряженной поверхности имплантата

заряженные группы могут объединяться или диссоциировать на поверхности бактерий, изменяя их конформацию.

Заключение

Главным вопросом остается, можно ли обеспечить антибактериальную активность только за счет микрогальванического эффекта или добиться синергетического эффекта путем комбинации микрогальванических пар и бактерицидных ионов. Взаимодействие микрогальванических пар и бактерий изучено слабо и может стать перспективной стратегией создания антибактериальных поверхностей.

1.5. Постановка задачи

Аналитический обзор литературы показал, что требуется разработка материала, который будет способен противодействовать бактериальной инфекции при низкой токсичности в отношении клеток костной ткани. Совместить в одном материале эти два подхода можно объединив несколько стратегий создания антибактериальных поверхностей. Задачу предполагается достичь, создав наноструктурированное биосовместимое покрытие, модифицированное биоактивными и антибактериальными функциональными элементами в виде НЧ. С целью разработки такого материала будут использованы несколько подходов:

- введение в состав TiCaPCON и ПЭО TiO₂ покрытий Ca, P и B;
- создание НЧ Ag, Zn, Fe и Pt с большой эффективной площадью на поверхности TiCaPCON и ПЭО TiO₂ покрытий;
- нанесение растворимого антибактериального слоя VO_x на TiCaPCON-B покрытие.

Ca, P и B будут введены в покрытия в процессе получения и для повышения биоактивности исходных покрытий, а НЧ предполагается создать на поверхности методом ионной имплантации. НЧ Ag, Zn, Pt, Fe планируется

использовать для достижения безопасной дозы бактерицидных ионов. Предполагается изучить возможность комбинации нескольких НЧ с целью (а) управления кинетикой выхода бактерицидного компонента, (б) обеспечения генерации АФК при облучении УФ светом и (в) проверки гипотезы о возможности формирования разницы потенциалов на поверхности. Важно оценить действие на бактерии каждого из перечисленных антибактериальных механизмов. Бор предполагается ввести в материал в качестве легирующего компонента и нанести непосредственно в виде оксида на поверхность с целью проверить его антибактериальные свойства.

ГЛАВА 2. Материалы, оборудование и методика исследований

2.1. Исходные материалы подложек

Подложками для нанесения покрытий на основе TiCaPCON являлись пластины монокристаллического кремния марки КЭФ-4.5, ориентированные плоскостью (100) и диски диаметром 30 мм, толщиной 10 мм из титанового сплава BT1-0. Покрытия на основе TiO₂ наносили на пластины из титанового сплава BT1-0 размером 15×15×5 мм.

Диски и пластины вырезали на электроэрозионном станке из прутка и цельного листа титанового сплава марки BT1-0, соответственно. Подложки шлифовали и полировали на автоматической шлифовально-полировальной машине RotoPol (Struers, США). Шлифовку дисков проводили на абразивных дисках с зернистостью (P) 120, 250, 500, 1000, 2000 и 4000 последовательно. Следующим этапом подготовки была механохимическая полировка поверхности с использованием оксидной суспензии, 10% раствора аммиака и пероксида водорода. Шлифовку пластин осуществляли на абразивном круге с зернистостью P = 120, после чего пластины подвергали травлению в концентрированной плавиковой кислоте (HF) в течение 10 сек. Все образцы после шлифовки, полировки и травления промывали дистиллированной водой и хранили в сушильном шкафу при температуре 50°C.

2.2. Методики получения покрытий

2.2.1. СВС мишень для магнетронного распыления

Материалом для нанесения покрытий выступала композиционная мишень 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%), изготовленная согласно ТУ 24.45.30–026-11301236-2018 «Мишени-катоды однослойные композиционные СВС-П для ионно-плазменного осаждения многофункциональных биоактивных наноструктурных

покрытий (МБНП)» в ЗАО НПО «Металл» методом самораспространяющегося высокотемпературного синтеза. Покрытия были нанесены методом физического осаждения из газовой фазы путем магнетронного распыления мишени в смеси газов (Ar) с 15% азота (N). Технологические параметры нанесения покрытия были подобраны согласно ТУ 9438-015-11458417-2008 «Набор имплантатов титановых с многофункциональными биоактивными наноструктурными покрытиями для черепно-челюстнолицевой хирургии ЧЧЛХ-Имбнп-«Конмет».

2.2.2. Получение покрытий TiCaPCON

Покрытие TiCaPCON толщиной 0,8–1,0 мкм наносили на подложки в вакуумной камере многофункциональной установки, собранной на базе УВН-2М. Установка оснащена вакуумной системой, включающей форвакуумный насос модели НВР-60 и диффузионный насос модели НД-250, которые совместно обеспечивают в вакуум до 2×10^{-3} Па. В рабочей камере установки присутствуют два планарных сбалансированных магнетрона для распыления мишеней диаметром до 120 мм, два ионных источника и имплантер высокоэнергичных ионов.

Подложки фиксировали напротив мишени на расстоянии 100 мм. Начальное давление в рабочей камере стабилизировали в значении 10^{-3} Па, затем камеру заполняли Ar до общего давления 0,2 Па. Первым этапом технологического цикла получения покрытий являлась очистка поверхности от адсорбированных газов и оксидных слоев. Очистку проводили путем ионного травления подложек в пучке ионов аргона (Ar) при давлении газа 8×10^{-2} Па с помощью источника щелевого типа. Параметры очистки были следующие: напряжение 2 кВ; энергия ионов 2 кэВ; смещение -500 В; плотность ионного тока на подложках 2 мА/см²; время очистки 10 мин, температура подложек 200 °С. Адгезию покрытий к подложке Si повышали путем имплантации ионов титана (Ti²⁺) с энергией около 40 кэВ в течение последних 3 трех минут ионной очистки

и первых 2 минут осаждения покрытия. Имплантацию проводили при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе 5 мА.

Покрытие TiCaPCON наносили путем магнетронного распыления композиционной мишени диаметром 120 мм и толщиной 8 мм состава TiC+10%Ca₃(PO₄)₂ в газовой смеси аргона и азота при парциальном давлении азота N₂/(N₂+Ar)15%. Стабилизацию состава поверхности мишени, удаление газа и влаги с поверхности осуществляли путем предварительного прогрева мишени при повышенном токе и тепловой нагрузке перед нанесением покрытия. Для снижения возможных напряжений в покрытии первый этап осаждения в течение 2 мин осуществляли при малой величине тока – 1 А (устройство Advanced Energy Pinnacle Plus). Затем производили основной этап осаждения покрытия. Параметры основного этапа имели следующие значения: расстояние до подложки 100 мм, общее давление в камере 0,1 Па, напряжение смещения на подложке -50 В, ток магнетрона 2А, время напыления 15 мин.

2.2.3. Получение покрытий VO_x/TiCaPCON-B

Покрытий состава TiCaPCON-B наносили методом магнетронного распыления двух композиционных СВС мишеней составов TiC_{0,5}+10%Ca₃(PO₄)₂ и TiB₂ в атмосфере Ar+15%N при давлении 0,1 Па в течение 30 мин. Расстояние до подложки соответствовало 100 мм, температура подложки 200°C, напряжение смещения -50В. Ток на мишени TiC_{0,5}+10%Ca₃(PO₄)₂ фиксировали в значении 2 А, а на мишени TiB₂ изменяли в зависимости от требуемой концентрации В от 1,2 до 1,4 А (таблица 2.1).

Покрытия VO_x/TiCaPCON-B были получены методом ионного распыления мишени на основе VO_x в одном технологическом цикле сразу после осаждения покрытия TiCaPCON-B. Процесс нанесения слоя В₂О₃ начинали за 3 мин до окончания осаждения покрытия TiCaPCON-B, для этого ток на магнетронах с мишенями TiC_{0,5}+10%Ca₃(PO₄)₂ и TiB₂ снижали до 1 А. Ток и

напряжение разряда ионного источника поддерживали на уровне 70 мА и 2 кВ, соответственно, осаждение проводили в течение 25 мин (таблица 2.1).

Таблица 2.1. Параметры осаждения покрытий $\text{VO}_x(\text{TiO}_x)\text{-TiCaPCON-B}$

Образец	Ток на магнетроне с мишенью TiB_2 , А	Условия нанесения второго слоя	Содержание В в TiCaPCON-B покрытиях, ат.%
TiCaPCON-15\% B	1,4	-	15 ± 1
TiCaPCON-11\% B	1,2	-	11 ± 1
TiCaPCON-8\% B	1	-	8 ± 1
$\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-B}$	1,2	Осаждение V_2O_3 $I=70 \text{ мА}, U=2 \text{ кВ}$	11 ± 1

2.2.4. Получение покрытий TiO_2

Покрытия TiO_2 были получены методом ПЭО подложки из титанового сплава марки ВТ1-0 размером $15 \times 15 \times 5$ мм в электролите фиксированного состава. Дистиллированная вода была выбрана в качестве основы для электролита, чтобы избежать попадания в покрытие сторонних примесей. Электролит для ПЭО приготавливали путем смешивания нескольких химических соединений в различной комбинации: $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ или $\text{CaC}_3\text{H}_5(\text{OH})_2\text{PO}_4$ в качестве источника Ca, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ или $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 3\text{H}_2\text{O}$ в качестве источника P, жидкое стекло для введения Si, а NH_3CO_4 для снижения поверхностной энергии в качестве поверхностно активного вещества (ПАВ). Уровень кислотности электролита поддерживали в диапазоне 12–13 pH, массу реагентов экспериментально подбирали, исходя из требуемого элементного состава TiO_2 слоя.

Процесс ПЭО проводили в камере из нержавеющей стали емкостью 0,5 л, оснащенной механической мешалкой, датчиком температуры электролита и кожухом водяного охлаждения. Емкость охлаждалась жидкостью с температурой не более $1,5 \text{ }^\circ\text{C}$, что позволило поддерживать температуру электролита $12\text{-}25^\circ\text{C}$ (в зависимости от типа электролита) в процессе ПЭО.

Импульсный источник питания формировал биполярные асимметричные импульсы тока различной длительности и рабочего цикла. Образцы получали в потенциостатическом биполярном асимметричном режиме (ПБА) в течение 10 мин, частота импульсов составляла 1000 Гц, электролит перемешивали со скоростью 1000 об/мин. Подробный состав электролитов (Э) и параметры режимов (Р) приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2. Параметры плазменного электролитического оксидирования титана

Образец	Состав электролита	Катодный импульс		Анодный импульс		Т электролита
		U, В	t, мкс	U, В	t, мкс	
Э ₁ /Р ₁	150 г/л Na ₃ PO ₄ ×12H ₂ O, 20 г/л Ca(OH) ₂ 0,7 г/л жидкое стекло	450	250	300	150	23-25
Э ₂ /Р ₂	5 г/л Ca(CH ₃ COO) ₂ , 2 г/л NH ₂ -CO-NH ₂ , 1 г/л жидкое стекло 0,5 г/л КОН.	750	20	500	40	23-25
Э ₃ /Р ₃	1,5 г/л CaC ₃ H ₅ (OH) ₂ PO ₄ 2 г/л NH ₄ (CO) 2 г/л K ₄ P ₂ O ₇ ×3H ₂ O	550	140	350	90	12-14

2.2.5. Создание наночастиц Pt, Fe, Ag и Zn на поверхности покрытий

Метод имплантации высокоэнергичных ионов металлов был применен для формирования наночастицы на поверхности покрытий TiCaPCON и TiO₂. Имплантацию производили в установке, собранной на базе УВН-2М и оснащенной имплантером типа MEVA. Источниками ионов выступали литые металлические катоды Pt, Fe, Ag и Zn с чистотой не менее 99,99%. Образцы фиксировали стороной с покрытием в направлении супрессора на расстоянии не

более 100 мм и приводили во вращение. Распыление катода осуществляли при напряжении 150–200 В в среде Ar с давлением 5×10^{-2} Па. Имплантацию ионов осуществляли в при ускоряющем напряжении 30 кВ, средний ионный ток контролировали в диапазоне от 5 до 7 мА (в зависимости от типа имплантируемого металла). Частота имплантации составляла около 20 Гц, доза облучения 5×10^{17} ион/см².

Покрyтия TiCaPCON первоначально имплантировали ионами Ag, Zn, Pt или Fe в течение 30 мин (система TiCaPCON-Ag,Zn) или 60 мин (система TiCaPCON-Pt, Fe). Второй этап имплантации заключался во введении в покpытия, имплантированные Ag (система TiCaPCON-Ag,Zn) ионов Zn, а в покpытия, имплантированные Pt (система TiCaPCON-Pt,Fe), ионов Fe в течение 15 мин. В системе TiCaPCON-Pt,Fe часть образцов отжигали в вакууме под давлением 10^{-3} Па при температуре 700°C в течение 1 часа (образцы Pt_{от}, Fe_{от}, (Pt+Fe)_{от}). Затем, покpытия Pt_{от} снова имплантировали ионами Fe по описанном выше режиму второго этапа имплантации. Полученные образцы представлены в таблицах 2.3 и 2.4.

ПЭО TiO₂ покpытия имплантировали ионами Ag и Pt с помощью ионного имплантера типа MEVVA, используя металлические катоды Ag и Pt (99,99%). Ионную имплантацию проводили в атмосфере Ar в течение 60 мин при остаточном давлении 2×10^{-2} Па, частоте импульсов 20 Гц и ускоряющем напряжении 30 кВ со средним ионным током в диапазоне 5–7 мА.

Таблица 2.3. Параметры ионной имплантации в системе Ag,Zn

Образец	Катод	Напряжение, кВ	Ток, мА	Время, мин	Катод	Напряжение, кВ	Ток, мА	Время, мин
Ag	Ag	30	7	30	-	-	-	-
Zn	Zn	30	5	30	-	-	-	-
Ag+Zn	Ag	30	7	30	Zn	30	5	10

Таблица 2.4. Параметры ионной имплантации в системе Pt,Fe

Образец	Катод	Напряжение, кВ	Ток, мА	Время, мин	Температура отжига, °С	Катод	Напряжение, кВ	Ток, мА	Время, мин	Температура отжига, °С
Pt	Pt	30	7	60	-	-	-	-	-	-
Pt _{от}	Pt	30	7	60	700	-	-	-	-	-
Pt _{от} +Fe	Pt	30	7	60	700	Fe	25	5	15	-
Pt+Fe	Pt	30	7	60	-	Fe	25	5	15	-
(Pt+Fe) _{от}	Pt	30	7	60	-	Fe	25	5	15	700
Fe	Fe	30	5	60	-	-	-			-
Fe _{от}	Fe	30	5	60	700	-	-			-

2.3. Методики исследований покрытий

2.3.1. Растровая и просвечивающая электронная микроскопия

Микро- и нанотруктуру покрытий TiCaPCON изучали методом растровой электронной микроскопии (РЭМ), который имеет высокую разрешающую способность, что актуально для наноструктурных материалов. Фронтальную съемку покрытий сверху и анализ поперечного сечения осуществляли на растровом электронном микроскопе с автоэмиссионным катодом JEM7600F (JEOL, Япония) с разрешением до 1 нм, ускоряющим напряжением 25 кВ и увеличением от $\times 50000$ до $\times 400000$. Элементный состав покрытий изучали методом микрорентгеноспектрального анализа с использованием приставки INCAx-sight, установленной в микроскоп. Анализ поверхности образцов ПЭО TiO₂ покрытий производили методом РЭМ на приборе S-3400N (Hitachi, Япония) с разрешающей способностью до 3 нм при ускоряющем напряжении 30 кВ. Съемку образцов производили при ускоряющем напряжении 15 кВ, фокусном расстоянии до детектора 8 мм и увеличении от $\times 2000$ до $\times 300000$.

Детальное исследование структуры некоторых покрытий было проведено методом темнопольной просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМ ВР) на платформе Titan 80-300 с поправкой на Cs (Thermo Fisher Scientific) и пространственным разрешением до 0,1 нм. Предварительную подготовку образцов к исследованию выполняли на системе Helios 600i DualBeam (Thermo Fisher Scientific) путем травления фокусированным ионным пучком (ФИП) пластин монокристаллического кремния марки КЭФ-4.5 (100) с нанесенным на поверхность покрытием. Распределение имплантированных элементов в покрытиях было проанализировано с помощью комбинации высокоуглового кольцевого сканирования в темном поле ПЭМ (HAADF-STEM) и энергодисперсионной

рентгеновской спектроскопии (ЭДС) с использованием широкоугольного детектора CENTURIO EDS.

2.3.2. Рентгеноструктурный фазовый анализ

Структуру образцов покрытий исследовали методом рентгеноструктурного фазового анализа (РФА) на рентгеновском дифрактометре модели D8 Advance (Bruker, Германия), который позволяет проводить качественный фазовый анализ и определять области когерентного рассеяния. Покрытия изучали с использованием монохроматизированного $\text{CuK}\alpha$ -излучения с длиной волны $\lambda=1.54 \text{ \AA}$, интервал Брегговских углов 2θ составлял $10\div 90^\circ$, шаг $0,1^\circ$, время выдержки в каждой точке 10 секунд. При проведении расчетов порядок дифракционного максимума, который описывает разность хода лучей при отражении соседних плоскостей, был принят за единицу ($n=1$). Покрытия с НЧ для минимизации сигнала от подложки исследовали с применением метода скользящего пучка при котором угол падения излучения не превышал 3° по отношению к плоскости покрытия. Межплоскостные расстояния вычисляли по формуле Вульфа-Брега (2.1):

$$2d \sin \theta = n\lambda; \quad (2.1)$$

где,

d – межплоскостное расстояние,

λ – длина волны,

θ – угол скольжения,

n – порядок дифракционного максимума.

Области когерентного рассеяния (размер кристаллитов) рассчитывали по методу Селякова-Шеррера (2.2):

$$d = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}; \quad (2.2)$$

где,

d — средний размер кристаллов,

K — коэффициент формы частиц ($K=0.9$ для сферических частиц),

λ — длина волны рентгеновского излучения (λ (Cu) = 1,54),

β — ширина рефлекса на полувысоте (в радианах, и в единицах 2θ),

θ — угол дифракции (Брэгговский угол).

2.3.3. Спектроскопия комбинационного рассеяния и Фурье в инфракрасной области

Молекулярные связи в покрытиях были изучены методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС) на конфокальном спектрометре, интегрированном в атомно-силовой микроскоп NTEGRA Spectra (NT-MDT, Россия). Разрешение прибора при съемке спектров составляет 1 см^{-1} , а предел пространственного разрешения прибора менее 200 нм по осям X и Y. Съемку спектра КРС покрытий осуществляли с использованием приставки, оснащенной оптической линзой с увеличением $\times 100$. Образец облучали монохроматическим излучением с длиной волны 632,8 нм, отраженный сигнал записывали в диапазоне длин волн от 200 до 1600 см^{-1} , время набора сигнала в одной точке составляло 20 сек. Полученные спектры покрытий анализировали с использованием общедоступных литературных источников и специализированных баз данных.

Фурье спектроскопия в инфракрасной области (ИК-Фурье спектроскопия) применялась для анализа химических связей и функциональных групп на поверхности покрытий. ИК-спектры образцов получали с применением ИК-Фурье спектрометра модели «Vertex 70v» («Bruker», Германия). Образцы исследовали на приставке полного

внутреннего отражения (ПВО), предназначенной для анализа поверхностей. Съемка спектров осуществляется при давлении в камере 10^{-2} Па, в диапазоне длин волн от 400 до 3000 см^{-1} , угле падения света 15° , с разрешением 4 см^{-1} и диаметре апертуры 6 мм. Полученные спектры были сглажены и скорректированы по базовой линии. Базовой линией был принят спектр полученный от зеркала в камере без образца. Спектры покрытий были проанализированы с использованием общедоступных баз данных органических и неорганических соединений и других литературных источников (статей, обзоров, монографий).

2.3.4. Спектроскопия зеркального отражения

Отражательную способность образцов изучали методом спектроскопии зеркального отражения (ЗО). Спектры зеркального отражения регистрировали на спектрофотометре Cary-5000 с приставкой UMA в диапазоне длин волн 200–1000 нм. Измерения проводили в двухлучевом режиме с использованием частично поляризованного света при углах падения света 30, 40, 50 и 60 градусов.

2.3.5. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

Химические связи, валентность и состав поверхности покрытий определяли с помощью полуколичественных методов анализа – рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) и электронной оже-спектроскопии (ОЭС) с использованием спектрометра PHI 5000 VersaProbeII (ULVAC-PHI inc.). Загрязнения удаляли путем травления поверхности ионами Ar при 2 кВ в течение 2 мин. Давление в процессе РФЭС составляло $4,7 \times 10^{-8}$ Па. Образцы облучали потоком электронов с помощью монохроматического излучения Al K α ($h\nu = 1486,6$ эВ) при 50 Вт, детектируя электроны, выбитые из образца. Съемка спектров РФЭС проводилась без использования зарядного

нейтрализатора, анализируемая площадь составляла $0,38 \text{ мм}^2$, энергия прохода от 23,5 до 40 эВ, а ширина шага 0,2 эВ. Полученные спектры РФЭС анализировали с помощью сдвига шкалы энергии связи (ЭС) для корректировки положения пика C1s при 285,0 эВ. Шкалу энергии связи также калибровали по линиям Au_{4f7/2} (84,0 эВ) и Cu_{2p3/2} (932,6 эВ). Значения ЭС для углерода, титана и азота брали из имеющихся данных. Идентификацию спектров РФЭС проводили в программном обеспечении CasaXPS, с этой целью первоначально производили вычет фона по методу Ширли с использованием пиков Гаусса-Лоренца (G-L) с фиксированным процентом G-L, равным 30 для большинства пиков. Пики металлической Pt и пик C1s графита были подогнаны с использованием асимметричной функции LF, встроенной в программное обеспечение CasaXPS.

2.3.6. Атомно-силовая микроскопия и Кельвин-зондовая силовая микроскопия

Топографию, профиль сечения и параметры шероховатости покрытий анализировали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на приборе NTEGRA Spectra (NT-MDT, Россия). Измерения осуществляли с использованием АСМ приставки и кантилевера с радиусом скругления 10 нм, который определяет латеральное разрешение прибора. Исследования проводили в полуконтактном режиме работы с разрешением по вертикали до 1 нм, область анализа покрытий составляла $5 \times 5 \text{ мкм}$. Настройку контраста изображений и расчет параметров поверхности проводили с использованием встроенного программного обеспечения прибора.

Распределение потенциала по поверхности покрытий было изучено путем измерения величины заряда с помощью Кельвин-зондовой силовой микроскопии (КЗСМ) на атомно-силовом микроскопе NTEGRA Spectra (NT-MDT, Россия). Измерения проводили на приставке с кантиливером, имеющим проводящее золотое напыление (Au) и подключенным к заземлению.

Поверхность анализировали до погружения в физиологический раствор (ФР, 0,9 мас.% NaCl в воде) и после выдержки в течение 12 часов. Образцы хранили в стакане с ФР 12 часов, после промывали деионизированной водой и прижимали серебряной пастой к металлическому столику. Расстояние между образцом и зондом в процессе измерений составляло 70 нм, скорость сканирования не превышала 0,5 Гц (5 мкм/с), а анализируемая площадь 3×3 мкм². Изображение АСМ формировались во время первого прохода иглы по поверхности образца, а карты распределения потенциалов были построены во время второго прохода. Сканирование выполняли при переменном напряжении и на резонансной частоте наконечника, которая автоматически устанавливалась на этапе калибровки оборудования.

2.3.7. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой

Скорость высвобождения ионов элементов изучали методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) с использованием блока X-Series II (Thermo Fisher Scientific, США). Ионов выходили с поверхности покрытий площадью 1×1 см² в ячейки заполненные 20, 40 или 50 мл ФР с температурой 37 ± 1 °С. Аликвоты раствора объемом 1,5 мл отбирали из ячеек с образцами для анализа концентрации ионов в растворе через 1, 3, 6, 12 часов и 1, 2, 3, 5, 7, 10 и 14 дней инкубации в зависимости от типа изучаемого покрытия. Каждую аликвоту разбавляли 30 мл 3% азотной кислоты (HNO₃) для обеспечения условий измерения, соответствующих ряду доступных калибровок прибора. Объем одной пробы для анализа ИПС-МС составлял 1 мл, а продолжительность измерения составляла 60 мс. Каждый образец был измерен 5 раз, а полученные результаты усреднены. Полученная концентрация ионов для каждого образца пересчитывалась на оставшийся объем раствора.

2.3.8. Методика оценки количества АФК

Количество генерируемых покрытиями АФК оценивали путем анализа диацетата 2',7'-дихлоргидрофлуоресцеина (DCFH2-DA) [229] в растворе методом флуоресцентной спектрофотометрии на спектрофотометре Cary Eclipse (Agilent Technologies) с использованием длины волны возбуждения 495 нм и излучения 520 нм. DCFH2 получали из DCFH2-DA путем смешивания 0,5 мл 1,0 мМ DCFH-DA в диметилсульфоксиде с 2,0 мл 0,01 н. NaOH. Деэтерификацию DCFH-DA проводили при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего смесь нейтрализовали 10 мл NaH_2PO_4 (25 мМ, pH 7,4). Первоначально были построены калибровочные кривые на основе нескольких растворов с различной концентрацией DCFH2 (1, 10, 100 и 1000 нМ), приготовленных в 40 мМ Трис-буфере при pH 7,4. Растворы обрабатывали смесью, содержащей H_2O_2 (10 мкМ) + Fe_2 (10 мкМ) (из FeSO_4) [230].

Образцы покрытий металл/TiCaPCON площадью 1 см² погружали в 10 мл физиологического раствора (0,9 % NaCl) с pH 7,4 для анализа количества генерируемых АФК. Аликвоты объемом 3 мл отбирали через 1, 3, 12 и 24 ч инкубации покрытий для реакции с DCFH2-DA и количественного измерения АФК. Аликвоты анализировали с использованием длины волны возбуждения 495 нм и излучения 520 нм. [231]. Тесты флуоресцентной спектрофотометрии были проведены после экспонирования образцов под облучением УФ, видимым светом и после хранения в темноте в течение 8 часов. Облучение УФ светом проводили в течение 30 мин под бактерицидной лампой ANC 170/70-R3-3 (LIT Phonon) при длине волны 253,7 нм, мощности 50 Вт на расстоянии 10 см. Расстояние между лампой и образцами составляло 10 см, а время облучения 30 мин. Облучение естественным светом производили на подоконнике с 10:00 до 18:00 часов в солнечный день. Рекомбинацию АФК изучали путем оценки концентрации АФК в аликвотах, хранящихся в течение 54–66 часов. Долговременную генерацию АФК исследовали после предварительной выдержки образцов в течение 24 часов в ФР и замены его на

новый. Затем проводили экспозицию образцов в обновленном ФР в течение 8 часов, после чего измеряли концентрацию АФК.

Площадь поверхности образцов ПЭО TiO_2 , способная к генерации АФК, составляла 15 см^2 . Перед воздействием света все образцы выдерживали в закрытом ящике без доступа света в течение 2 недель для устранения эффекта от ранее накопленной энергии. ПЭО образцы были разделены на три группы. Первую группу погружали в 30 мл ФР и подвергали УФ-облучению в течение 1 часа на расстоянии 10 см с использованием бактерицидной лампы АНС 170/70-Р3-3 (LIT Phonon) при длине волны 253,7 нм и мощности 50 Вт. Вторую группу образцов сначала помещали на подоконник на 24 часа, а затем погружали в ФР и, наконец, оставляли под прямыми солнечными лучами на 1 час. Образцы третьей группы погружали в ФР и хранили в темноте на протяжении всего теста флуоресцентной спектрофотометрии. Значение рН во время измерения АФК составляло 7,4. Аликвоты объемом 1 мл отбирали через 3, 6, 12 и 24 ч для реакции с DCFH2 и количественного определения АФК. Все манипуляции с образцами проводили при слабом искусственном освещении.

2.3.9. Изучение механических и электрохимических свойств, смачиваемости и сопротивления покрытий

Адгезионную прочность покрытий определяли на адгезиметре Revetest (CSM Instruments, Швейцария). Механические свойства покрытий измеряли методом наноиндентирования на нанотвердомере Nano-Hardness Tester (CSM Instruments, Швейцария). Твердость (H), модуль упругости (E) и упругое восстановление (W_e) рассчитывали по методу Оливера-Фара. Формула для расчета упругого восстановления материала:

$$R = (h_m - h_f) / h_m (\%) \quad (2.1)$$

где h_m – максимальная глубина проникновения индентора, нм,

h_f – глубина проникновения индентора после снятия нагрузки, нм.

Адгезиметр состоит из системы нагружения и оптического микроскопа. Измерительное царапание покрытий осуществляли конусным индентором типа Роквелл-С с радиусом закругления 200 мкм. Образец помещали на предметный столик, с помощью оптического микроскопа ($\times 800$) выбирали область царапания и инициировали погружение индентора. Фиксируемые параметры – нагрузка, глубина проникновения, интенсивность акустической эмиссии и коэффициент трения.

Нанотвердомер представляет собой аналитический комплекс, включающий в себя оптический микроскоп и прецизионный твердомер. Перемещение образца между этими узлами осуществляется на предметном столике с цифровым приводом. Калибровка прибора заключалась в установлении точки контакта индентора и поверхности образца. Образец помещали на предметный столик, на оптическом микроскопе устанавливали увеличение $\times 1000$ и выбирали область идентификации. Предметный столик с образцом перемещали к узлу твердомера, и производили погружение индентора Берковича (трехгранная алмазная пирамида). Фиксируемые параметры – глубина проникновения индентора от нагрузки.

Электрохимические характеристики покрытия были изучены потенциодинамическим методом на потенциостате Voltalab PST050 (Radiometr Analytical). Образцы, изолированные токонепроводящим лаком с рабочей площадью 1 см² помещали в термостатированную электрохимическую ячейку с физиологическим раствором (0,9% NaCl) с температурой 37 ± 0.1 °C, поддерживаемой термостатом ТЖ-ТС-01. Электрический контакт подводили к образцу через медный зажим с припаянной к нему проволокой, напротив поверхности устанавливали капилляр Лугина, электрохимически связанный с хлорид-серебряным (AgCl) электродом сравнения, а на расстоянии 30 мм вспомогательный платиновый (Pt) электрод площадью 1 см². Потенциал свободной коррозии материала

измеряли в течение 30 мин и использовали в качестве точки отсчета потенциодинамических исследований. Поляризационные зависимости тока и потенциала были сняты в интервале -100 и +2500 В (от потенциала свободной коррозии) со скоростью 1, 3 или 10 мВ/с. После измерений все потенциалы были пересчитаны в шкалу нормального водородного электрода сравнения (смещены на 199 мВ).

Электропроводность образца TiCaPCON измерялась методом 4-зондового контакта в трех различных областях пленки с использованием источника питания Keithley 236 и измерительного блока источника Keithley 2400.

Смачиваемость покрытий измеряли по лежащей капле с использованием полууголового метода оценки угла контакта на установке CAM 101 («KSV Instruments», Финляндия), оснащенной камерой. Каплю дистиллированной воды объемом 5 мкл выгружали на поверхность покрытий, производили снимок профиля капли и с помощью встроенного программного обеспечения производили расчет угла контакта с поверхностью. Для каждого образца краевые углы анализировали в динамике через 0, 5 и 10 мин, а результаты усредняли по пяти измерениям.

2.3.10. Исследование биоактивности *in vitro* в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма

Раствор, имитирующий внутреннюю среду организма, подготавливали из реагентов, перечисленных в таблице 2.5, по стандартной методике [232]. Образцы с покрытием и контрольные образцы (Ti) замачивали в колбах, заполненных 40 мл SBF, при 36,7°C, которая поддерживалась термостатом. Каждые 7 дней раствор заменяли на новый. После воздействия раствора РФЭС в течение 14 и 28 дней образцы удаляли, промывали дистиллированной водой и структурно исследовали с помощью РФА и РЭМ.

Таблица 2.5. Реагенты для приготовления SBF

Реагент	Количество
Три (гидроксиметил) аминотан ($C_4H_{11}NO_3$)	6,057 г/л
Хлорид натрия (NaCl)	7,996 г/л
Хлорид калия (KCl)	0,224 г/л
Хлорид кальция ($CaCl_2$)	0,278 г/л
Бикарбонат натрия (KCl)	0,350 г/л
Сульфат натрия (Na_2SO_4)	0,071 г/л
Гексогидрат хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,305 г/л
Двухосновной тригидрофосфат калия ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	0,228 г/л
Соляная кислота (HCl)	40 мл г/л

ГЛАВА 3. Разработка покрытий в системе TiCaPCON-Ag,Zn и TiCaPCON-Pt,Fe.

Анализ литературных данных, приведенных в главе 1, позволил заключить, что антибактериальной активности материала можно достичь за счет выхода бактерицидных ионов, генерации активных форм кислорода и создания микрогальванических пар. Несмотря на то, что антибактериальные свойства ионов ряда металлов известны, требуется разработка путей оптимизации кинетики их выхода с целью снижения токсического действия на клетки организма. Другой задачей является поиск путей пролонгации выхода ионов для обеспечения длительного антибактериального эффекта. Бактерицидные свойства материала сформировать, обеспечив образование АФК без ущерба для биосовместимости, однако, их эффективность, скорость генерации, рекомбинации, и факторы, влияющие на эти процессы, изучены недостаточно. Данные о влиянии микрогальванических пар и их способности воздействовать на клетки требуют дополнительного изучения.

Указанные механизмы антибактериальной активности можно изучить, создав наноразмерные частицы металлов на поверхности биосовместимого покрытия, что было обосновано в литературном обзоре (Глава 1). Преимуществом НЧ является их способность обеспечить:

- а) большую площадь контакта с окружающим раствором;
- б) распределение потенциала по поверхности;
- в) низкую концентрацию высвобождаемых бактерицидных агентов.

3.1. Выбор типа частиц металлов

Серебро было выбрано в качестве наиболее распространённого антибактериального элемента, бактерицидные свойства ионов которого широко известны. Ионы Zn также обладают бактерицидной активностью, но их эффективные концентрации значительно выше, чем у ионов Ag.

Известно, что НЧ разнородных металлов на поверхности могут выполнять роль активных катодов или анодов относительно друг друга. Аноды и катоды могут позволить управлять кинетикой выхода ионов в биологическую среду, ускоряя или замедляя процесс растворения НЧ. Цинк обладает низким стандартным электродным потенциалом (-0,8 В), поэтому в присутствии НЧ Zn, растворение НЧ Ag может замедлиться. И, наоборот, в присутствии НЧ Ag растворение НЧ Zn должно ускориться.

Согласно литературным данным, ионы Pt не проявляют бактерицидных свойств в большом диапазоне концентраций, поэтому этот металл был выбран для создания микрогальванических пар на поверхности покрытия TiCaPCON. Условием создания микрогальванических пар является разность потенциалов между НЧ и окружающей матрицей, а Pt обладает высоким стандартным электродным потенциалом (+1,2 В) относительно TiCaPCON. Ионы Fe активно генерируют АФК по реакции Фентона, но самостоятельно ингибируют бактерии лишь при очень большой концентрации. Это стало причиной выбора Fe для создания поверхности, генерирующей АФК. Низкий стандартный электродный потенциал Fe (-0,4 В) позволяет использовать его также для создания микрогальванической пары на поверхности TiCaPCON.

Количество АФК и распределение потенциала зависят от состояния поверхности и распределения НЧ. Отжиг может повлиять на морфологию и количество НЧ из-за ускорения процессов диффузии и изменить состояние поверхности из-за протекания химических реакций и фазовых превращений.

Задача первой части работы заключалась в изучении влияния НЧ Ag и Zn на количество выходящих ионов. Для ее выполнения были получены НЧ Ag и Zn на поверхности TiCaPCON покрытий и изучена кинетика выхода ионов этих металлов. Последовательная имплантация была проведена для изучения влияния комбинации НЧ Ag и Zn на кинетику их растворения.

Вторая часть работы заключалась в обеспечении генерации АФК и создании микрогальванических пар на поверхности. Для этой цели были сформированы НЧ Pt и Fe.

3.2. Анализ микроструктуры покрытий TiCaPCON методом ПЭМ

Наночастицы были сформированы на поверхности многокомпонентного покрытия TiCaPCON. Элементный состав покрытия TiCaPCON составлял: Ti - 43,3, Ca - 1,6, C - 31,5, O - 8,2, N - 15,4 ат.%, по данным ЭДС (рисунок 3.1.)

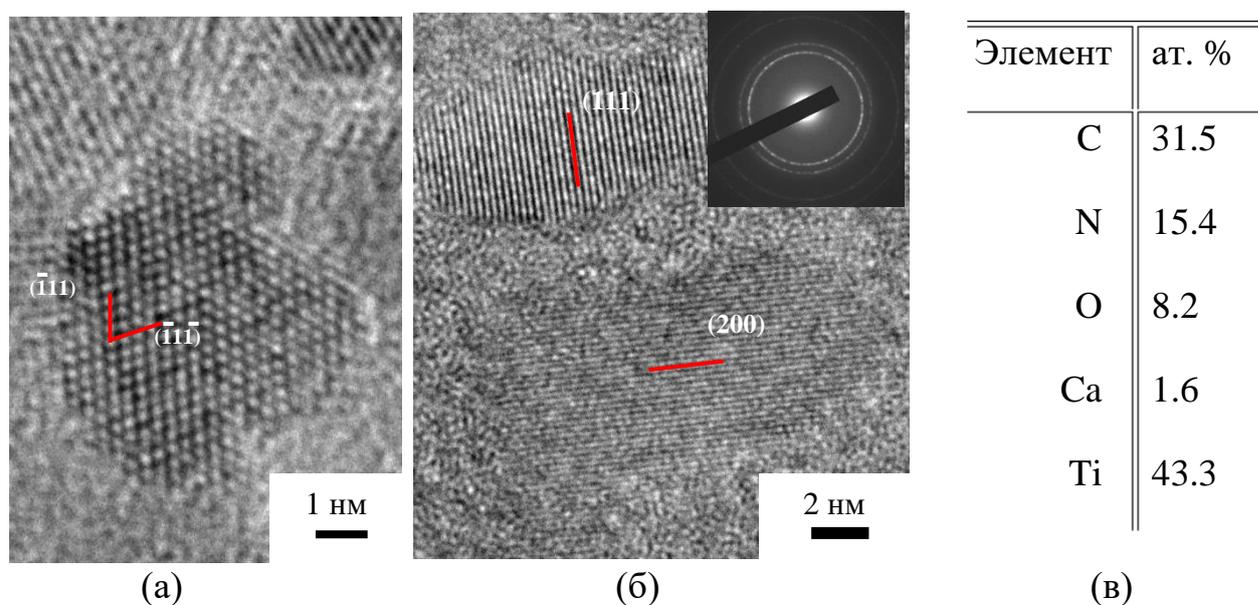


Рисунок 3.1. – Изображения ПЭМВР покрытий TiCaPCON с соответствующей электрограммой (вставка). Элементный состав покрытий по данным ЭДС

Изображения ПЭМВР покрытий TiCaPCON приведены на рисунке 3.4. Покрытия состояли из мелких кристаллитов карбонитрида титана (размером от 6 до 15 нм), расположенных в аморфной матрице. Расстояние между атомными плоскостями совпало с эталонным значениям для фазы Ti(C,N). Электронная дифракция с покрытия также привела к образованию дифракционных колец (111), (200) и (220) от фазы ГЦК Ti(C,N).

3.3. Исследование микроструктуры и состава покрытий методами РЭМ, ЭДС и АСМ после имплантации Ag и Zn

В настоящей работе НЧ металлов создавали на поверхности покрытий методом ионной имплантации. Ионная имплантация привела к образованию тонких слоев покрытия, обогащенных Ag и/или Zn. (рисунок 3.2).

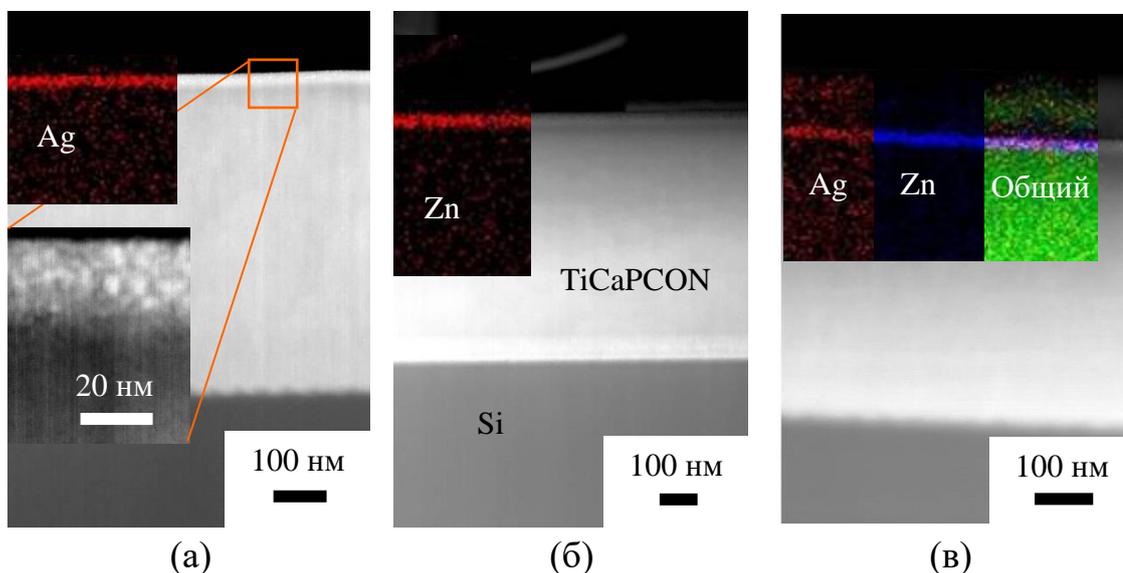


Рисунок 3.2 – РЭМ изображения поперечного сечения и карты ЭДС покрытий TiCaPCON после имплантации (а) Ag, (б) Zn, (в) Ag+Zn

Рисунок 3.2 демонстрирует, что глубина проникновения Ag и Zn при имплантации составила 20–30 нм, а структура имплантированного слоя отличалась от структуры покрытий. Последовательная имплантация Ag и Zn привела к образованию слоя с равномерным распределением этих элементов. На рисунке 3.3 представлены РЭМ изображения поверхности ионномодифицированных покрытий TiCaPCON.

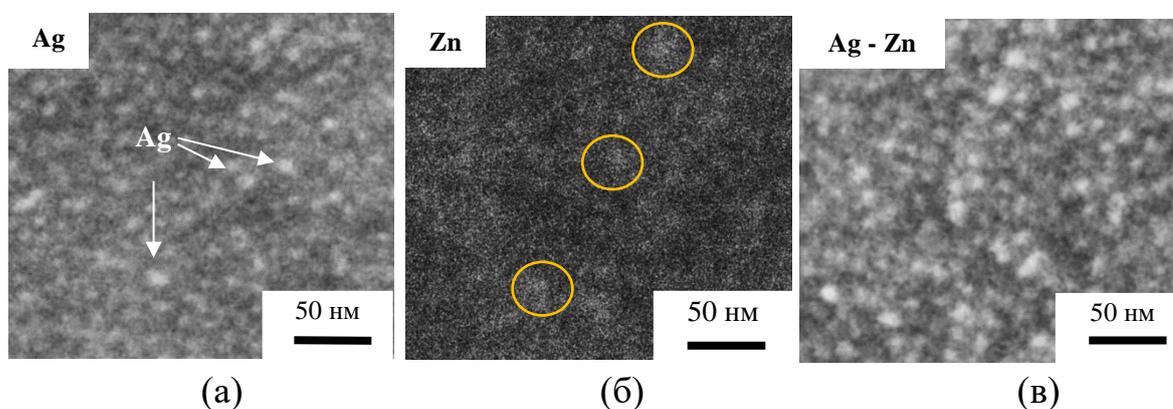


Рисунок 3.3 – Изображения РЭМ поверхности покрытий TiCaPCON после имплантации (а) Ag, (б) Zn и (в) Ag+Zn

Рисунок 3.3а демонстрирует, что имплантированное Ag покрытие имело на своей поверхности НЧ Ag размером 10–15 нм, равномерно распределенные по площади. Покрытие после имплантации Zn имеет на РЭМ изображении (рисунок 3.3б) области с ярким контрастом, которые отнесли к областям агломерации атомов Zn. Имплантация Zn в Ag-содержащее покрытие привела к увеличению среднего размера НЧ до 15–20 нм. Образование НЧ на поверхности после имплантации Ag и Ag+Zn было также подтверждено методом АСМ (рисунок 3.4).

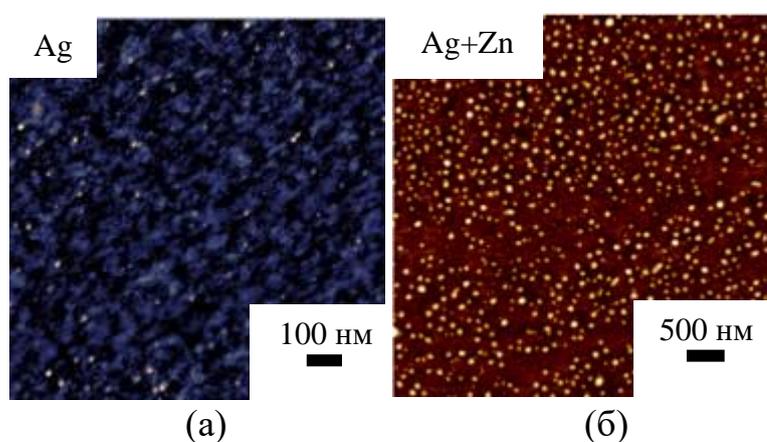


Рисунок 3.4 – Изображения АСМ покрытий TiCaPCON после имплантации ионов (а) Pt и последующего отжига, (б) Ag и (в) Ag+Zn

Рисунок 3.4а демонстрирует, что на имплантированном Ag покрытии, присутствуют НЧ размером 10–20 нм, что согласуется с РЭМ-изображением (рисунок 3.3а). Последующая имплантация Zn в это покрытие привела к увеличению размера и появлению новых НЧ (рисунок 3.4б). Таким образом, методом ионной имплантации удалось сформировать НЧ Ag и комбинацию НЧ Ag и Zn на поверхности покрытий TiCaPCON.

3.4. Изучение состава поверхности и НЧ методами ЭДС и РФЭС

Состояние поверхности является важным параметром, определяющим биоактивность, реакционную способность, коррозионные свойства и антибактериальную активность материала. Выход ионов металлов зависит от

(а) типа агломерации бактерицидной составляющей (Ag, Zn) и (б) ее фазового состояния (сила связи атомов металла в соединении). Целью настоящего раздела являлось изучение состава и химических связей на поверхности имплантированного Ag, Zn и Ag+Zn покрытия TiCaPCON.

Элементный состав методом ЭДС был определен путем анализа наиболее крупных частиц на поверхности покрытия (рисунок 3.5).

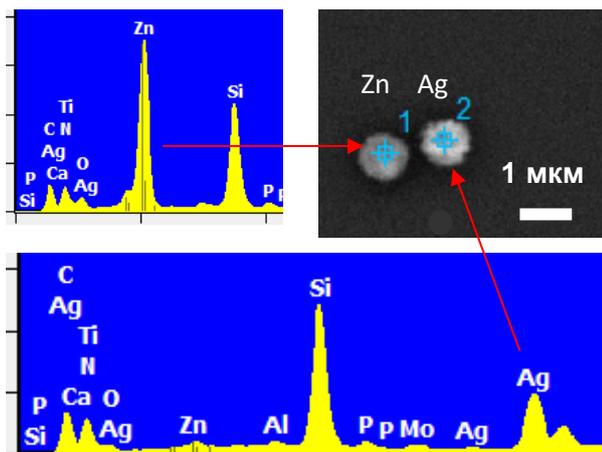


Рисунок 3.5 – Спектры ЭДС с крупных частиц, расположенных на поверхности покрытий TiCaPCON, имплантированных Ag+Zn

Спектры ЭДС покрытия TiCaPCON после имплантации Ag+Zn (рисунок 3.5б) подтвердили присутствие частиц Ag и Zn в виде отдельных фаз. Характерные спектры РФЭС Ti_{2p}, Ag_{3d} и Zn_{2p} покрытий системы TiCaPCON-Ag,Zn представлены на рисунке 3.6. Концентрации компонентов и их энергии связи (ЭС), приведены в таблице 3.1, а элементов в таблице 3.2.

Таблица 3.1 – Процентное содержание различных связей Ti, определенных с помощью аппроксимации кривой РФЭС Ti_{2p}

Образцы	Энергия связи, эВ			
	458.6±0.1	457.2±0.1	455.9±0.1	455.0±0.1
	Ti связи, %			
	TiO ₂	Ti ₂ O ₃	TiN	TiC
TiCaPCON	48,2	17,4	14,8	19,6
TiCaPCON-Ag	68,8	16,1	11,1	3,0
TiCaPCON-Ag-Zn	83,0	12,9	3,7	3,7

Таблица 3.2 – Атомные концентрации элементов по данным РФЭС

Образцы	Концентрация элементов, ат.%						
	Ti	Ca	C	O	N	Ag	Zn
TiCaPCON	12.3	1.5	48.2	29.0	9.1	0.0	0.0
TiCaPCON-Ag	17.3	0.1	33.9	38.5	4.9	5.3	0.0
TiCaPCON-Ag+Zn	13.0	0.2	35.6	37.7	3.0	3.3	7.3

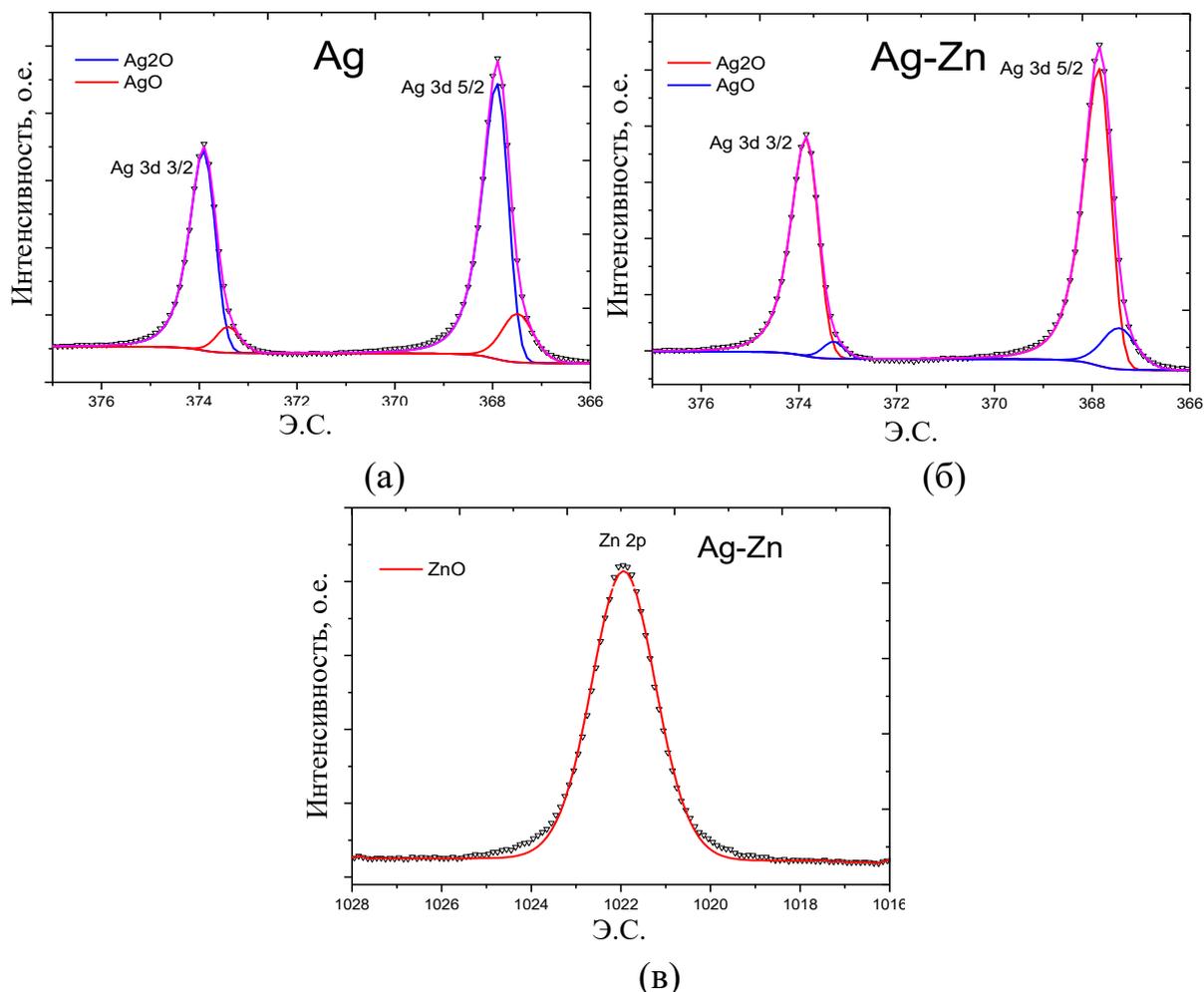


Рисунок 3.6 – Спектры РФЭС (а,б) Ag3d и (в) Zn2p с их аппроксимацией для покрытий (а) Ag и (б,в) Ag+Zn

Концентрация Ag после имплантации составляла 5,2–5,3 ат.%. Последующее введение ионов Zn привело к снижению содержания Ag в верхнем слое до 3,3 ат. % из-за процесса распыления. Сигнал Ti2p был разложен на четыре компонента: TiC, TiN, Ti₂O₃ и TiO₂ (таблица 3.2) [233,234]. Имплантация Ag привела к изменению состояния исходного покрытия – значительному увеличению компонента TiO₂ за счет уменьшения содержания фаз TiC и TiN. Аппроксимация кривой Ag3d (рисунок 3.6,а,б) показала,

серебро находилось в виде Ag_2O (ЭС = 367,8 эВ) и AgO (ЭС = 367,5 эВ). Окисленное состояние НЧ может стать фактором снижения скорости выхода Ag из покрытия. Последующая имплантация Zn привела к дальнейшему увеличению соотношения $\text{TiO}_2/\text{TiN}(\text{TiC})$, связи Ag остались без изменений. Наночастицы Zn , аналогично Ag , находились в оксидной форме ZnO (ЭС = 1022 эВ), согласно спектру $\text{Zn}2p$ (рисунок 3.6,в) образца $\text{Ag}+\text{Zn}$.

Проведенные исследования позволили установить, что:

- а) имплантация приводит к оксидированию поверхности;
- б) НЧ Ag присутствуют на поверхности в виде оксидов AgO и Ag_2O ;
- в) имплантация Zn в образец Ag привела к образованию отдельных НЧ Zn (в форме ZnO) Ag , а также уменьшению содержания Ag ;

3.5 Электрохимические испытания покрытий

Имплантаты находятся в контакте с жидкой средой организма, которая является коррозионной. Высокая коррозионная стойкость покрытия TiCaPCON обеспечивается плотным слоем оксида. Наночастицы на поверхности могут привести к ухудшению коррозионных свойств исходного покрытия из-за образования катодных/анодных областей. Наиболее простым вариантом среды, приближенной к среде организма, является ФР. Целью данного раздела являлось изучение влияния НЧ на электрохимические свойства покрытий TiCaPCON в ФР.

Результатом испытаний являются построенные зависимости потенциала свободной коррозии (ПСК) от времени и анодные потенциодинамические поляризационные кривые (АПП) (рисунок 3.7)

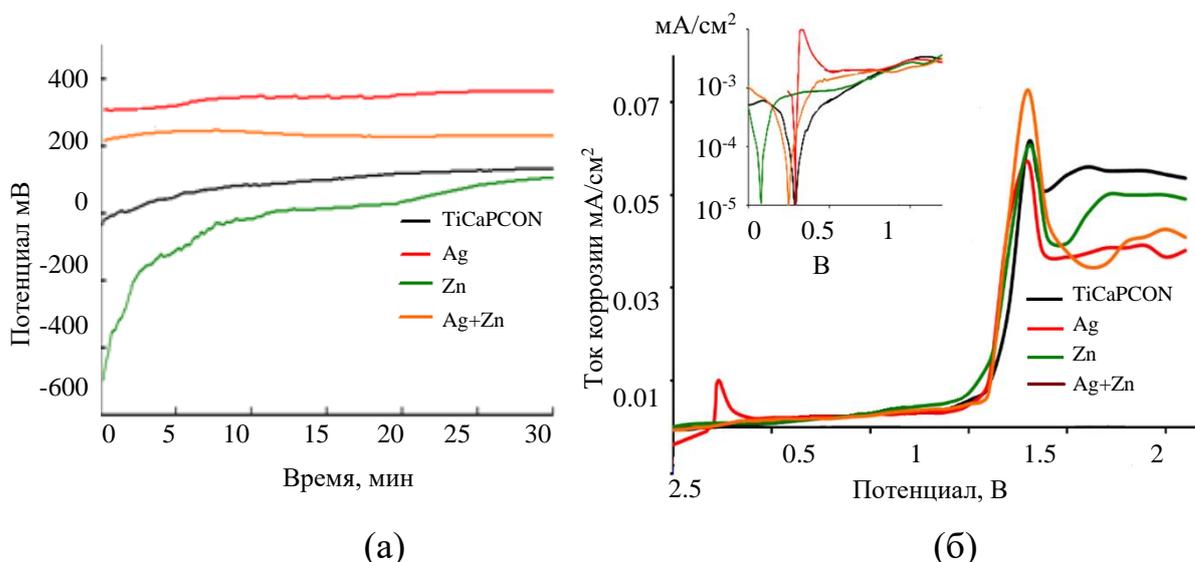


Рисунок 3.7 – (а) Зависимость ПСК от времени и (б) АПП кривые покрытий

Рисунок 3.7а демонстрирует изменения ПСК покрытий, имплантированных Ag и Zn, от времени. В течение 30 мин ПСК покрытия TiCaPCON сместился от -30 до 100 мВ, вероятно, из-за растворения Ca. После формирования пассивной пленки ПСК стабилизировался на уровне около 150 мВ. Значения ПСК других покрытий находились в промежуточных значениях между потенциалами покрытия TiCaPCON и имплантируемых металлов.

(а) Значение ПСК покрытия с Ag, составляло 300 мВ, и было близко к ПСК чистого 99% Ag. В течение 30 мин значение ПСК увеличилось до 350 мВ из-за растворения Ca;

(б) Начальная величина ПСК покрытия с Zn была самой отрицательной (около -600 мВ), но быстро сместилась к ПСК, типичному для TiCaPCON. Вероятной причиной смещения является активное растворение НЧ Zn;

(в) Имплантация Zn в образец с Ag снизило ПСК покрытия до значения 250 мВ, что на 50–100 мВ ниже, чем для Ag-имплантированного образца.

Быстрая стабилизация ПСК покрытия Ag+Zn свидетельствовала о быстром растворении Zn в присутствии Ag в первые минуты испытаний. Разница в значениях ПСК между Ag и Ag+Zn была связана с изменением состава НЧ Ag из-за имплантации Zn.

Стандартные АПП кривые покрытий показаны на рисунке 3.7б. Покрытие TiCaPCON без НЧ находилось в стабильном пассивном состоянии при низких значениях потенциала коррозии. Пик активации при 1,5 В связан с двумя конкурирующими процессами: растворением Ti и образованием защитной оксидной пленки. Пик активации при 0,3 В, который появился после имплантации Ag, характерен для чистого Ag. Это является критерием присутствия металлических НЧ Ag. Полное растворение НЧ Ag вернуло АПП к характерному для образца TiCaPCON поведению. Имплантации Zn в покрытие с Ag привела к полному исчезновению пика активации. Вероятными причинами являются (а) распыление НЧ Ag при имплантации Zn и (б) проникновение Zn в НЧ Ag. Покрытие с НЧ Zn имело самый отрицательный (90 мВ) потенциал нулевого тока (рисунок 3.7б (вставка)), но анодное поведение было аналогично TiCaPCON.

Испытания показали, что:

- а) Zn, вероятно, быстро растворялся с поверхности покрытий Ag+Zn;
- б) имплантация Zn в Ag привела к удалению пика Ag на АПП кривых;
- в) НЧ не снижали коррозионных свойств покрытия TiCaPCON.

3.6. Исследование кинетики выхода ионов металлов

Кинетика выхода бактерицидных ионов важна для антибактериальных свойств материала. Максимальная концентрация бактерицидных ионов должна достигаться в первые часы имплантации, когда существует высокий шанс образования бактериальной пленки. Затем важно пролонгировать выход ионов и поддержать их минимальную эффективную концентрацию для предотвращения адгезии бактерий. Целью раздела являлось изучение кинетики выхода ионов Ag и Zn из покрытий и ее зависимости от комбинации НЧ Ag и Zn (рисунок 3.8).

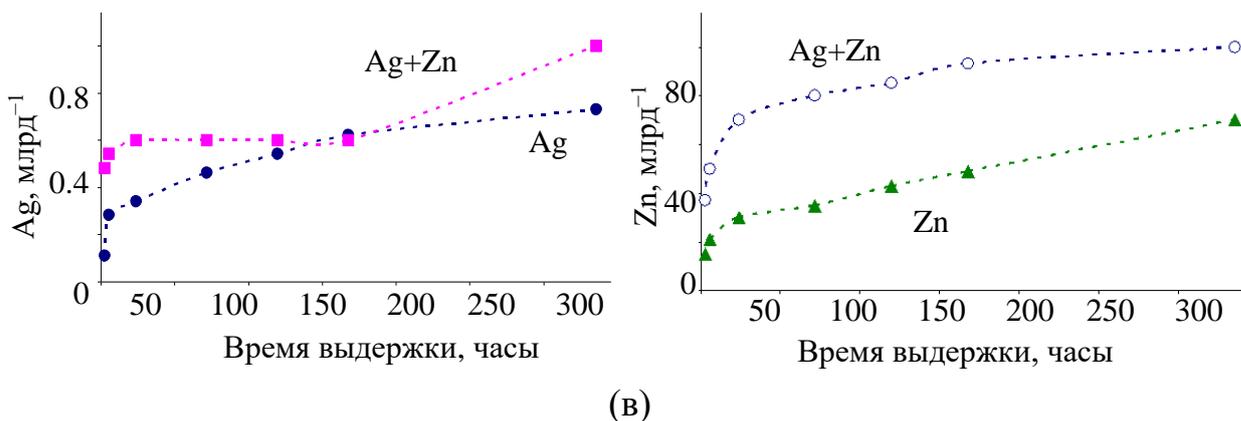


Рисунок 3.8 – Концентрация ионов (а) Ag и (б) Zn, высвобождаемых в ФР с течением времени, по данным МС-ИСП

Рисунок 3.8 демонстрирует зависимость концентрации ионов Ag и Zn в ФР от времени. Максимальная концентрация ионов Ag через 14 дней была низкой и не превышала 1 млрд^{-1} (рисунок 3.8а), а для Zn достигала 100 млрд^{-1} .

Выход ионов в ФР из Ag-содержащего покрытия происходил быстро в первые 12 часов ($0,3 \text{ млрд}^{-1}$), потом резко замедлялся и практически прекращался через 7 дней ($0,7 \text{ млрд}^{-1}$). Имплантация Zn в покрытие с НЧ Ag (образец Ag+Zn) привела к достижению более высоких абсолютных концентраций Ag после 12 часов выдержки ($0,6 \text{ млрд}^{-1}$). Вероятной причиной увеличения концентрации является внедрение Zn в НЧ Ag и его последующее растворение с захватом ионов Ag. Последующие 7 дней Ag практически не выходит из-за катодной защиты Zn. Растворение Zn из НЧ Ag/Zn приводит к вскрытию нижележащих слоев Ag. Катодная защита снимается, что заново активизирует выход ионов Ag, и их концентрация достигает 1 млрд^{-1} .

Низкая концентрация ионов Ag может быть связана с малым содержанием Ag (таблица 3.2) и наличием на поверхности НЧ оксида, который снижает скорость выхода ионов Ag (раздел 3.4). Согласно литературе, существует широкий диапазон концентраций Ag, в которых наблюдается антибактериальный эффект. Однако, малая доза бактерицида необходима для снижения вероятности токсической реакции организма. Если покрытия TiCaPCON-Ag,Zn являются антибактериальными, то низкие концентрации ионов Ag будут благоприятны для биосовместимости материала.

Активный выход ионов Zn происходил в первые 24 часа, а их концентрация достигала 30 (образец Zn) и 70 млрд⁻¹ (образец Ag+Zn) (рисунок 3.8б). Последующие 13 дней концентрация Zn в ФР плавно увеличивалась до 65 и 100 млрд⁻¹ для образцов Zn и Ag+Zn, соответственно. Быстрое увеличение содержания ионов Zn при испытании образца Ag+Zn связано с присутствием НЧ Ag в форме анодов. Это хорошо согласуется с результатами электрохимических испытаний (раздел 3.5), согласно которым Zn более активно растворяется с поверхности образца Ag+Zn.

Таким образом, последовательная имплантация атомов Ag и Zn позволила реализовать интенсивный выход бактерицидных ионов в ФР в первые часы и замедлить выход на протяжении следующих 14 дней.

Результаты экспериментов позволяют сделать следующие заключения:

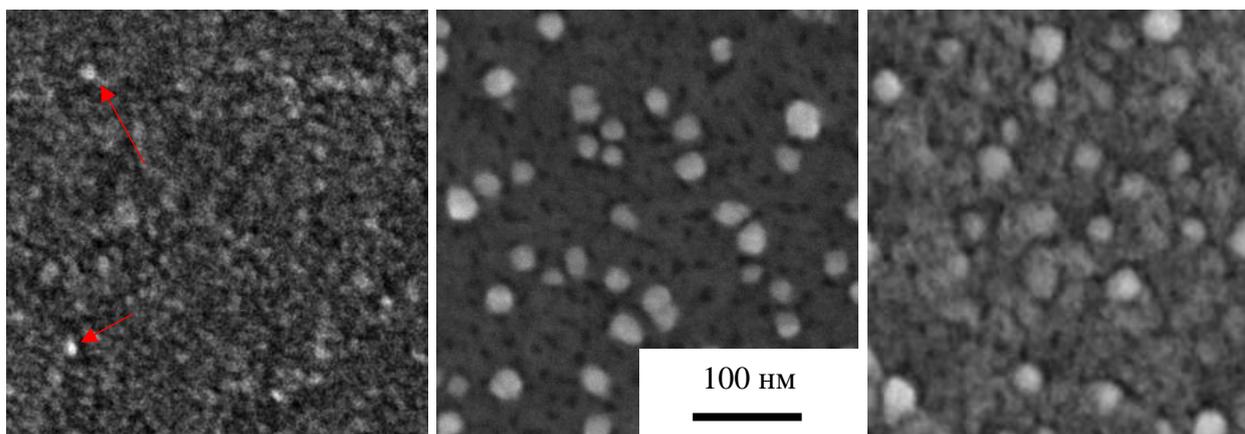
а) низкая концентрация ионов Ag связана с наличием оксида на поверхности НЧ Ag

б) имплантация Zn позволяет изменять кинетику выхода ионов Ag. На начальном этапе растворения выход ионов Ag происходит быстро, а после прекращается из-за катодной защиты со стороны НЧ Zn;

в) Одновременное присутствие НЧ Ag и Zn на поверхности приводит к ускорению растворения Zn, из-за присутствия НЧ Ag в роли анодов.

3.7. Определение размера, морфологии и распределения наночастиц Pt и Fe методом РЭМ

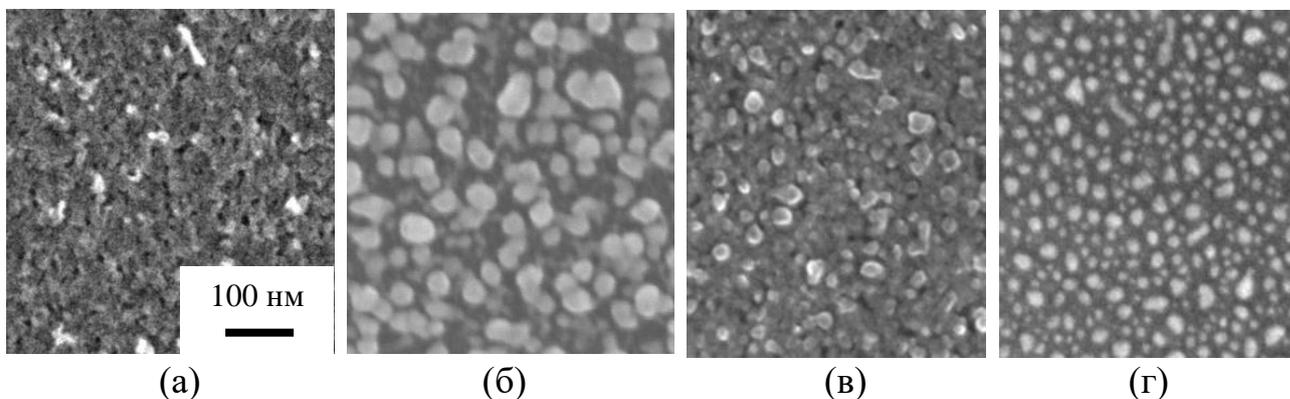
Целью настоящего раздела было создание на поверхности TiCaPCON покрытий НЧ Pt и Fe в различной комбинации и изучение влияния отжига на их размер и распределение.



(а) (б) (в)
 Рисунок 3.9 – Изображения РЭМ образцов TiCaPCON после имплантации (а) Pt, (б) Fe и (в) Pt+Fe

Рисунок 3.9 демонстрирует, что имплантация Fe привела к образованию на поверхности очень малых НЧ, размер которых не превышал 14–16 нм (стрелки рисунок 3.9а). Имплантация Pt привела к образованию НЧ размером 25–35 нм (рисунок 3.9б). Последующая имплантация Fe в образец с НЧ Pt привела к уменьшению размера наночастиц. Размер наиболее крупных наночастиц на образце Pt+Fe составлял 22–32 нм. Уменьшение размера НЧ Pt связано с их частичным распылением в процессе имплантации Fe.

Термическая обработка образцов после имплантации Pt и Fe была направлена на изменение размера, количества и распределения НЧ. Отжиг образцов с двойной имплантацией производился как между имплантациями (рисунок 3.10г), так и после всех этапов имплантации Pt и Fe (рисунок 3.10в).



(а) (б) (в) (г)
 Рисунок 3.10 – Изображения РЭМ имплантированных Pt и Fe образцов после отжига в вакууме (а) Pt_{от}, (б) Fe_{от}, (в) (Pt+Fe)_{от} и (г) Pt_{от}+Fe

На рисунке 3.10 видно, что после отжига Fe локализуется в виде бесформенных наночастиц размером менее 10 нм (рисунок 3.10а). Отжиг образца с Pt в вакууме при 700°C в течение 1 часа привел к увеличению размера НЧ до 30–40 нм и их плотности, по-видимому, за счет диффузии Pt из глубины имплантированного слоя к поверхности (рисунок 3.10б). Аналогичные изменения наблюдались и на образце Pt+Fe после отжига (рисунок 3.10в). Поверхность покрытия Pt_{от}+Fe была густо усеяна небольшими НЧ диаметром 18–20 нм (рисунок 3.10г).

Таким образом, установлено, что

- а) вторичная имплантация приводит к уменьшению ранее сформированных НЧ за счет их частичного распыления;
- б) термическая обработка позволяет изменять размер, плотность и распределение НЧ на поверхности.

3.8. Смачиваемость и коррозионные свойства покрытий в физиологическом растворе

Наличие НЧ и термическая обработка изменяют морфологию и химические связи поверхности, что может стать причиной изменения гидрофильности и коррозионного поведения материала. Целью данного раздела являлось изучение влияния НЧ и отжига на смачиваемость и коррозионные свойства покрытий в физиологическом растворе.

Смачиваемость покрытий изучали через 2 недели хранения образца в пластиковых пакетах, а краевой угол смачивания измеряли в течение 10 мин с интервалом 5 мин (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Значения угла смачивания образцов с течение времени

Образцы	Угол контакта, °		
	0 мин	5 мин	10 мин
TiCaPCON	74±2	44±1	13±1
Pt	97±2	73±1	23±2
Pt _{от}	90±1	62±2	19±1

Продолжение таблицы 3.3

Fe	90±1	61±2	15±2
Fe _{от}	82±2	54±1	16±1
Pt+Fe	91±2	70±1	28±1
(Pt+Fe) _{от}	94±1	71±1	26±2
Pt _{от} +Fe	89±3	70±2	29±2

Покрытие TiCaPCON без НЧ продемонстрировало угол смачивания около 73°. После ионной имплантации краевой угол смачивания (КУС) увеличился до 81-90°. Со временем капли медленно растекались по поверхности, КУС снижался до 55-70° в течение 5 мин и до 15-29° через 10 минут. Образец с НЧ Fe после отжига имел наиболее гидрофильную поверхность.

Электрохимические исследования проводили в условиях, обеспечивающих максимальную защиту НЧ от растворения. Для этого начальный потенциал записи поляризованных кривых был выбран равным -0,3 В, а скорость развертки потенциала была увеличена до 10 мВ/с. Кроме того, были записаны поляризационные кривые с обратной разверткой потенциала от значений максимальной развертки анодного потенциала (+1,7 В) до начального потенциала (-0,3 В). Это помогло определить вклад пассивного оксидного слоя на поверхности TiCaPCON, в общую кинетику растворения НЧ. Результаты измерений приведены на рисунках 3.11 и 3.12

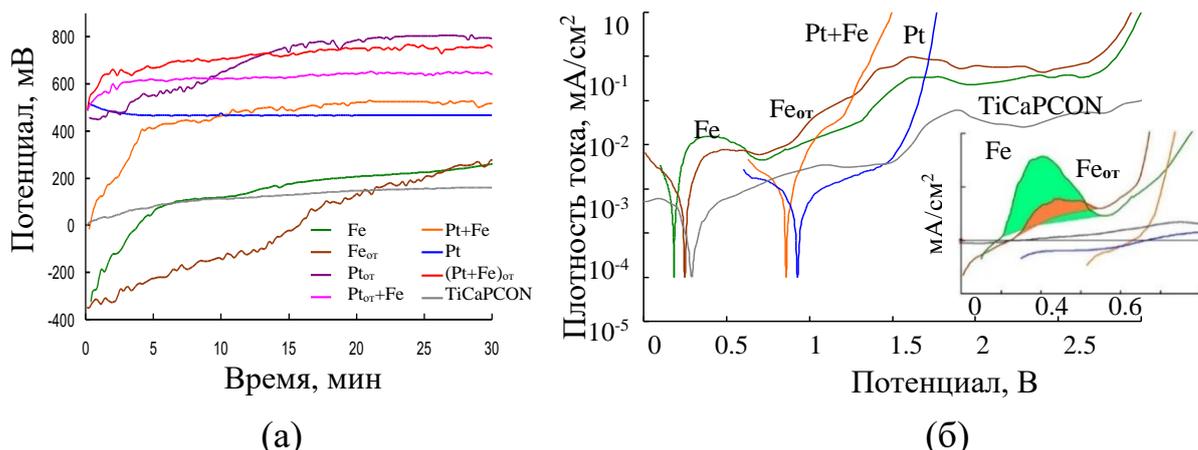


Рисунок 3.11 – (а) Зависимость ПСК от времени и (б) АПП кривые покрытий, полученные при скорости развертки 3 мВ/с. На вставке показаны начальные участки поляризованных кривых. Области пиков плотности тока, соответствующие окислению НЧ Fe, показаны цветом

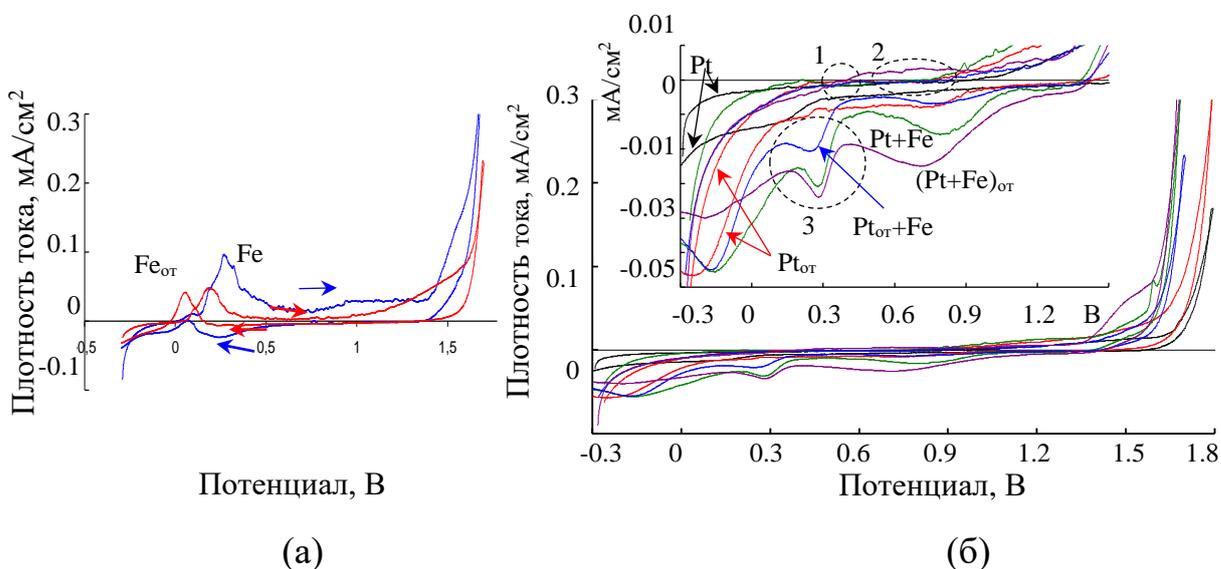


Рисунок 3.12 – АПП кривые, полученные при скорости развертки потенциала 10 мВ/с, для покрытий (а) Fe и Fe_{от} (б) Pt, Pt+Fe, Pt_{от}+Fe и (Pt+Fe)_{от}. На вставке указаны диапазоны потенциалов нулевых плотностей тока для (Pt+Fe) пленки (1), всех остальных пленок (2), а также пики плотности тока легированных Fe пленок на кривых с разверткой обратного потенциала (3)

Изменение потенциала свободной коррозии дает информацию о растворении менее стабильных элементов покрытия и пассивации поверхности, связанной с образованием оксидных слоев. Изменение потенциала свободной коррозии покрытия во времени показано на рисунке 3.11а. В течение 30 мин потенциал покрытия TiCaPCON смещался от

начального значения +30 мВ до +150 мВ, что связано с быстрым растворением Са и Р и пассивацией поверхности.

Имплантация Fe привела к снижению начального потенциала до значения –320 мВ, который близок к потенциалу чистого Fe. В последующие 10 мин потенциал возрастает до +110 мВ, что связано с активным растворением НЧ Fe. После этого, в течение 20 минут, потенциал медленно повышается до +250 мВ и становится на 100 мВ положительнее потенциала покрытия TiCaPCON без НЧ. Это связано с окислением НЧ Fe, поскольку оксиды Fe имеют потенциалы положительнее потенциалов оксидов Ti.

Потенциал покрытия Pt быстро стабилизировался на уровне +450 мВ, что соответствует промежуточному значению между потенциалом чистой Pt (+990 мВ) и потенциалом TiCaPCON. Имплантация Fe в образец с Pt (образец Pt+Fe) привела к снижению начального потенциала до 0 В, который затем в течение 10 мин увеличился до +500 В и стал немного выше, чем у покрытия с НЧ Pt. Вероятно, низкий начальный потенциал связан с наличием НЧ Fe. После их растворения оставшиеся НЧ Pt обеспечивают потенциал близкий к образцу Pt. Разница в 50 В является следствием уменьшения среднего размера НЧ Pt и увеличения их удельной площади из-за имплантации Fe (рисунок 3.9г).

После отжига образца с Fe наблюдалось равномерное увеличение потенциала со временем, вероятно, из-за более медленного растворения Fe из оксидов. Потенциал покрытия с Pt после отжига сместился к значению +800 мВ, из-за уменьшения размера и увеличения удельной площади растворения НЧ (рисунок 3.10в). Потенциалы покрытий $(Pt+Fe)_{от}$ и $Pt_{от}+Fe$ находятся в диапазоне от +550 до +750 мВ и определяются потенциалом НЧ Pt. Быстрое растворение НЧ Fe под влиянием Pt (как показано в разделе 3.6) привело к тому, что НЧ Fe не повлияли на характер изменения потенциала со временем. Различие в изменении ПСК от времени для образцов $(Pt+Fe)_{от}$ и $Pt_{от}+Fe$ на рисунке 3.11а связано с размером, количеством и химическим состоянием оставшихся НЧ Pt, а также их активностью.

Рисунок 3.11б демонстрирует стандартные АПП кривые покрытий. Покрытие TiCaPCON находилось в стабильном пассивном состоянии, а при 1,5 В присутствовал пик активации, связанный с растворением Ti и изоляцией поверхности оксидом. Кривые АПП покрытий с Pt показали типичное поведение металлической Pt – рост плотности тока (1,5 В) и отсутствие пассивации из-за электролиза воды и выделения O₂. Имплантация Fe в покрытие Pt привела к ускорению анодных процессов из-за изменения химического состояния поверхности и растворения ионов Fe, увлекающих часть ионов Pt. Кривая АПП покрытия с Fe при потенциале +0,3 В имела типичный пик плотности тока Fe, свидетельствующий о его окислении. Отжиг привел к уменьшению площади пика плотности тока Fe (рисунок 3.11б), что связано с уменьшением доли металлического (неокисленного) Fe. После растворения Fe, вид кривых АПП покрытий Fe и Fe_{от} аналогичен зависимости АПП от времени для образца TiCaPCON. Однако, плотности анодного тока для образцов с Fe были выше, что свидетельствует о незначительном уменьшении защитных свойств слоя оксида Ti в присутствии продуктов окисления Fe.

На рисунке 3.12а показаны кривые АПП покрытий с Fe, полученные при увеличенной скорости развертки потенциала. Кривые имели следующие отличия от кривых, представленных на рисунке 3.11б:

- Потенциал нулевого тока покрытий Fe_{от} был смещен в отрицательную сторону, что указывает на сохранение большего количества НЧ Fe;

- Покрытия Fe_{от} и Fe имели характерные пики плотности тока при потенциалах от 0,3 до 0,4 В, что, вероятно, связано с окислением НЧ Fe.

Кривые плотности тока, полученные при обратной развертке анодного потенциала от +1,5 до +0,5 В, показали очень низкие значения плотности тока, что связано с высоким качеством пассивного слоя на свободных от НЧ Fe участках покрытия TiCaPCON. Кривая покрытия с НЧ Fe при обратной развертке потенциала имела пик плотности тока с отрицательной полярностью, который связан с частичным восстановлением Fe₂O₃ до FeO_x.

На рисунок 3.12б показаны кривые АПП для покрытий Pt, Pt+Fe, Pt_{от}+Fe и (Pt+Fe)_{от}, которые были получены при скорости развертки потенциала 10 мВ/с. Кривые начальной плотности тока похожи для всех покрытий. Потенциалы нулевого тока для всех исследованных образцов, кроме (Pt+Fe)_{от}, находятся в диапазоне от +0,5 до +0,9 В (рисунок 3.12б, область 2), что связано с наличием НЧ Pt. Нулевой рабочий потенциал образца (Pt+Fe)_{от} смещен к значению +0,35 В (рисунок 3.12б, область 1). Резкий рост плотности тока для всех покрытий с Pt при потенциалах положительнее +1,5 В, связан с диссоциацией воды и выделением O₂. Низкая плотность тока при потенциалах менее +1,5 В соответствовала пассивному состоянию покрытия TiCaPCON. При отрицательных значениях потенциала катодная плотность тока всех покрытий, легированных Pt, увеличивалась из-за выделения водорода.

Кривые обратной развертки покрытий с Fe имеют пики плотности тока в диапазоне от +0,3 до +0,2 В (рисунок 3.12б, область 3), которые свидетельствуют о восстановлении Fe₂O₃ до FeO_x. Этот результат важен для понимания распределения потенциала на поверхности образца после выдержки в ФР. Часть НЧ Fe растворяется и выщелачивается в ФР в виде ионов, а другая часть НЧ Fe окисляется до оксида Fe и остается на поверхности покрытия. Электрохимический потенциал этих НЧ соответствует значению +0,3 В, что положительнее потенциала покрытия TiCaPCON (+0,15 В).

По результатам исследований можно сделать следующие заключения:

- а) отжиг влияет на ПСК покрытий и скорость растворения НЧ;
- б) только часть НЧ Fe растворяется, остальная часть остается в виде оксидов с потенциалом отличным от TiCaPCON;
- в) НЧ не ухудшают коррозионной стойкости TiCaPCON покрытия.

3.9. Исследование твердости и адгезионной прочности покрытий TiCaPCON

Имплантация металлов в верхние слои покрытия может привести к изменению его твердости и адгезионной прочности из-за увеличения количества дефектов. Целью настоящего раздела являлась измерение твердости и адгезионной прочности покрытий до и после имплантации Pt и Fe.

Твердость и адгезионную прочность покрытий оценивали методом измерительного наноидентирования и царапания, соответственно. Результаты измерений приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 Результаты механических испытаний покрытий

Покрытие	H, ГПа	E, ГПа	W _e , %	L _{c1} , Н	L _{c3} , Н
TiCaPCON	28±1,8	232±13	82,3	2,8	11,8
Pt	24±2,8	211±22	73,3	2,2	7,3
Pt+Fe	23±2,1	216±25	74,6	5,3	24,4

Примечание – L_{c1} – нагрузка, приводящая к возникновению первой трещины; L_{c3} – нагрузка, при которой появляется материал подложки (истирание или отслоение).

Результаты механических испытаний демонстрируют, что как имплантация Pt, так и последующая имплантация Fe приводят к незначительному снижению твердости, модуля Юнга и упругого восстановления покрытия. Твердость покрытий снижается с 28 ГПа до 24 и 23 ГПа, модуль упругости с 232 ГПа до 211 и 216 ГПа, а упругое восстановление с 82,3 до 73,3 и 74,6 % для покрытий Pt и Pt+Fe, соответственно.

Разрушение всех покрытий при царапании происходит по когезионному механизму без адгезионного отслоения. Когезионная прочность покрытий зависит от типа имплантированного металла. Нагрузка, которая приводит к появлению первых шевронных трещин (L_{c1}), снижается с 2,8 до 2,2 Н после имплантации Pt. Последующая имплантация Fe повышает критическую

нагрузку L_{c1} до 5,3 Н, что в два раза выше, чем для исходного покрытия TiCaPCON. Подложка появляется в результате пластичного истирания покрытия (L_{c3}) при нагрузках 11,8 (TiCaPCON), 7,3 (Pt) и 24,4 Н (Pt+Fe).

3.10. РФЭС анализ поверхности образцов после отжига

Целью настоящего раздела было изучение химических связей на поверхности покрытий с НЧ до и после термической обработки.

Химические связи на поверхности покрытий и атомные концентрации всех элементов (таблица 3.5) определяли методом РФЭС. Оценка химических связей до и после отжига проводилась для следующих элементов: C1s (рисунок 3.13), N1s (рисунок 3.14), O1s (рисунок 3.15), Ti2p (рисунок 3.16), Pt4f (рисунок 3.17).

Таблица 3.5. Атомные концентрации элементов до и после отжига (РФЭС)

Образец	Концентрация, at. %							
	C1s	Ca2p	Fe2p	N1s	O1s	P2p	Pt4f	Ti2p
Fe	46,13	0,00	11,90	1,99	36,10	0,00	0,00	3,87
Fe _{an}	58,75	0,37	0,63	7,66	20,80	0,00	0,00	11,80
Pt	39,11	0,17	0,00	1,88	35,50	0,00	9,23	14,10
Pt _{an}	58,61	0,35	0,00	4,30	16,27	1,80	12,71	5,95
Pt+Fe	40,25	0,24	4,20	2,23	33,24	0,00	7,47	12,38
(Pt+Fe) _{an}	78,92	0,14	0,00	5,84	9,07	0,00	0,30	5,72
Pt _{an} +Fe	42,39	0,25	3,43	3,10	31,69	0,00	7,76	11,38

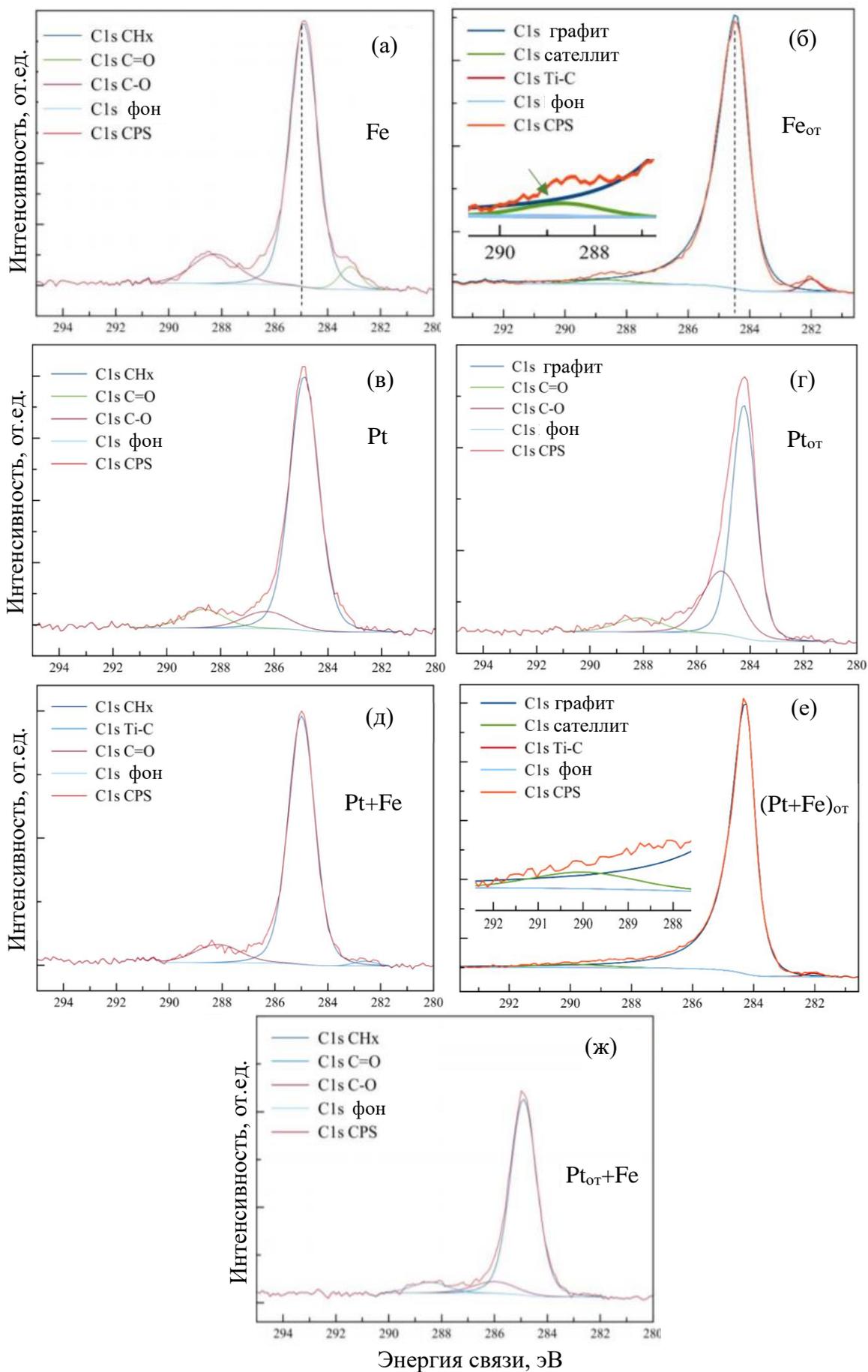


Рисунок 3.13 – Спектры РФЭС C1s (а-ж) и их аппроксимация до (а,в,д) и после (б,г,е,ж) отжига

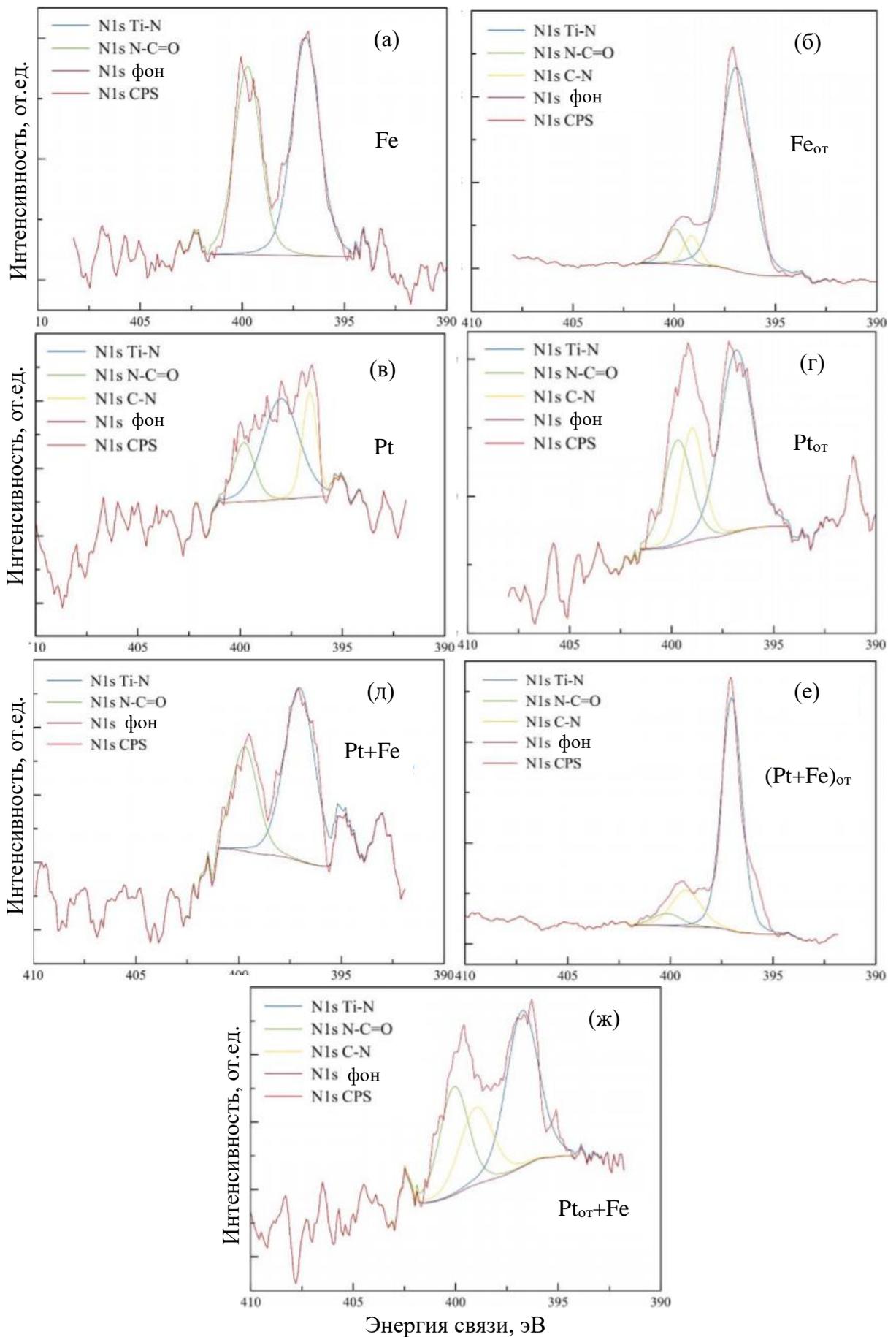


Рисунок 3.14 – Спектры РФЭС N1s (а-ж) и их аппроксимация до (а,в,д) и после (б,г,е,ж) отжига

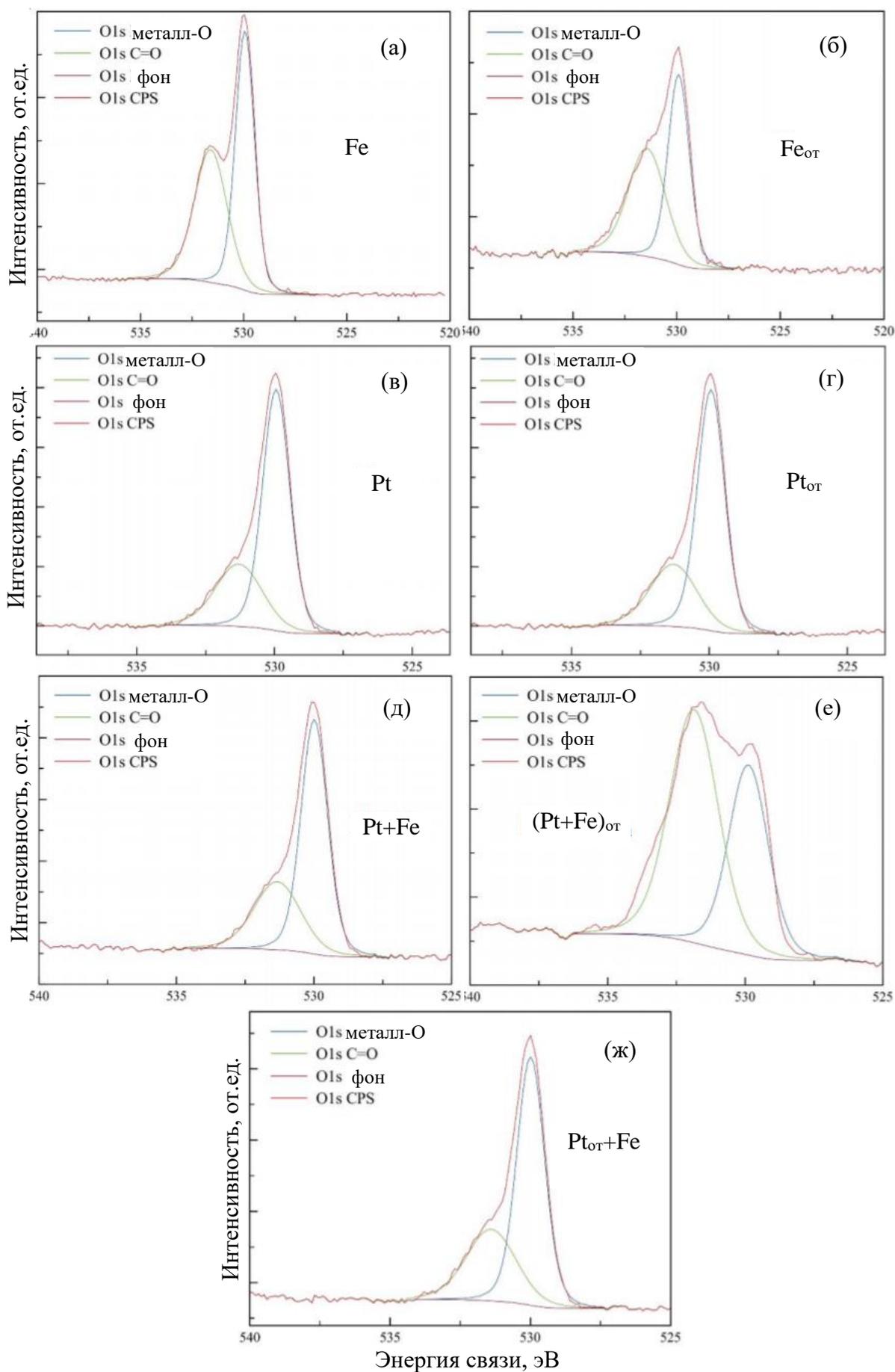


Рисунок 3.15 – Спектры РФЭС O1s (а-ж) и их аппроксимация до (а,в,д) и после (б,г,е,ж) отжига

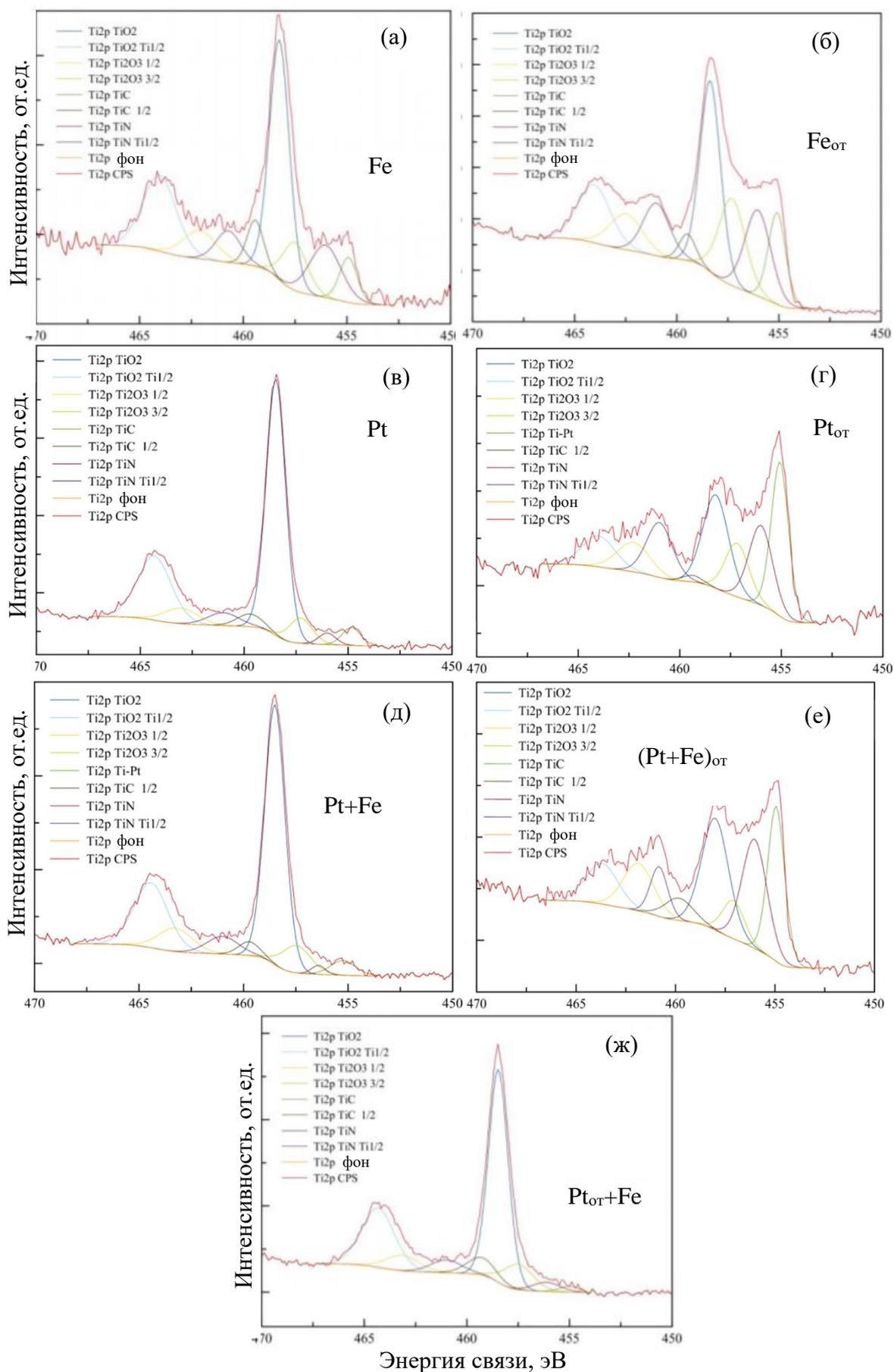


Рисунок 3.16 – Спектры РФЭС Ti_{2p} (а-ж) и их аппроксимация до (а,в,д) и после (б,г,е,ж) отжига

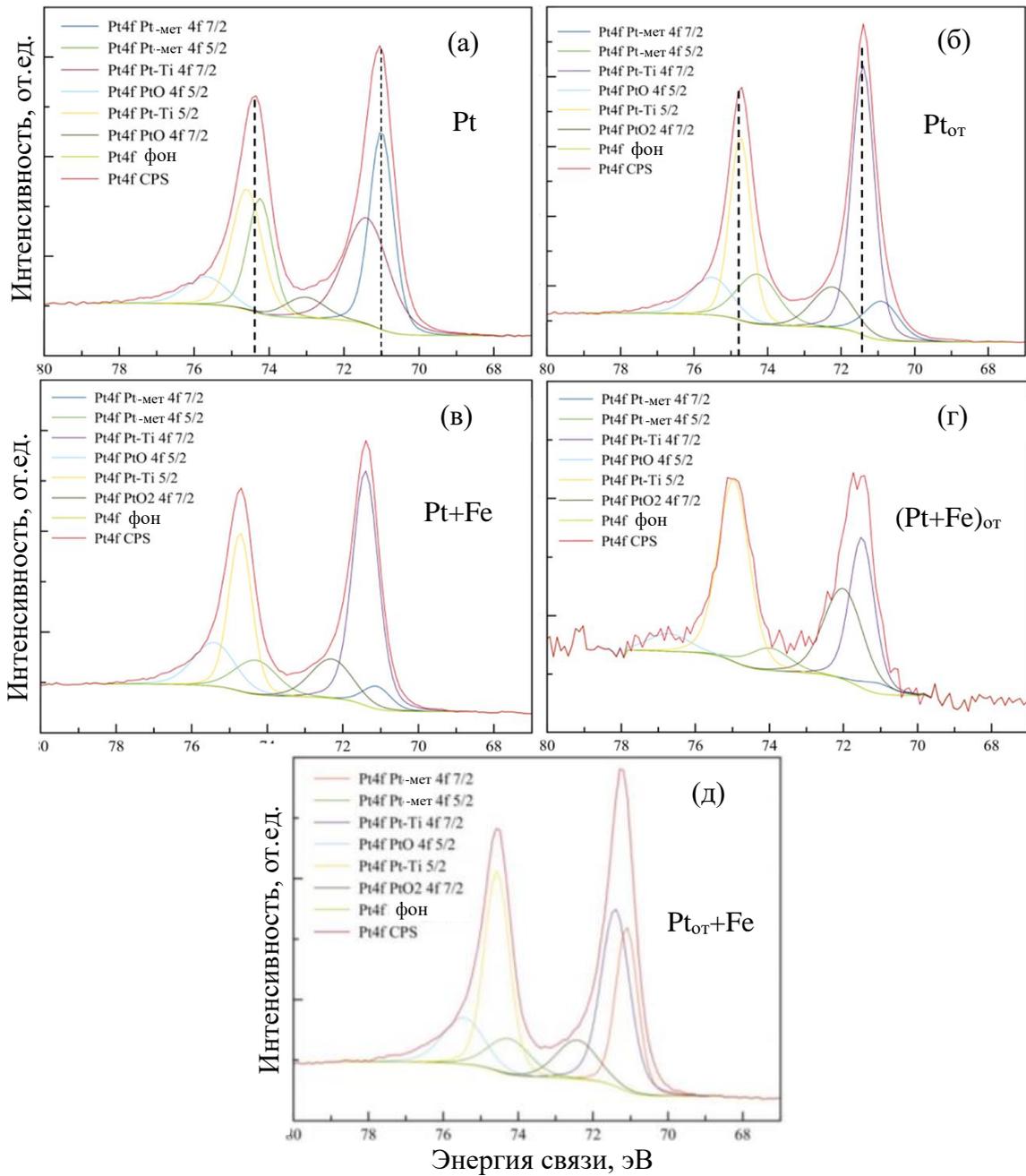


Рисунок 3.17 – Спектры РФЭС Pt4f (а-д) и их аппроксимация до (а,в) и после (б,г,д) отжига

Спектры C1s РФЭС высокого разрешения образцов Fe, Pt, Pt_{от}, Pt+Fe и Pt_{от}+Fe были разложены с использованием трех компонентов:

(а) аморфного углерода (фазы a-CH_x и a-C (x = 0) имеют значение ЭС ≈ 285 эВ, полуширина пика (fwhm) = 1,35 ± 0,1 эВ);

(б) C=O (ЭС = 288,1 ± 0,2 эВ, fwhm ≈ 2 эВ)

(в) C–O (ЭС = 286,4 ± 0,2 эВ, fwhm = 1,5 ± 0,2 эВ);

Связь Ti-C ($\text{ЭС} = 282 \pm 0,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm} = 1,0 \pm 0,1 \text{ эВ}$) присутствовала в покрытии Pt+Fe до отжига и в образцах $\text{Fe}_{\text{от}}$ и $(\text{Pt+Fe})_{\text{от}}$ после отжига. Некоторые образцы, имплантированные Pt и Fe, после отжига ($\text{Pt}_{\text{от}}$, $(\text{Pt+Fe})_{\text{от}}$ и $\text{Fe}_{\text{от}}$) имели характерный пик C-C (графит) при 284,4 эВ (рисунок 3.13б,г,е). Асимметричная форма пика с сателлитом при больших значениях ЭС характерна для всех углеродных материалов со структурой графита [235]. Сателлит хорошо виден при $\text{ЭС} = 290\text{--}292 \text{ эВ}$ на вставке рисунков 3.13б,е. Отсутствие графита в покрытии $\text{Pt}_{\text{от}}+\text{Fe}$ связано с распылением тонкого верхнего слоя во время имплантации Fe. Образование графитовой фазы было также подтверждено спектроскопией КР (рисунок 3.18).

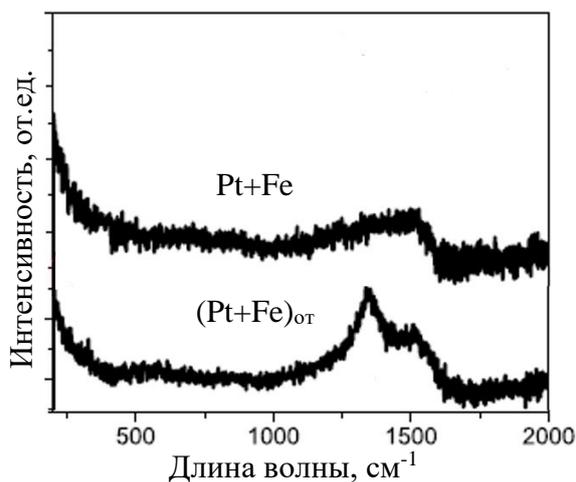


Рисунок 3.18 – Спектры КР образцов Pt+Fe и $(\text{Pt+Fe})_{\text{от}}$

На рисунке 3.18 сравниваются спектры КР образцов Pt+Fe и $(\text{Pt+Fe})_{\text{от}}$. Оба спектра имели две характерные особенности, которые связаны с взаимным колебанием атомов углерода sp^2 (пик G) и колец графита (пик D). Видно, что после отжига пик G сместился с 1480 до 1515 см^{-1} , а интенсивность пика D значительно увеличилась, что указывает на превращение углерода в нанокристаллический графит во время отжига [234]

Перед отжигом покрытий Fe и Pt+Fe в их спектрах N1s РФЭС было обнаружено два компонента: TiN ($\text{ЭС} \approx 397 \text{ эВ}$, $\text{fwhm} = 1,7 \pm 0,2 \text{ эВ}$) и N-C=O ($\text{ЭС} = 399,9 \pm 0,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm} = 1,5 \pm 0,2 \text{ эВ}$) (рисунок 3.14). Отжиг (образцы $\text{Fe}_{\text{от}}$ и $(\text{Pt+Fe})_{\text{от}}$) привел к значительному уменьшению вклада компонента N-C=O.

На РФС N1s спектре образца Pt присутствует дополнительная компонента C-N ($\text{ЭС} = 399,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm} = 1,6 \text{ эВ}$). После термообработки на спектрах N1s покрытий присутствуют сигналы всех трех компонентов (TiN, C-N и N-C=O).

Спектры O1s РФЭС были разложены на два компонента: M-O (M=металл) при $\text{ЭС} = 530,2 \pm 0,2 \text{ эВ}$ и $\text{fwhm} = 1,4 \pm 0,2 \text{ эВ}$ и C=O при $\text{ЭС} = 532,4 \pm 0,3 \text{ эВ}$ и $\text{fwhm} = 1,8 \pm 0,2 \text{ эВ}$ (рисунок 3.15). Отжиг привел к изменению соотношения M-O/C=O только для образца (Pt+Fe)_{от} (рисунок 3.15е).

Спектры РФЭС Ti2p образцов с Pt и Fe до и после отжига показаны на рисунке 3.16. Кривые можно описать суммой четырех компонентов:

(а) TiO₂ - основной компонент ($\text{ЭС}_{3p\ 3/2} = 458,5 \pm 0,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm}_{3p\ 3/2} = 1,3 \pm 0,1 \text{ эВ}$; $\text{ЭС}_{3p\ 1/2} = 464,1 \pm 0,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm}_{3p\ 1/2} = 1,8 \pm 0,1 \text{ эВ}$);

(б) Ti₂O₃ ($\text{ЭС}_{3p\ 3/2} = 457,3 \pm 0,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm}_{3p\ 3/2} = 1,5 \pm 0,1 \text{ эВ}$; $\text{ЭС}_{3p\ 1/2} = 462,5 \pm 0,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm}_{3p\ 1/2} = 1,8 \pm 0,1 \text{ эВ}$);

(в) карбид титана - TiC ($\text{ЭС}_{3p\ 3/2} = 455,1 \pm 0,1 \text{ эВ}$, $\text{fwhm}_{\text{ЭС}_{3p\ 3/2}} = 1,1 \pm 0,1 \text{ эВ}$; $\text{ЭС}_{3p\ 1/2} = 459,5 \pm 0,1 \text{ эВ}$, $\text{fwhm}_{\text{ЭС}_{3p\ 1/2}} = 1,1 \pm 0,1 \text{ эВ}$);

(г) нитрид титана TiN ($\text{ЭС}_{3p\ 3/2} = 456,0 \pm 0,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm}_{3p\ 3/2} = 1,5 \pm 0,1 \text{ эВ}$; $\text{ЭС}_{3p\ 1/2} = 461,0 \pm 0,2 \text{ эВ}$, $\text{fwhm}_{3p\ 1/2} = 1,5 \pm 0,1 \text{ эВ}$).

Пики TiN и TiC были наиболее интенсивны в спектре покрытия с Fe. Это значит, что его поверхность менее окислена, чем у образцов с Pt. Увеличение интенсивности пиков TiN и TiC в спектрах Ti2p покрытий Fe_{от}, Pt_{от} и (Pt+Fe)_{от} свидетельствует о том, что наличие НЧ делает поверхность TiCaPCON менее окисленной после отжига. Имплантация Fe в образец Pt_{от} привела к значительному ослаблению интенсивности пиков TiN и TiC, что говорит о повторном окислении поверхности TiCaPCON покрытий.

Связи Pt оценивали путем аппроксимации спектров Pt4f_{7/2} и Pt4f_{5/2} (рисунок 3.17). Спектры раскладывали на три компонента: Pt ($\text{ЭС}_{4f\ 7/2} = 71,0 \pm 0,1 \text{ эВ}$ $\text{fwhm}_{4f\ 7/2} = 1,0 \pm 0,1 \text{ эВ}$; $\text{ЭС}_{4f\ 5/2} = 74,2 \pm 0,1 \text{ эВ}$ $\text{fwhm}_{4f\ 5/2} = 1,1 \pm 0,1 \text{ эВ}$), Pt-Ti ($\text{ЭС}_{4f\ 7/2} = 71,5 \pm 0,1 \text{ эВ}$ $\text{fwhm}_{4f\ 7/2} = 0,9 \pm 0,1 \text{ эВ}$; $\text{ЭС}_{4f\ 5/2} = 74,7 \pm 0,1 \text{ эВ}$ $\text{fwhm}_{4f\ 5/2} = 1,0 \pm 0,1 \text{ эВ}$) и оксид Pt (PtO, $\text{ЭС}_{4f\ 7/2} = 73,0 \text{ эВ}$ $\text{fwhm}_{4f\ 7/2} = 1,2 \text{ эВ}$; $\text{ЭС}_{4f\ 5/2} = 75,7 \text{ эВ}$ $\text{fwhm}_{4f\ 5/2} = 1,1 \pm 0,1 \text{ эВ}$). После отжига спектры Pt4f_{5/2} и Pt4f_{7/2}

сместились на 0,4 эВ в сторону более высокой ЭС, а интенсивность пиков Pt-Ti и PtO увеличилась (образец Pt_{от}). Подобный сдвиг характерен для бинарных покрытий Pt/Ti после отжига и связан с образованием фазы TiPt₃ [237]. Также на поверхности обнаружена фаза PtO₂ (ЭС_{4f5/2} = 76,4 эВ, fwhm_{4f5/2} = 1,3 эВ). Последующая имплантация Fe в покрытие Pt_{от} изменила только соотношение интенсивности пиков. Спектр РФЭС Pt4f образца Pt+Fe до отжига имел сильный пик от соединения PtTi_x с небольшим вкладом металлических фаз Pt, PtO и PtO₂. Отжиг привел к увеличению интенсивности сигналов от PtO и PtO₂.

После ионной имплантации покрытия TiСаPCON содержали 11,9 ат.% Fe и 9,2 ат.% Pt (таблица 3.4). Суммарное содержание имплантированных элементов в образце Pt+Fe составило 11,6 ат.%. Отжиг образцов Fe и Pt+Fe снизил концентрацию Fe до 0,63 ат.% в образце Fe_{от}, а в образце (Pt+Fe)_{от} концентрации Fe и Pt до 0,0 и 0,3 ат.%, соответственно. Содержание Pt после отжига образца Pt увеличилось до 12,7 ат.%. Дальнейшая имплантация ионов Fe снизила содержание Pt до 7,8 ат.% из-за распыления НЧ Pt ионами Fe, что подтверждает данные раздела 3.7. Содержание O во всех образцах после отжига снизилось: с 36,1 (Fe) до 20,8 (Fe_{от}), с 35,5 (Pt) до 16,3 (Pt_{от}) и с 33,2 (Pt+Fe) до 9,1 ат.% ((Pt + Fe)_{от}). Оценить вероятность образования PtTi_x и его стехиометрию можно исходя из анализа диаграммы Pt-Ti (рисунок 3.19)

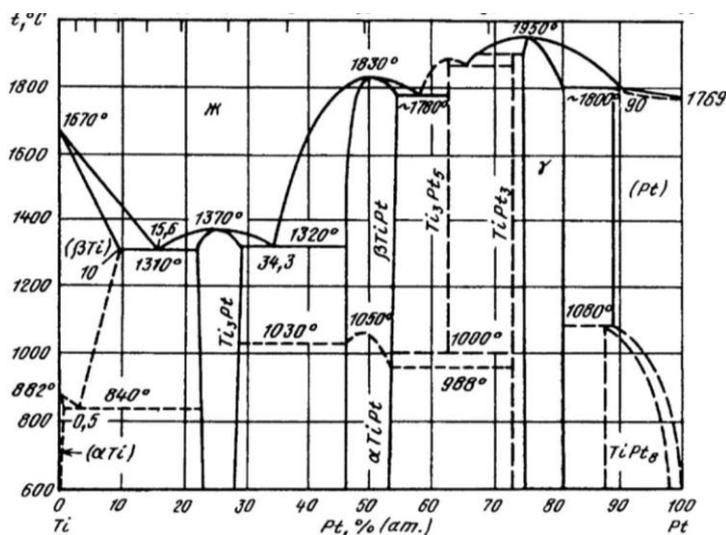


Рисунок 3.19 – Диаграмма состояния двойной системы Ti-Pt [234]

Согласно фазовой диаграмме Pt-Ti, во время отжига могут образоваться интерметаллические фазы Ti_3Pt , Ti_4Pt_3 , α -TiPt и $TiPt_3$ [238]. Соединение $TiPt_3$ образуется во время отжига бинарных покрытий Pt/Ti при температуре в диапазоне 750-800°C [239,240]. Однако, учитывая высокое сродство титана к кислороду, Pt может прореагировать с Ti в покрытиях TiCaPCON-Pt только после активации реакции восстановления TiO_2 .

Обычно НЧ Pt, расположенные на поверхности TiO_2 , легко адсорбируют монооксид углерода и водород, однако, эта хемосорбция отсутствовала после восстановления при высоких температурах из-за эффекта сильного взаимодействия металл-носитель (СВМН) [241]. Миграция восстановленных частиц из TiO_2 сопровождается образованием связей Pt-Ti и инкапсулированием НЧ [242,243]. Аналогичное СВМН было обнаружено для системы Pt/ TiO_2 при температуре выше 280°C с образованием сплава Pt-Ti-O при отжиге в вакууме [244]. СВМН приводит к реакции металлических НЧ Fe с TiO_2 и образованию смешанных оксидов Fe/Ti (например, $FeTiO_3$) [245].

Реакцию восстановления можно также объяснить тем, что НЧ металлов обладают достаточной реакционной способностью, чтобы катализировать разложение $TiO_2 \rightarrow TiO_x + O_2 - x$. Имплантация высокоэнергетических ионов приводит к проникновению атомов Pt в кристаллическую решетку TiO_2 , где атомы могут стабилизироваться в виде Pt(IV) и Pt(II) [246,247] в поверхностном оксиде PtO или, замещая Ti, в решетке TiO_2 . Образование кластеров на основе Pt в TiO_2 может привести к появлению слабосвязанного кислорода [248] и способствовать реакции восстановления во время отжига. Металлическая Pt не может быть окислена до PtO на воздухе даже при высокой температуре. Однако, при нагреве до 400°C атомы Pt могут термически диффундировать из частиц Pt в решетку TiO_2 и замещать Ti^{4+} с образованием Pt^{2+} [249]. Реакции восстановления могут быть следующими:



Графитизацию покрытия при отжиге можно объяснить потерей водорода гидрированным CH_x (рисунок 3.13) с превращением в графитовый углерод. Подобная реакция характерна для катализаторов Pt/C, на которых углеводородные покрытия теряют водород и превращаются в графитовый углерод при вакуумировании [250]. Отжиг способствует многоступенчатому превращению аморфного графита в нанокристаллический графит при 450°C через дегидратацию (150°C), дегидрирование ($150\text{-}300^\circ\text{C}$) и графитизацию ($> 350^\circ\text{C}$) [251]. Свободный Ti, образованный в результате реакций восстановления 3.1 и 3.2, реагирует с аморфным углеродом и Pt и образует фазы TiC и PtTi_x о чем свидетельствуют спектры РФЭС C1s и Pt4f.

Описанные выше результаты РФЭС продемонстрировали, что химический состав поверхности претерпевает значительные изменения во время имплантации ионов металлов и последующего отжига. Обобщая результаты исследований, можно отметить следующее:

- (а) Pt взаимодействует с Ti с образованием PtTi_x , как во время имплантации ионов Pt, так и при последующей термообработке;
- (б) Количество фазы PtTi_x значительно увеличилось после отжига;
- (в) Отжиг привел к графитизации поверхности покрытий (образцы $\text{Pt}_{\text{от}}$, $\text{Fe}_{\text{от}}$ и $(\text{Pt}+\text{Fe})_{\text{от}}$);
- (г) В присутствии НЧ поверхность образцов после отжига была менее окисленной из-за реакций восстановления.

3.11. РФЭС анализ поверхности образцов после выдержки в ФР

Целью данного раздела было изучение влияния 24-часовой выдержки в ФР на изменение химического состава поверхности и структуру приповерхностных слоев.

Спектры РФЭС высокого разрешения C1s, N1s, O1s, Ti2p и Pt4f после 24 часов выдержки образцов в ФР показаны на рисунках 3.20–3.24.

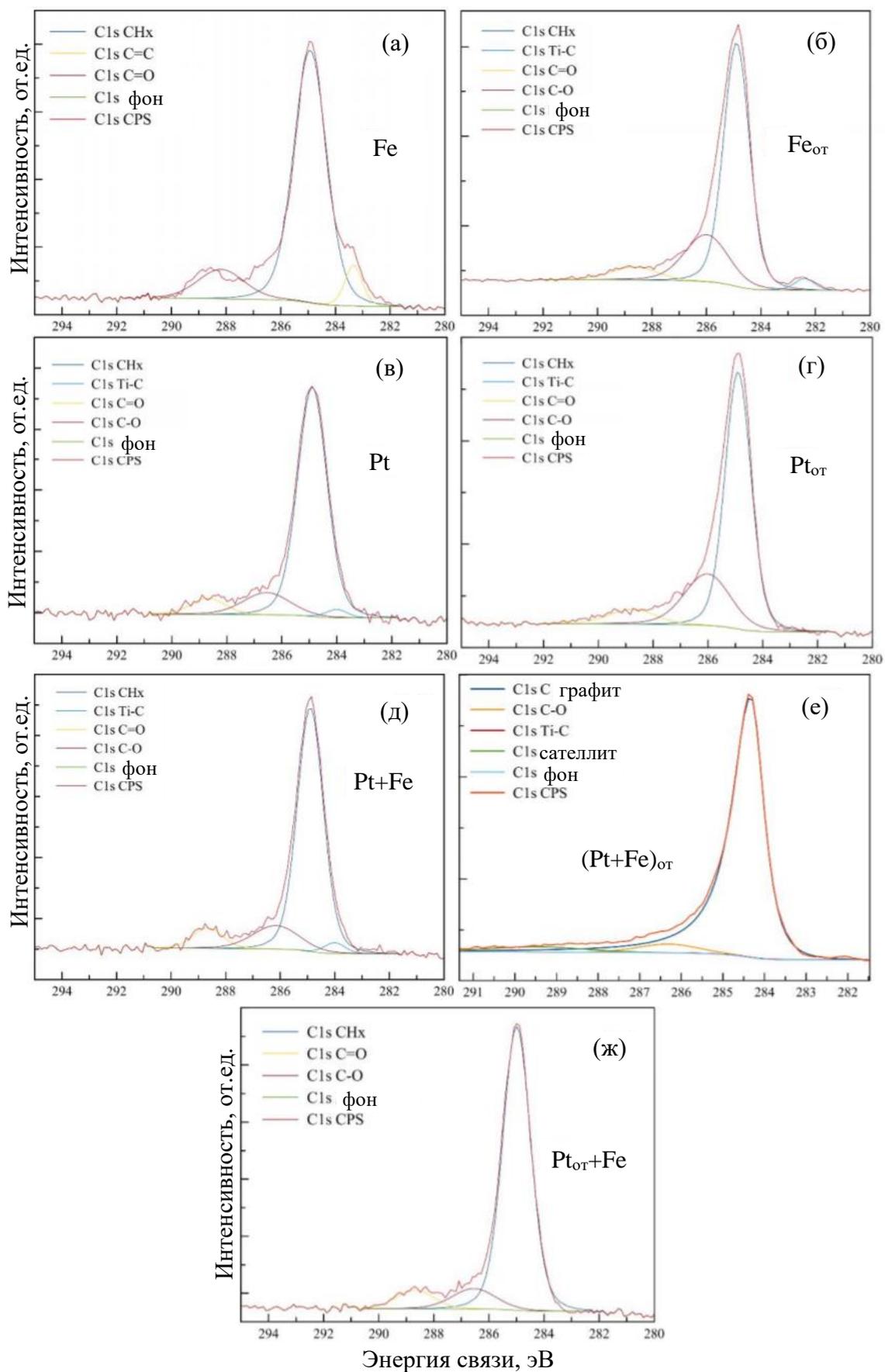


Рисунок 3.20 – Спектры РФЭС C1s (а-ж) образцов после выдержки в ФР в течение 24 часов и их разложение

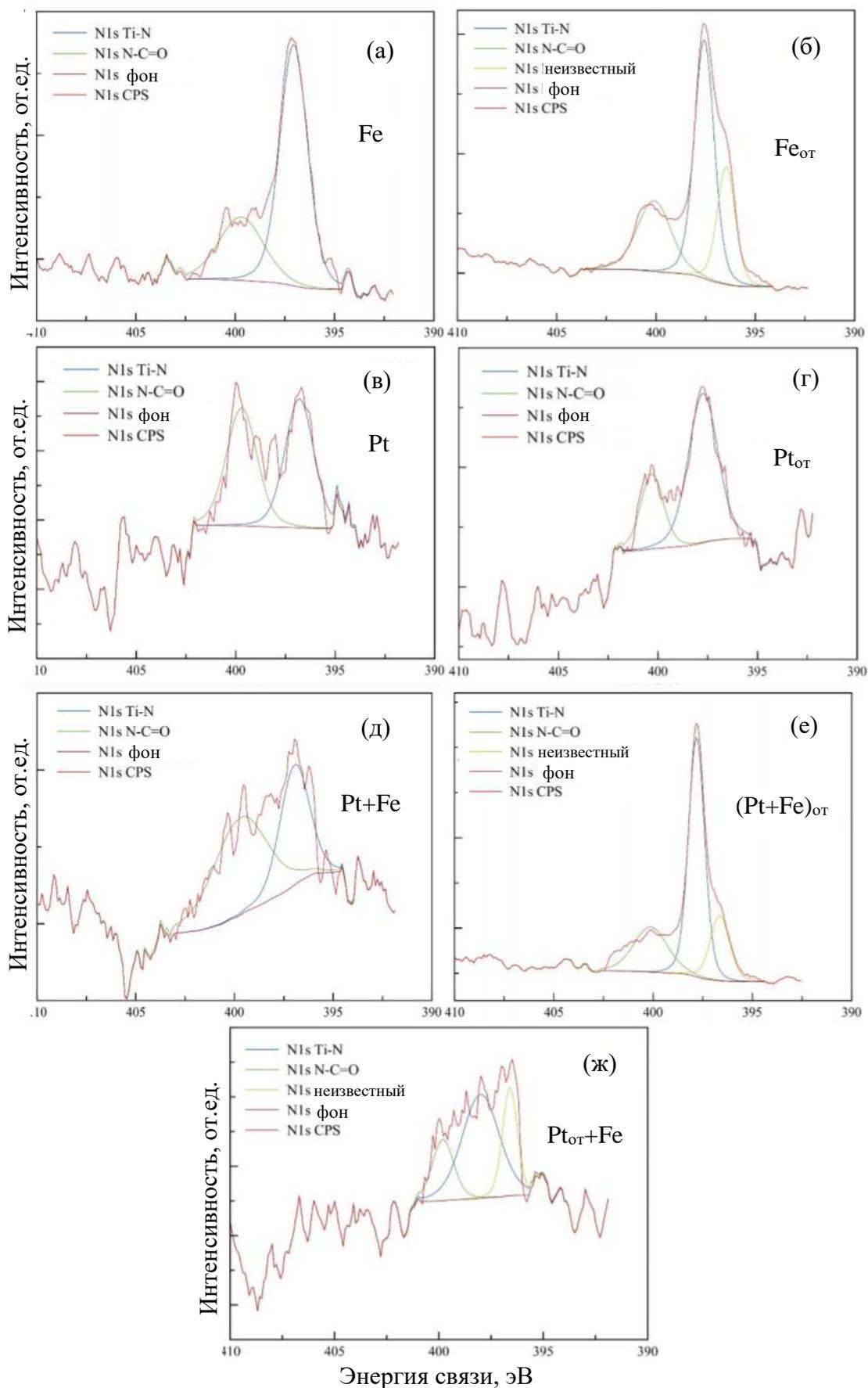


Рисунок 3.21 – Спектры РФЭС N1s (а-ж) образцов после выдержки в ФР в течение 24 часов и их разложение

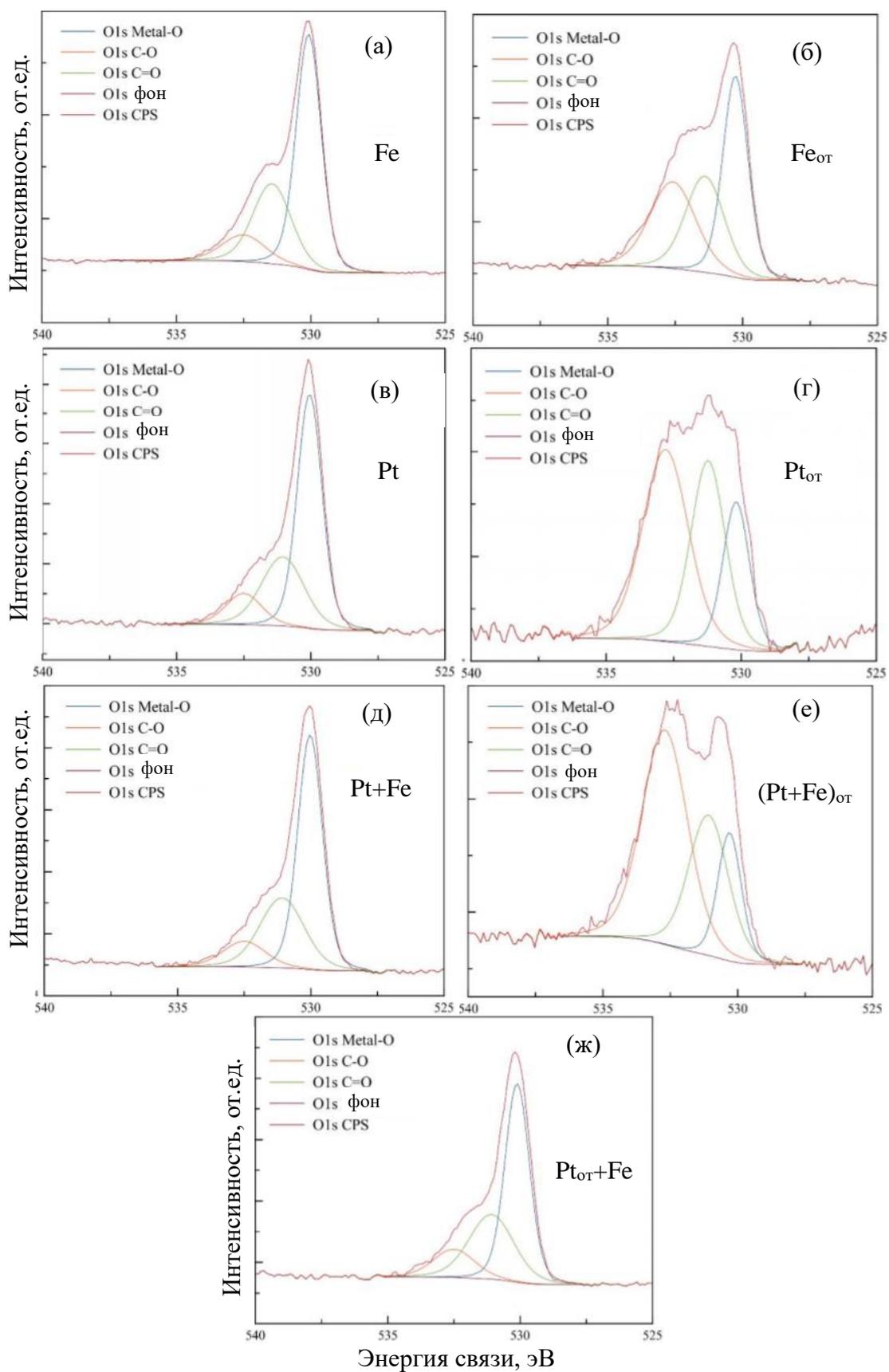


Рисунок 3.22 – Спектры РФЭС O1s (а-ж) образцов после выдержки в ФР в течение 24 часов и их разложение

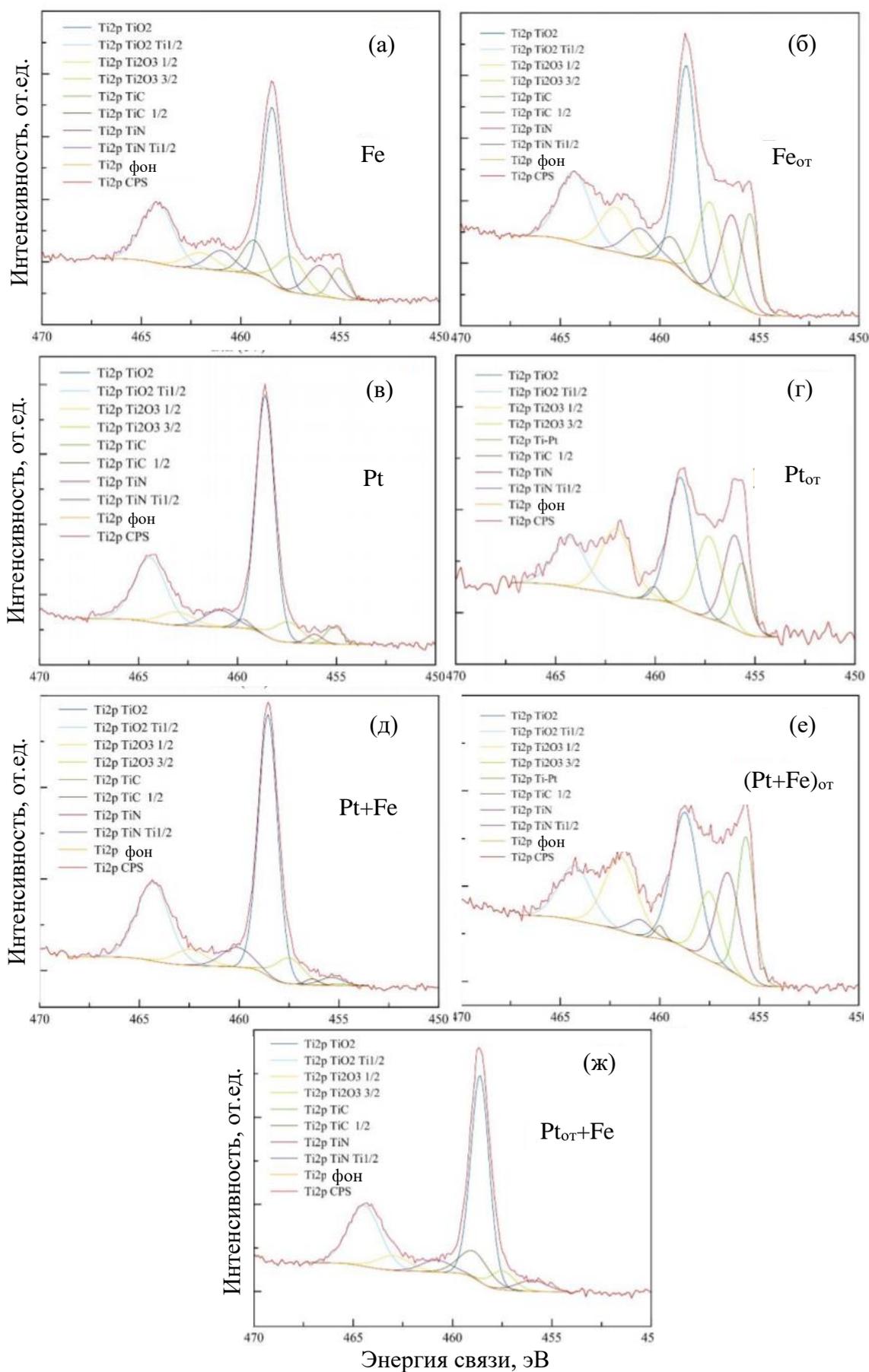


Рисунок 3.23 – Спектры РФЭС O1s (а-ж) образцов после выдержки в ФР в течение 24 часов и их разложение

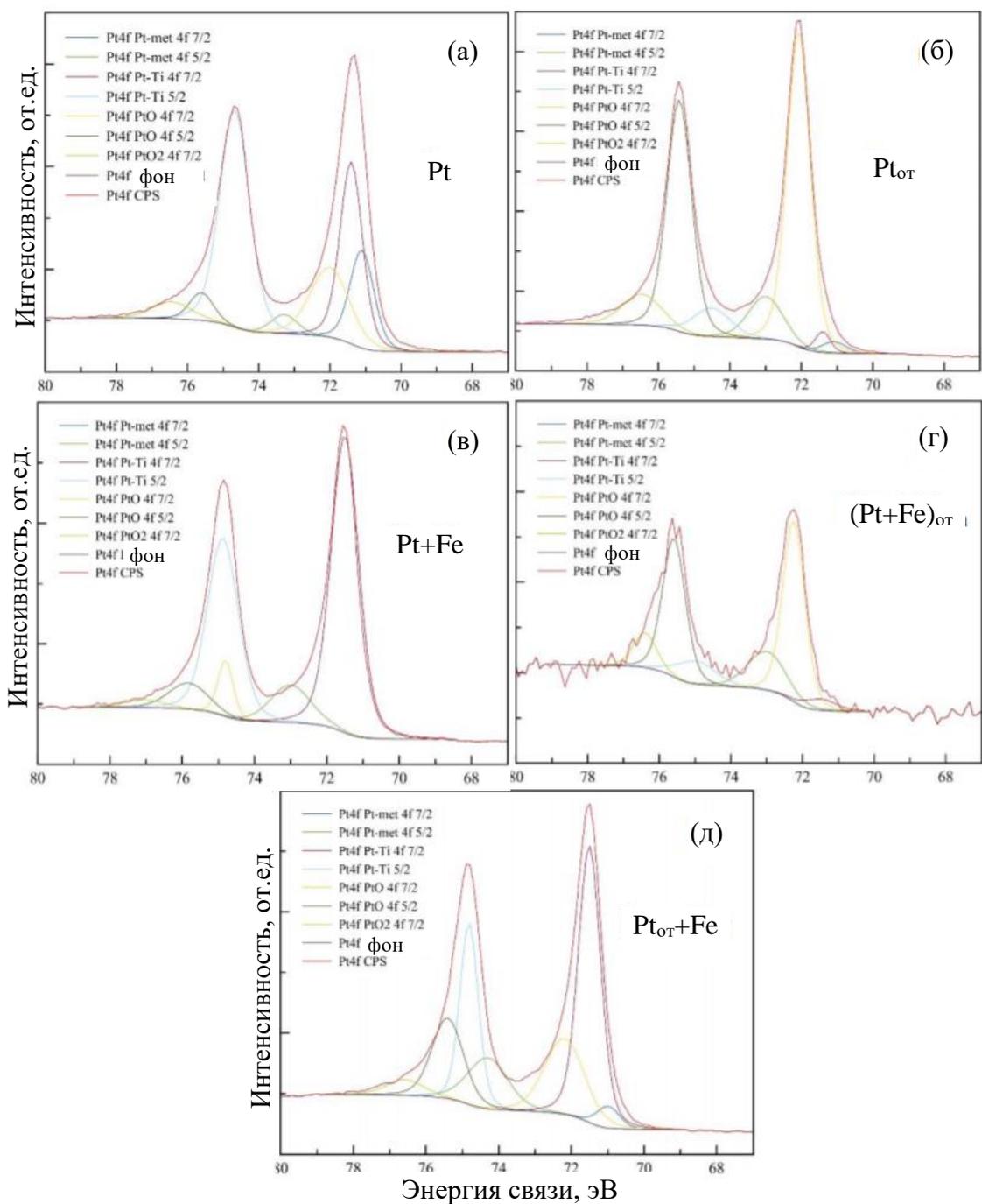


Рисунок 3.24 – Спектры РФЭС Pt4f (а-д) образцов после выдержки в ФР в течение 24 часов и их разложение

Спектры C1s образцов с НЧ Pt и Fe (рисунок 3.20) до и после выдержки в ФР имели следующие различия: появились дополнительные связи С–О в покрытиях Fe_{от} и Pt+Fe, С–С в покрытии Fe, а в образце Fe_{от} вместо а-С наблюдались группы СН_х. Выдержка в ФР привела к полному исчезновению С–N групп в образцах Fe_{от}, Pt, Pt_{от}, Pt_{от}+Fe и (Pt+Fe)_{от}, а в покрытии,

имплантированном Fe, снижению количества амидных групп N-CO (рисунок 3.21). Выдержка в ФР привела к появлению на образцах Fe_{от} и (Pt+Fe)_{от}, новых пиков (ЭС = 396,4 эВ) нитрида. Единственной особенностью спектров O1s (рисунок 3.22) было появление компонента C-O после выдержки в ФР. На спектрах Pt4f после выдержки в ФР увеличилось отношение PtTi_x/Pt_{мет} в покрытиях Pt и Pt_{от}+Fe, а НЧ PtTi_x/Pt сильнее окислились (Pt_{от}, Pt_{от}+Fe, (Pt+Fe)_{от}). Сравнение атомных концентраций элементов до и после погружения в ФР (таблицы 3.5 и 3.6) показало, что количество Ca и P уменьшилось. Это можно свидетельствовать о быстром растворении Ca и P. Выдержка в ФР образцов Fe, Pt и Pt+Fe привела к увеличению количества O и уменьшению C.

Таблица 3.6 – Значения концентрации элементов, полученные методом РФЭС

Образец	Концентрация, ат.%							
	C1s	Ca2p	Fe2p	N1s	O1s	P2p	Pt4f	Ti2p
Fe	37,66	0,00	11,92	2,90	40,95	0,00	0,00	6,56
Fe _{от}	56,60	0,11	2,59	6,90	23,99	0,00	0,00	9,81
Pt	35,99	0,00	0,00	2,12	37,90	0,00	9,17	14,82
Pt _{от}	62,08	0,00	0,00	2,60	16,99	0,92	11,71	5,70
Pt+Fe	35,60	0,00	4,77	2,29	37,23	0,00	7,47	12,64
(Pt+Fe) _{от}	74,57	0,00	1,12	6,31	12,02	0,00	0,24	5,75
Pt _{ан} +Fe	42,06	0,00	4,07	1,83	33,36	0,00	7,68	11,00

Особенности образцов после выдержки в ФР в течение 24 часов:

- (а) исчезли компоненты C-N и появились группы C-O;
- (б) НЧ Pt и PtTi_x имели тенденцию к окислению в ФР;
- (в) в покрытиях Fe_{от}, Pt_{от}+Fe и (Pt+Fe)_{от} а-С связи преобразовались в СН_x.

Покрытие Pt+Fe до и после выдержки в ФР в течение 24 часов было дополнительно изучено методом ПЭМВР (рисунке 3.24).

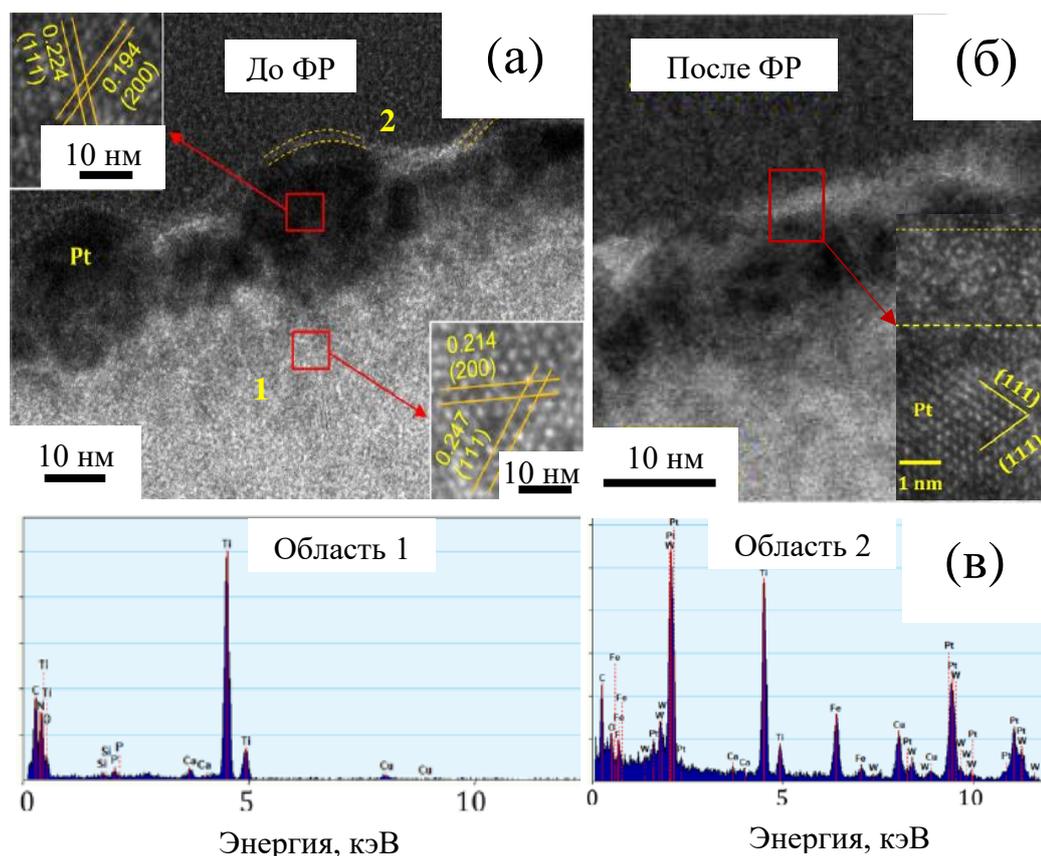


Рисунок 3.25 – Изображения ПЭМ и ПЭМВР (вставки) образца Pt+Fe до (а) и после погружения в ФР на 24 часа (б) и спектры ЭДС (в) в выбранных областях

На рисунке 3.25 присутствует тонкий приповерхностный слой (~20 нм) с НЧ Pt (рисунок 3.25а), что согласуется с результатами раздела 3.3 о глубине имплантации металлов. Ниже имплантированного слоя были обнаружены элементы Ti, Ca, P, S, O и N (сигнал Cu от держателя). На изображениях ПЭМВР покрытия Pt+Fe выявлены характерные атомные плоскости фаз Pt и TiC (рисунок 3.25а, вставки) и обнаружен тонкий поверхностный аморфный слой (~1–1,5 нм). Анализ слоя методом ЭДС подтвердил, что он обогащен Pt и Fe (рисунок 3.25в). Выдержка образца в ФР привела к уменьшению толщины ионно-имплантированного слоя (рисунок 3.25б) вследствие растворения НЧ. Толщина слоя аморфного оксида на поверхности увеличилась до 2,5 нм (рисунок 3.25б). Фазы с высоким содержанием Fe не обнаружены из-за образования твердого раствора Pt+Fe [252].

3.12. Исследование поверхности образцов методами АСМ и КЗСМ

Топографию поверхности и разность потенциалов между наночастицами и окружающей матрицей до и после выдержки образцов в ФР изучали методами АСМ и КЗСМ, соответственно (Рисунок 3.26).

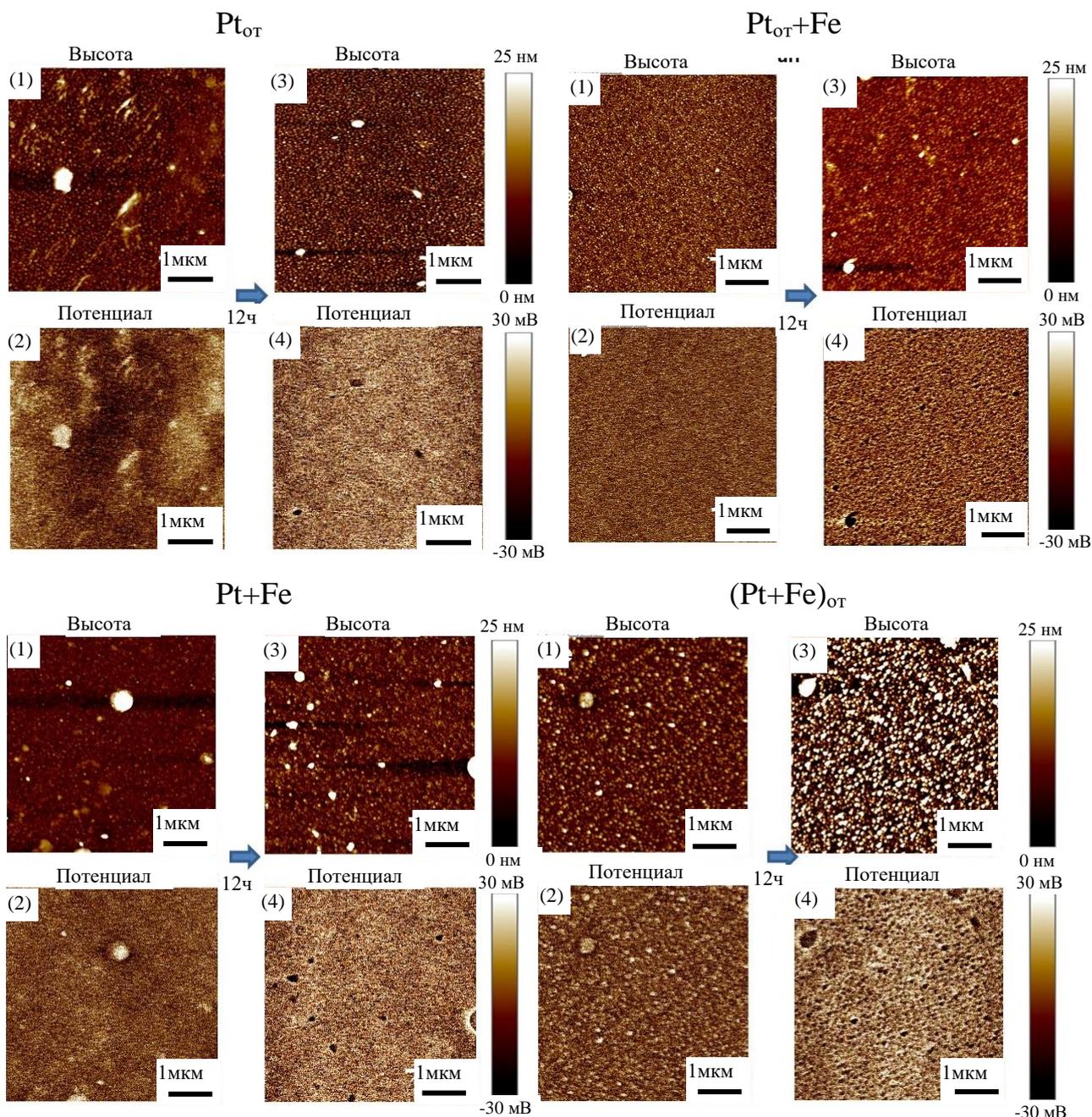


Рисунок 3.26 – АСМ (1,3) и КЗСМ (2,4) изображения образцов $Pt_{от}$, $Pt_{от+Fe}$, $Pt+Fe$ и $(Pt+Fe)_{от}$ до (1,2) и после 12 часов (3,4) выдержки в ФР

Разница потенциала между НЧ Pt и покрытием TiCaPCON в образец Pt_{от} составляла около 15–30 мВ. Выдержка в ФР в течение 12 часов привела к изменению разности потенциалов – НЧ Pt_{от} стали отрицательно заряженными по отношению к TiCaPCON (30–40 мВ). Наночастицы на покрытии Pt+Fe перед погружением в ФР были заряжены на 30 мВ положительнее TiCaPCON, а после выдержки стали на 40–60 мВ отрицательнее окружающей матрицы. Аналогичное изменение заряда НЧ на противоположный при выдержке в ФР происходило для покрытий Pt+Fe и Pt_{от}+Fe.

Сопротивление покрытия TiCaPCON было измерено и составило 29 Ом/см², что подтвердило его способность проводить ток. Наличие разницы потенциала и проводящего покрытия позволяет утверждать об успешном формировании микрогальванические пары на поверхности.

Результаты исследования позволяют утверждать:

- а) НЧ имеют потенциал 15–30 мВ положительнее TiCaPCON до выдержки в ФР;
- б) НЧ имеют потенциал до 60 мВ отрицательнее TiCaPCON после выдержки в ФР;
- в) наличие разницы потенциалов и проводящего покрытия TiCaPCON указывает на возможность возникновения микрогальванической пары;

3.13. Изучение выхода ионов Pt, Fe, Ca и P, в процессе выдержки образцов в ФР

Концентрация ионов Pt, Fe, Ca и P важна для объяснения биоактивных и бактерицидных свойств материалов. Целью настоящего раздела было изучение зависимости количества ионов Pt, Fe, Ca и P в ФР от времени.

На рисунке 3.27 показана кинетика выхода ионов Pt, Fe, Ca и P,

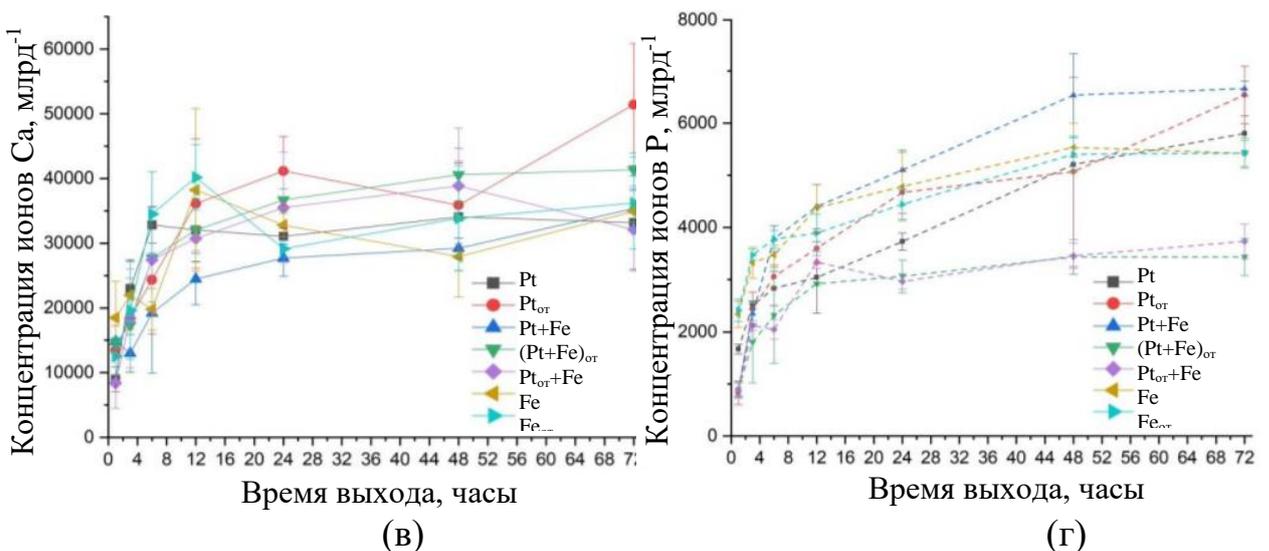
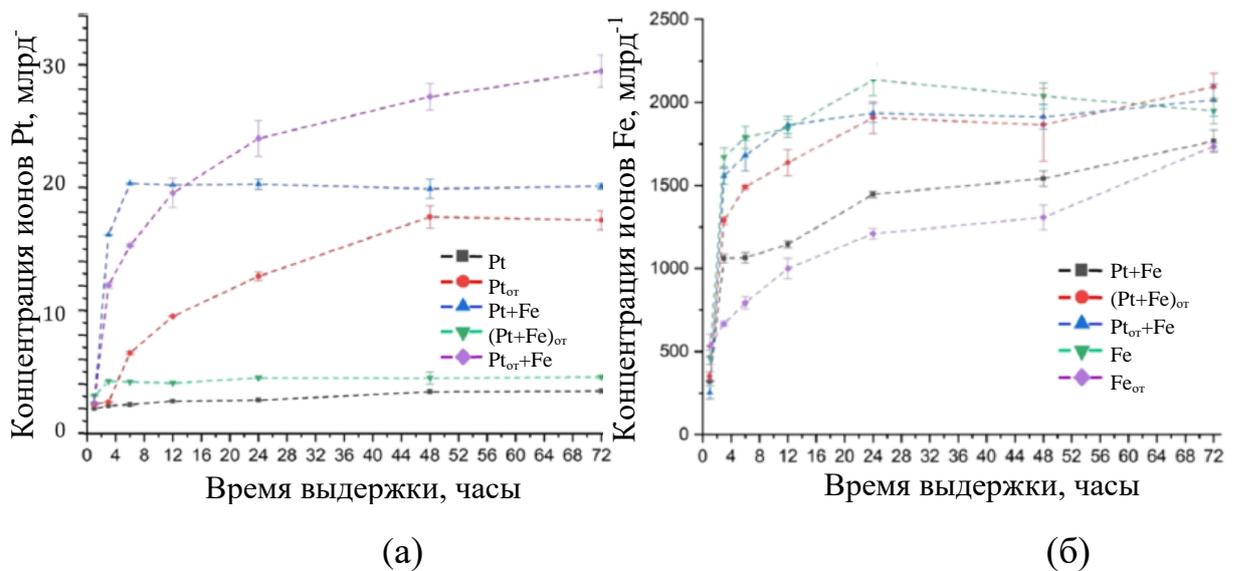


Рисунок 3.27 – Концентрации ионов Pt (а), Fe (б), Ca (в) и P (г), высвобождаемых в ФР с течением времени, по данным МС-ИСП

Из рисунка 3.27а видно, что для образца с имплантацией Pt через 72 часа концентрация ионов Pt не превышала 1,5 млрд⁻¹. Последующая имплантация ионов Fe (образец Pt+Fe) привела к активации процесса выхода ионов Pt. Концентрация ионов Pt быстро увеличивалась до 18 млрд⁻¹ в течение 6 часов, после чего высвобождение ионов Pt прекратилось. Увеличение кинетики выхода Pt связано с быстрым выходом ионов Fe в ФР, которые увлекают часть ионов Pt из НЧ Fe/Pt. После выхода Fe из НЧ Fe/Pt выход ионов Pt прекратился.

Образец (Pt+Fe)_{от} выпускал до 2 млрд⁻¹ ионов Pt в течение 3 часов, затем концентрация не изменялась. В образцах Pt_{от} и Pt_{от}+Fe концентрация

ионов Pt постепенно увеличивалась со временем, достигая $14 \text{ (Pt}_{\text{от}})$ и $27 \text{ млрд}^{-1} \text{ (Pt}_{\text{от}}+\text{Fe})$ через 72 часа.

Fe быстро растворялось в ФР, и концентрация его ионов для покрытия Fe достигала 1750 млрд^{-1} уже через 3 часа (рисунок 3.28б). Отжиг замедлил выделение ионов Fe из-за окисления НЧ Fe, через 3 часа их концентрация не превышала 500 млрд^{-1} . Покрытие Pt+Fe через 3 часа выделило только 1100 млрд^{-1} из-за низкого содержания Fe в результате разницы в режимах первичной и вторичной ионной имплантации: 30 кВ, 60 мин (Fe) против 25 кВ и 15 мин (Pt+Fe). Отжиг образца Pt+Fe привел к образованию двух типов катодов Pt и PtTi, наличие которых привело к увеличению концентрации ионов Fe в ФР до 1750 млрд^{-1} . Этот механизм был рассмотрен в разделе 3.6. Образец $\text{Pt}_{\text{от}}+\text{Fe}$ также показал высокое высвобождение ионов Fe. Количество НЧ Pt после отжига возросло, что привело к увеличению доли Fe, имплантированного в НЧ Pt, и, соответственно, его выхода.

На рисунке 3.27 в,г показана концентрация ионов Ca и P во время выдержки образцов в ФР. Концентрация ионов Ca быстро увеличивалась в течение 12 часов, а затем оставалась на уровне $30\text{--}40 \text{ млрд}^{-1}$. Все покрытия интенсивно высвобождали ионы P в течение первых 3 часов с последующим медленным выходом в течение 48 часов. Среднее количество ионов P составило $2\text{--}3,5 \text{ млн}^{-1}$ (3 часа) и $3\text{--}6,5 \text{ млн}^{-1}$ (72 часа). Имплантация и отжиг не внесли значительных изменений в кинетику выхода Ca и P.

3.14. Изучение способности образцов поглощать свет

Способность материала генерировать АФК определяется возможностью перераспределения электронов между валентной зоной и зоной проводимости под действием облучения. Для изучения способности образцов поглощать свет в УФ и видимом диапазоне был использован метод спектроскопии зеркального отражения (рисунок 3.28).

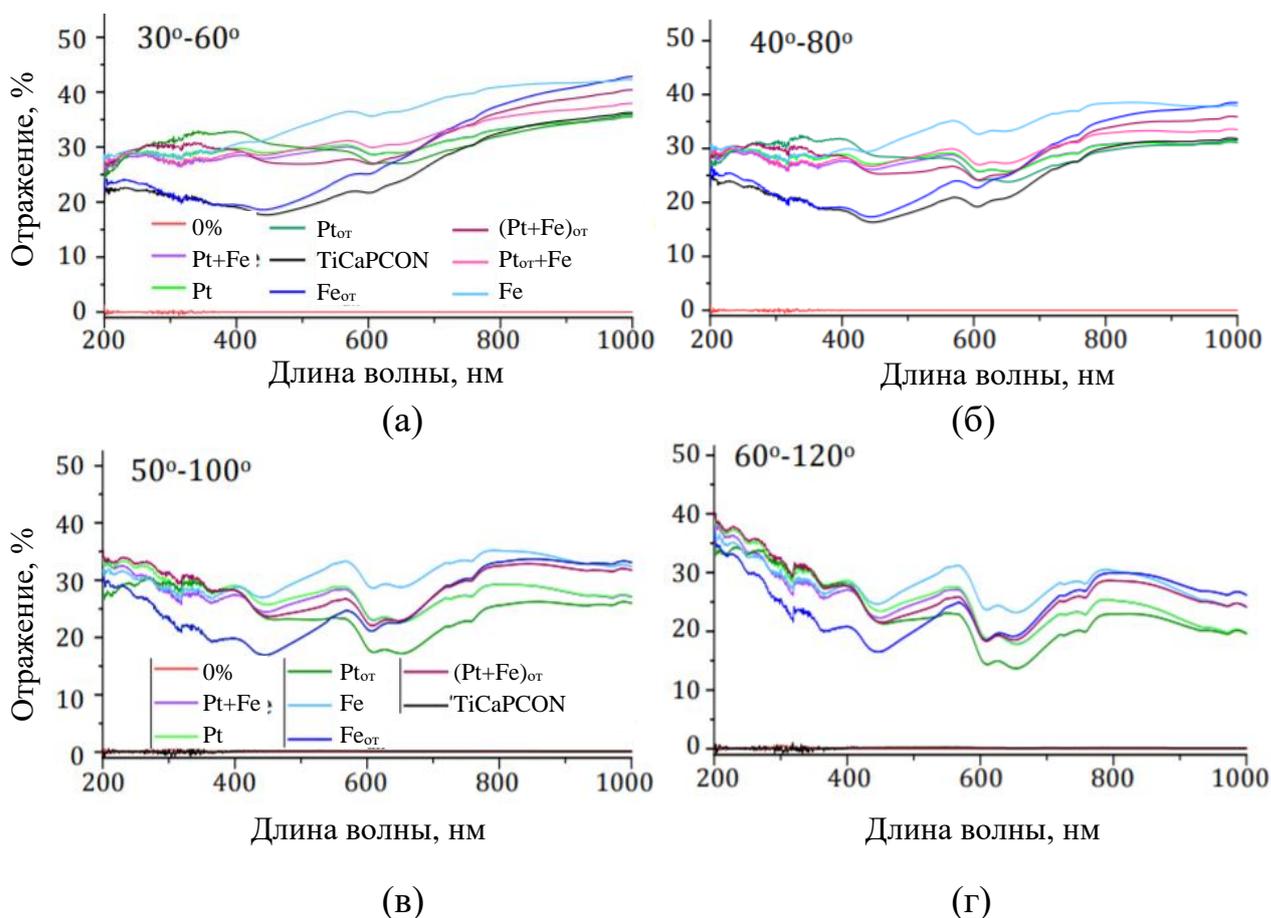


Рисунок 3.28 – Спектры ЗО при углах падения 30, 40, 50 и 60 градусов

На рисунке 3.28 сравниваются спектры ЗО покрытий TiCaPCON без НЧ и имплантированных Pt и Fe, записанные при углах падения 30, 40, 50 и 60 градусов. Кривые зеркального отражения всех покрытий в диапазоне облучения от 200 до 1000 нм не отличались, а процент отражения составил менее 40%. Разница в количестве отраженного света между образцами не превышала 10%. Анализ спектров позволяет заключить, что все образцы поглощают до 60% света в диапазоне 200 до 1000 нм.

3.15. Исследование генерации АФК

Целью данного раздела являлось изучение количества генерируемых образцами АФК. Концентрацию АФК измеряли после воздействия: (а) УФ-излучение в течение 30 мин; (б) видимого света в течение 8 часов; (в) хранения в темноте в течение 8 часов (рисунок 3.29). Время 24+8 часов означает, что

образцы предварительно выдерживали в ФР в течение 24 часов, заменяли его новым и затем через 8 часов измеряли концентрацию АФК. Этот эксперимент позволил оценить способны ли образцы генерировать АФК после 24 часов.

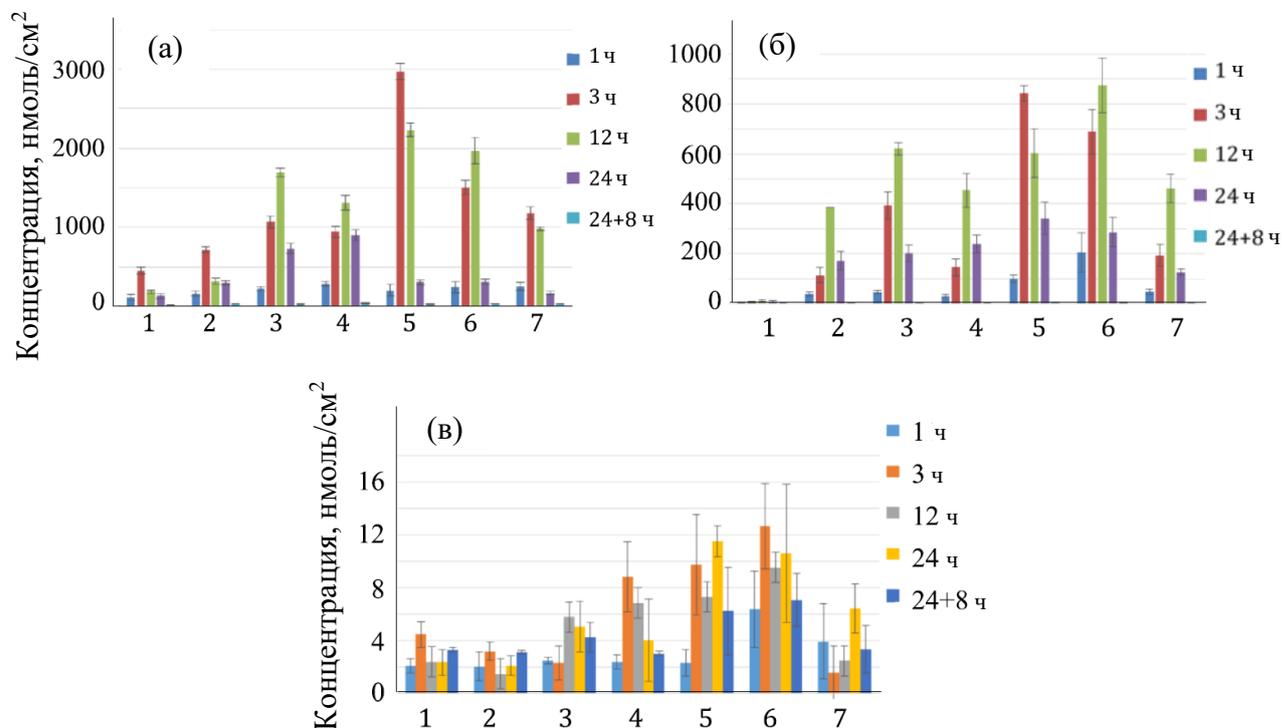


Рисунок 3.29 – Концентрация АФК, образующихся в ФР после воздействия (а) УФ-облучения, (б) искусственного света и (в) выдержки в темноте. 1 – TiCaPCON, 2 – Pt, 3 – Pt_{от}, 4 – Fe_{от}, 5 – Pt+Fe, 6 – Pt_{от}+Fe и 7 – (Pt+Fe)_{от}

Максимальная концентрация АФК через 3 часа выдержки после УФ-облучения покрытий TiCaPCON без НЧ составила 450 нмоль/см², затем концентрация снизилась до 190 нмоль/см² через 12 часов. Воздействие УФ-облучения на все образцы, легированные Pt и Fe, привело к генерации максимального количества АФК после погружения в ФР на 3-12 час выдержки: 720 (Pt), 1700 (Pt_{от}), 1310 (Fe_{от}), 2970 (Pt+Fe), 1970 (Pt_{от}+Fe) и 1180 нмоль/см² ((Pt+Fe)_{от}). Концентрация АФК после выдержки в течение 24 часов значительно снизилась до 300 (Pt), 730 (Pt_{от}), 900 (Fe_{от}), 300 (Pt+Fe), 310 (Pt_{от}+Fe) и 170 нмоль/см² ((Pt+Fe)_{от}).

Максимальная концентрация АФК после воздействия видимого света (рисунок 3.29б) была примерно в 2-3 раза ниже УФ: 385 (Pt), 620 (Pt_{от}), 450 (Fe_{от}), 840 (Pt+Fe), 870 (Pt_{от}+Fe) и 460 нмоль/см² ((Pt+Fe)_{от}).

Цель эксперимента по изучению количества АФК в ФР в условиях темноты состояла в определении роли света в генерации АФК. Концентрация АФК в темноте была на два порядка ниже, чем при облучении видимым светом (рисунок 3.29в). Покрытия Pt+Fe и Pt_{от}+Fe генерировали максимальное АФК как в условиях воздействия УФ, так и видимого света. Эти два образца также генерировали максимальное количество АФК в темноте (<13 нмоль/см²). После предварительной выдержки в течение 24 часов и погружения в новый раствор образцы не образовали АФК в течение 8 часов.

Количество АФК зависит от двух конкурентных процессов: образования АФК и их рекомбинации. На рисунке 3.30 показаны концентрации АФК в аликвотах, собранных с интервалом в 12 часов после воздействия видимого света, которые затем хранили в течение 66 и 54 часов, соответственно, перед анализом количества АФК.

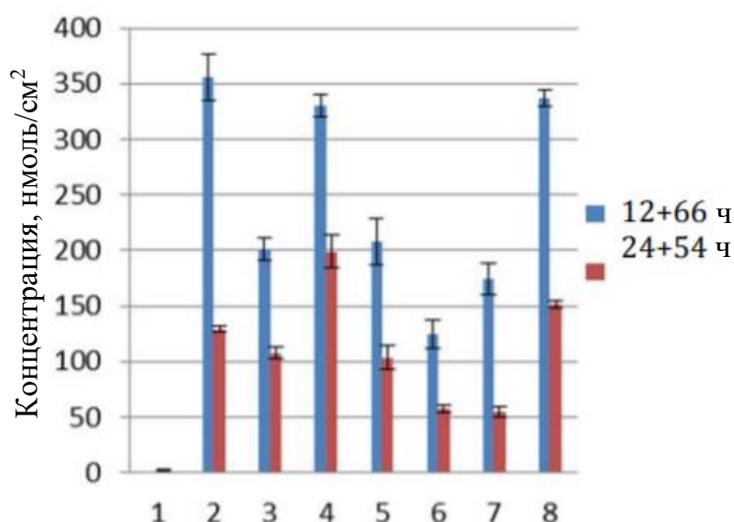


Рисунок 3.30 – Концентрация АФК в аликвотах, собранных через 12 и 24 ч и хранимых в течение 54 и 66 часов, соответственно. 1 – TiCaPCON, 2 – Pt+Fe, 3 – Pt, 4 – Fe, 5 – Fe_{от}, 6 – Pt_{от}, 7 – (Pt+Fe)_{от}, 8 – Pt_{от}+Fe

Сравнение результатов, представленных на рисунках 3.30 и 3.31, показывает, что концентрация АФК в аликвотах (без образцов) уменьшается со временем со скоростью $1,3\text{--}7,8$ нмоль/см² в час в результате процесса рекомбинации с катионами раствора.

Результаты исследований показали, что:

- а) наличие НЧ увеличивает количество генерируемых АФК;
- б) концентрация АФК очень сильно зависит от типа излучения. УФ часто используется для активации процесса генерации АФК [253];

ГЛАВА 4. Разработка покрытия в системе ПЭО $\text{TiO}_2/\text{Ag,Pt}$

Покрытие из оксида титана (TiO_2) часто используют при модификации поверхности титановых имплантатов. Одним из способов нанесения TiO_2 является ПЭО, которое позволяет получать пористую поверхность и широко варьировать состав покрытия. Размер пор и состав – один из основных факторов биосовместимости покрытия, поэтому важно оптимизировать режим ПЭО и состав электролита.

Анализ литературы показывает, что одной из особенностей TiO_2 являются, обусловленные шириной запрещенной зоны 3,0–3,2 эВ, фотокаталитические свойства, которые проявляются под действием УФ света и обеспечивают генерацию АФК. Усилить фотокаталитическую активность TiO_2 , и, следовательно, генерацию АФК можно путем создания НЧ на поверхности.

Платина продемонстрировала способность к генерации АФК (глава 3), а ее ионы не проявляются бактерицидных свойств. Ag, напротив, известно бактерицидными свойствами ионов, что в комбинации с АФК может усилить антибактериальную активность материала. Эти металлы были выбраны для создания НЧ на поверхности TiO_2 покрытия.

Целью главы являлось создание пористого биоактивного покрытия TiO_2 с НЧ Ag и Pt, способного генерировать АФК и выделять бактерицидные ионы.

4.1. Оптимизация морфологии и элементного состава покрытий

Целью раздела являлась оптимизация технологического режима ПЭО для получения оптимальной морфологии и состава покрытий ПЭО TiO_2 .

ПЭО обработка проводилась в различных электролитах (Э_1 - Э_3) при соответствующих технологических параметрах (Р_1 - Р_3). РЭМ изображения структуры и составы покрытий, определенные методом ЭДС, приведены на рисунке 4.1 и в таблице 4.1.

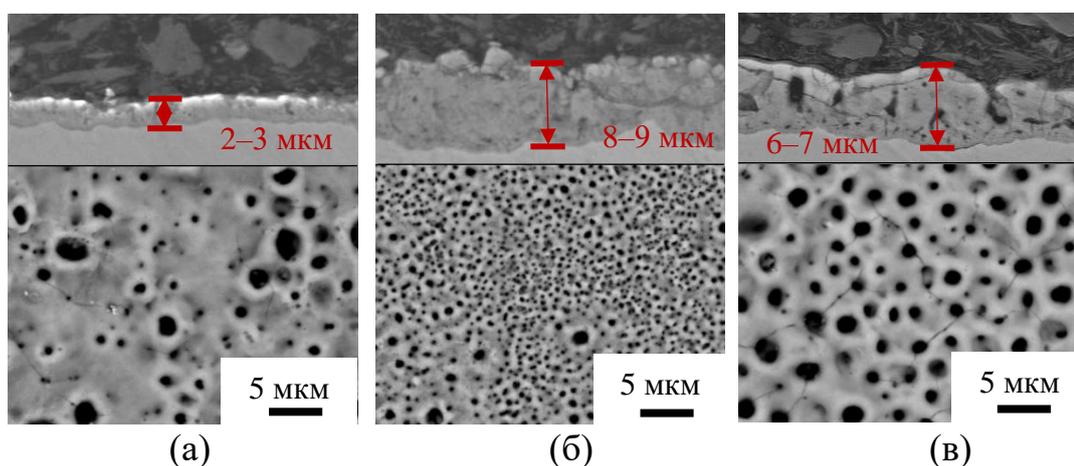


Рисунок 4.1 – РЭМ изображения покрытий ПЭО TiO_2 (вид сверху и сбоку), полученных по режимам (а) $\text{Э}_1/\text{P}_1$, (б) $\text{Э}_2/\text{P}_2$, (в) $\text{Э}_3/\text{R}_3$

Таблица 4.1. Элементный состав покрытий при различных режимах получения

Электролит/Режим	Элементы, ат.%					
	Ti	O	Ca	P	N	C
$\text{Э}_1/\text{P}_1$	25,7	57,7	0,8	4,0	0,0	10,8
$\text{Э}_2/\text{P}_2$	33,5	47,7	0,3	0,0	7,9	10,6
$\text{Э}_3/\text{P}_3$	22,4	65,2	6,3	4,8	1,3	0,0

Покрытие, полученное по режиму $\text{Э}_1/\text{P}_1$, имело толщину 2–3 мкм и поры двух характерный размеров: мелкие (0,45–0,7 мкм) и крупные (1,6–3,2 мкм) (Рисунок 4.1а). Распределение пор было неоднородным, а содержание Ca и P составляло 0,8 и 4,0 ат.%, соответственно. Низкое содержание Ca и неоднородность размера и распределения пор не являются оптимальными параметрами. Режим $\text{Э}_2/\text{P}_2$ (рисунок 4.1б) позволил получить плотное покрытие толщиной 8–9 мкм с неглубокими плотно и равномерно расположенными мелкими порами (0,2–0,5 мкм) и единичными крупными порами до 1,5 мкм (рисунок 4.1б). Покрытие содержало очень мало Ca (0,3 ат.%), а P не был обнаружен. Оптимальная морфология поверхности и состав покрытия были получены при режиме $\text{Э}_3/\text{P}_3$ – равномерно распределенные глубокие поры размером 0,7–2,3 мкм и (рисунок 4.1в), концентрация Ca и P 6,3 и 4,8 ат.%, соответственно. Толщина покрытия составила 6–7 мкм. Пористость образца $\text{Э}_3/\text{R}_3$ и площадь поверхности были рассчитаны исходя из цилиндрической формы пор по методу секущих. ПЭО привело к увеличению площади поверхности в 1,66 раза, а пористость образца составила 12,1%.

4.2. Исследование состава и химии поверхности покрытия

Изображения РЭМ (вид сверху) и ЭДС карты распределения элементов в покрытии ПЭО TiO_2 и спектры КР показаны на рисунках 4.2 и 4.3.

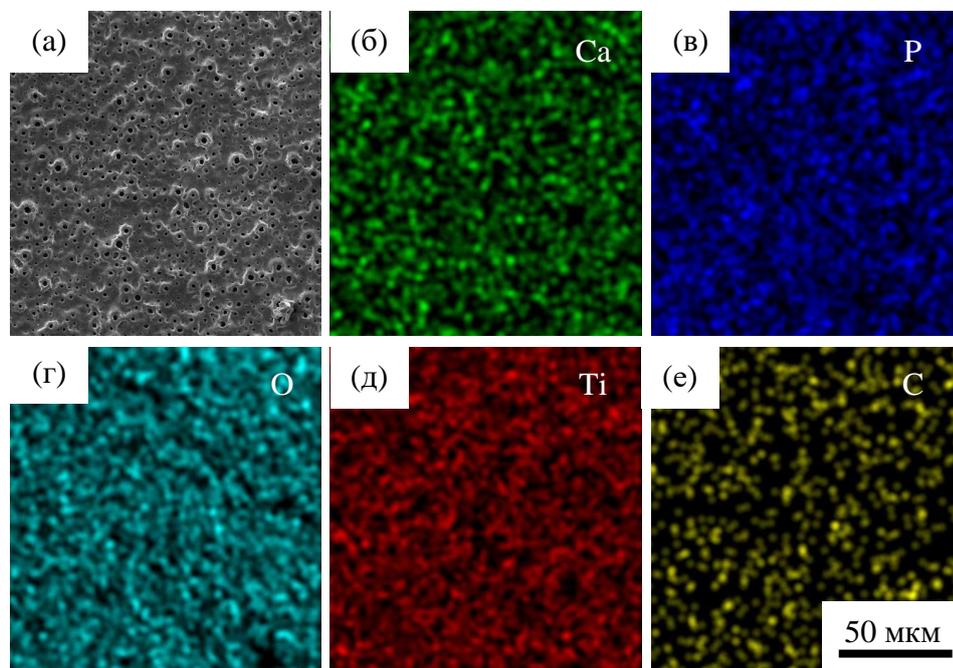


Рисунок 4.2 – (а) Изображение РЭМ и соответствующие ему (б-е) карты элементов ЭДС покрытия ПЭО TiO_2 ($\text{Э}_3/\text{P}_3$)

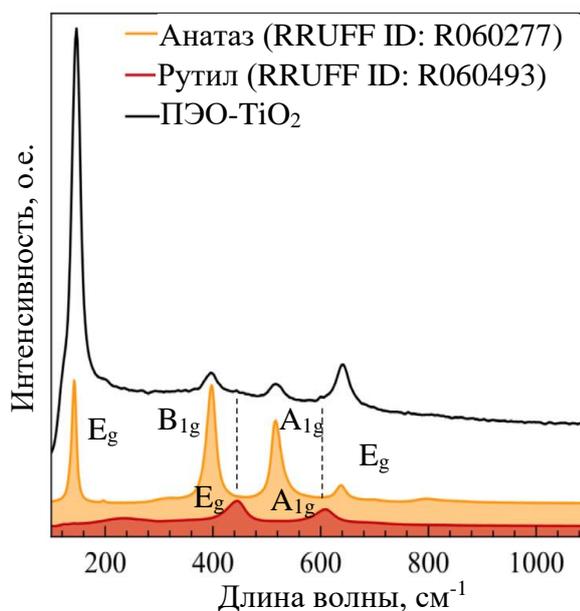


Рисунок 4.3 – Спектры КР покрытия ПЭО TiO_2 , нанесенного на подложку из $\alpha\text{-Ti}$, и эталонных образцов TiO_2 анатаза и рутила

Рисунок 4.2 демонстрирует, что все элементы, в том числе Са и Р, равномерно распределены по поверхности покрытия. Спектр КР образца ПЭО TiO_2 имел четыре характерных пика (рисунок 4.3), форма и положение которых соответствовали сигналам 146 (E_g), 396 (B_{1g}), 515 (A_{1g}) и 641 (E_g) cm^{-1} для фазы TiO_2 -анатаз. Сигналы от фазы TiO_2 -рутил также присутствовали на спектре в виде двух пиков слабой интенсивности.

Химические связи на поверхности покрытий ПЭО TiO_2 были изучены методом РФЭС (рисунок 4.4).

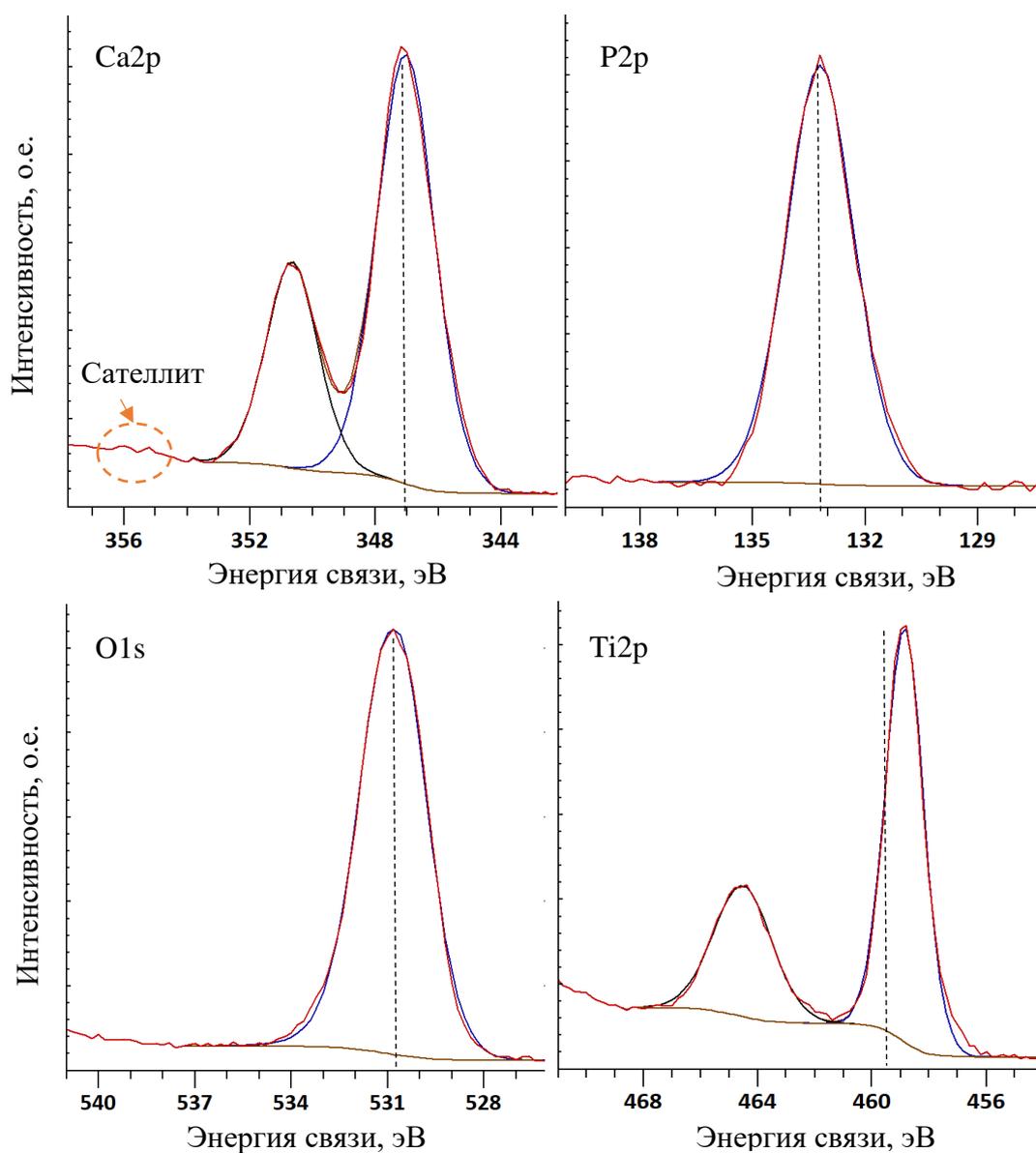


Рисунок 4.4 – Спектры РФЭС высокого разрешения покрытия ПЭО TiO_2 и их аппроксимация

Согласно анализу спектров РФЭС, концентрация элементов на поверхности: Ti – 7,0 ат.%, O – 54,9 ат.%, C – 20,0 ат.%, Ca – 8,9 ат.%, P – 7,0 ат.%, Na – 2,2 ат.%. Отношение Ca/P, определенное из данных РФЭС, было составляла 1,3, что подтвердило результаты ЭДС ($Ca/P = 1,27$). Характерные спектры РФЭС высокого разрешения O1s, Ti2p, Ca2p и P2p представлены на рисунке 4.4. Все спектры были аппроксимированы с использованием одного компонента. Дублет Ti2p находился в положениях 458,65 и 464,30 эВ. Спектр O1s обладал единственным максимумом на 530,5 эВ. Эти значения совпали со справочными данными для фаз анатаза (458,6 эВ) и рутила (458,5 эВ) [254,255]. Разброс значений энергии связи Ti-O в фазе TiO₂ может составлять до 0,2 эВ [255]. Пик на спектре O1s относится к кислороду в кристаллической решетке TiO₂ [256]. Спектр Ca2p имеет две спин-орбитальные компоненты при 347 и 350,7 эВ, которые были соотнесены с соединением Ca₃(PO₄)₂ [257]. Кривая P2p имела симметричный одиночный максимум при 133,2 эВ, который принадлежал одной из разновидностей фосфата PO₄³⁻ [256].

Результаты исследований показали, что:

- а) биоактивные элементы Ca и P, распределены равномерно по поверхности покрытий и имеют соотношение $Ca/P = 1,3$;
- б) фазовый состав ПЭО TiO₂ покрытий представляет собой смесь анатаза и рутила с преобладанием анатаза;
- в) на поверхности ПЭО TiO₂ присутствовали химические связи характерные для Ca₃(PO₄)₂.

4.3. Исследование биоактивности покрытия

Целью данного раздела было исследование способности ПЭО TiO₂ покрытия образовывать Ca,P-фазу при погружении в SBF.

Покрyтия ПЭО TiO₂ выдерживали в SBF в течение 28 дней, в процессе выдержки состояние поверхности оценивали методом РЭМ и ЭДС через 7 и 28 дней (рисунок 4.5).

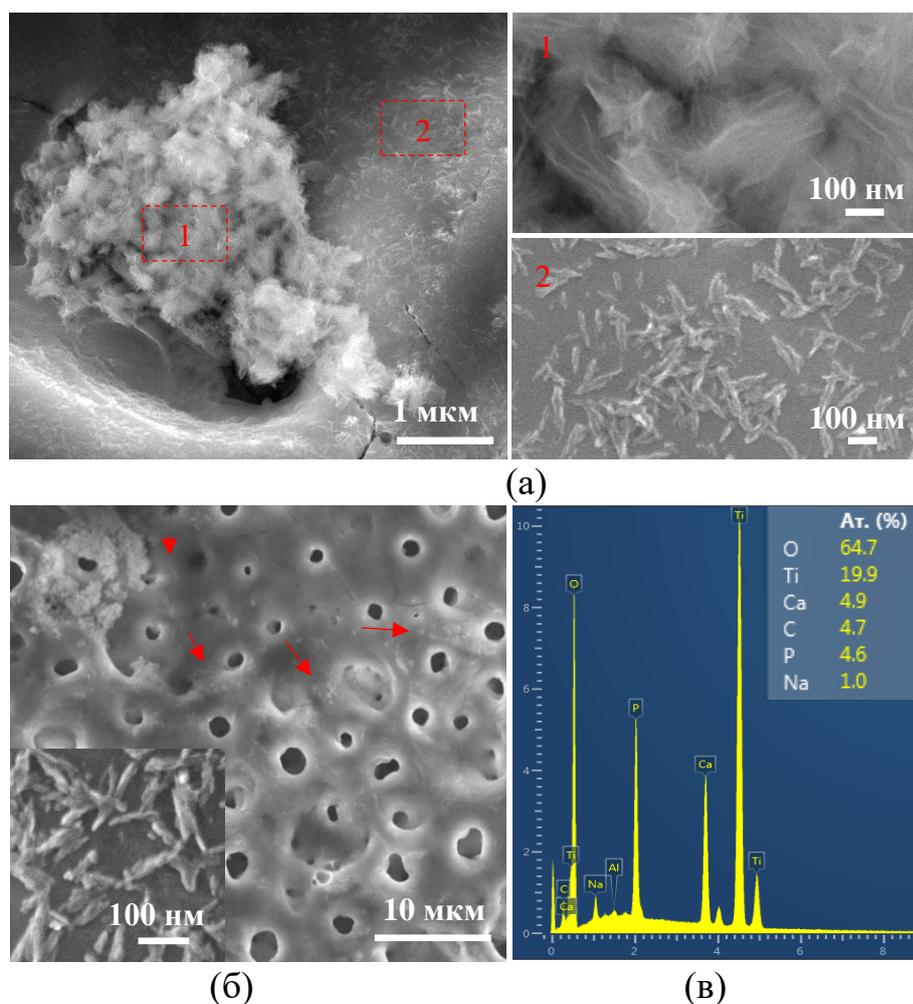


Рисунок 4.5 – (а,б) Изображения РЭМ и (в) соответствующие спектры ЭДС образца ПЭО TiO_2 после выдержки в SBF в течение (а) 7 и (б) 28 дней

После 7 и 28 дней вся поверхность образца была усеяна иглоподобными выделениями кальций-фосфатной фазы (по данным ЭДС) длиной до 100 нм и шириной порядка 15 нм (рисунок 4.5а,б). Агломераты наночастиц также были обнаружены внутри пор. Контрольный образец Ti был лишен выделений кальций-фосфатной фазы, что свидетельствует об образовании кристаллов CaP-фазы непосредственно на поверхности покрытий ПЭО TiO_2 , а не их выпадении из SBF в качестве осадка. Структура образцов после экспериментов в SBF была исследована методами РФА и спектроскопии КР (рисунок 4.6).

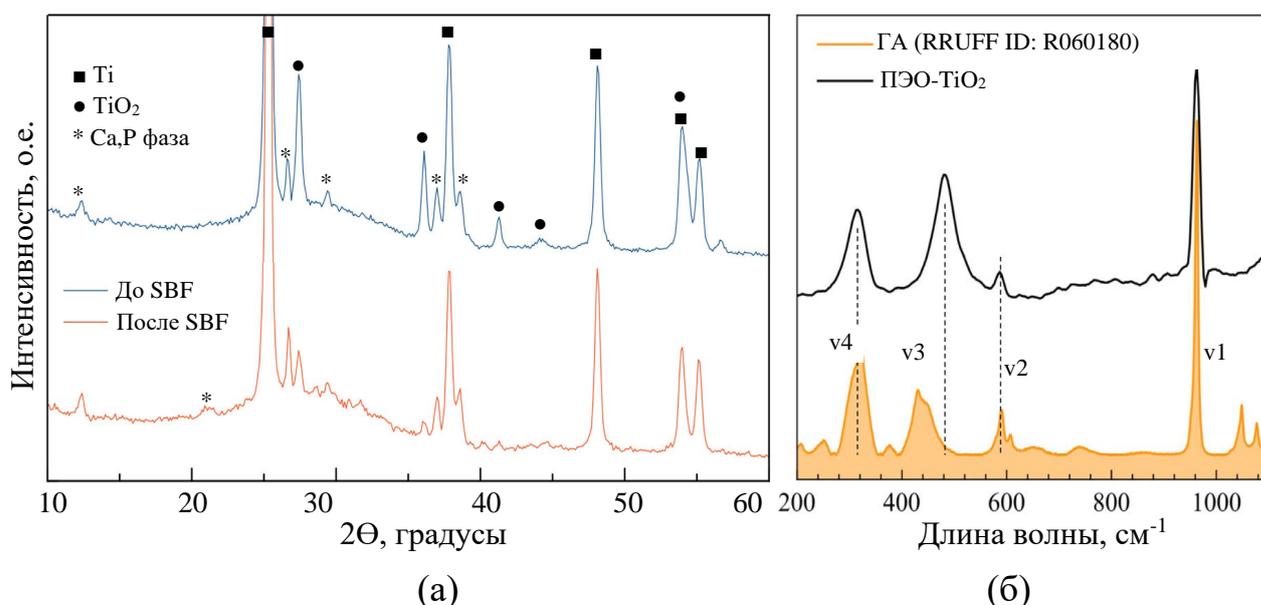


Рисунок 4.6 – (а) Диффрактограмма и (б) спектр комбинационного рассеяния покрытия ПЭО TiO_2 , нанесенного на подложку из $\alpha\text{-Ti}$

Анализ диффрактограммы покрытия ПЭО TiO_2 (рисунке 4.6а) до и после выдержки в SBF в течение 28 дней позволил обнаружить, что (а) TiO_2 (анатаз) являлся основной фазой в покрытии, (б) наблюдались пики, принадлежащие фазе TiO_2 (рутил), и (в) присутствовали пики, принадлежащие фазе $\text{Ca}_x\text{P}_y\text{O}_z$.

Спектр КР образца ПЭО TiO_2 после модельных экспериментов в SBF и спектр ГА представлены на рисунке 4.6б. Положения пиков на спектре покрытия совпадают с положениями пиков на спектре ГА и относятся к фосфатным группам PO_4^{3-} . Спектр ГА в диапазоне $200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ имеет три характерных пика, обусловленных ν_1 симметричной продольной P-O (P-O), а также двойной (ν_2) и трехкратной (ν_4) поперечными (O-P-O) модами [258]. Обнаружены следующие характерные особенности спектра покрытия ПЭО TiO_2 , свидетельствующие об образовании ГА: (а) интенсивный и узкий пик при 960 см^{-1} и (б) высокочастотный промежуток между пиками ν_2 и ν_4 . Спектр КР покрытия ПЭО TiO_2 также имел пики при 315 , 585 и 960 см^{-1} , которые совпали с аналогичными максимумами на эталонном спектре ГА. Однако, полоса 485 см^{-1} смещена на 45 см^{-1} в сторону более высоких частот по сравнению с сигналом ν_3 ГА, а ширина зазора между пиками ν_3 и ν_4

уменьшилась с 145 до 100 см⁻¹. Для β-трикальцийфосфата (β-ТКФ) это значение составляет всего 55 см⁻¹ [259].

Результаты исследований позволили установить следующее:

(а) фаза СаР на поверхности ПЭО TiO₂ после выдержки в SBF по своей кристалличности и ионному составу близка к нанокристаллам апатита.

(б) покрытие ПЭО TiO₂ является биоактивным, так как способствует формированию на своей поверхности СаР-фазы.

4.4. Создание НЧ Ag и Pt на поверхности ПЭО TiO₂ покрытий

Металлы Ag и Pt были введены в ПЭО TiO₂ методом ионной имплантации. Результат ионной имплантации представлен на рисунке 4.7.

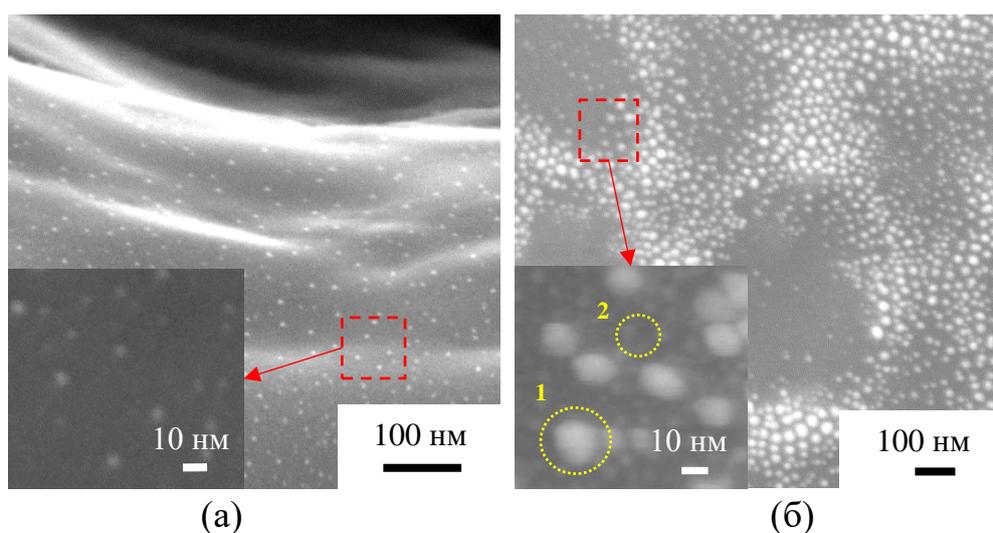


Рисунок 4.7 – Изображения РЭМ покрытий ПЭО TiO₂ после имплантации ионов (а) Ag и (б) Pt

Рисунок 4.7 демонстрирует изображения РЭМ (вид сверху) после обработки поверхности ионами Ag и Pt. Имплантация Ag привела к образованию НЧ Ag размером 3–6 нм (рисунок 4.7а), которые равномерно покрывали поверхность образца, а также присутствовали внутри пор. Расстояние между НЧ превышало их размер в 8-10 раз. Имплантации ионов Pt привела к образованию крупных НЧ Pt диаметром 10–20 нм (рисунок 4.7б (область 1)) и маленьких НЧ с размером менее 5 нм (рисунок 4.7б (область 2)).

Распределение НЧ на поверхности образца было менее однородным, чем для ПЭО- TiO_2/Ag покрытия. Основное количество НЧ Pt находилось на выступах покрытия (рисунок 4.7б). НЧ на поверхности ПЭО- TiO_2 были исследованы методом РФЭС и электронной оже-спектроскопии (рисунок 4.8).

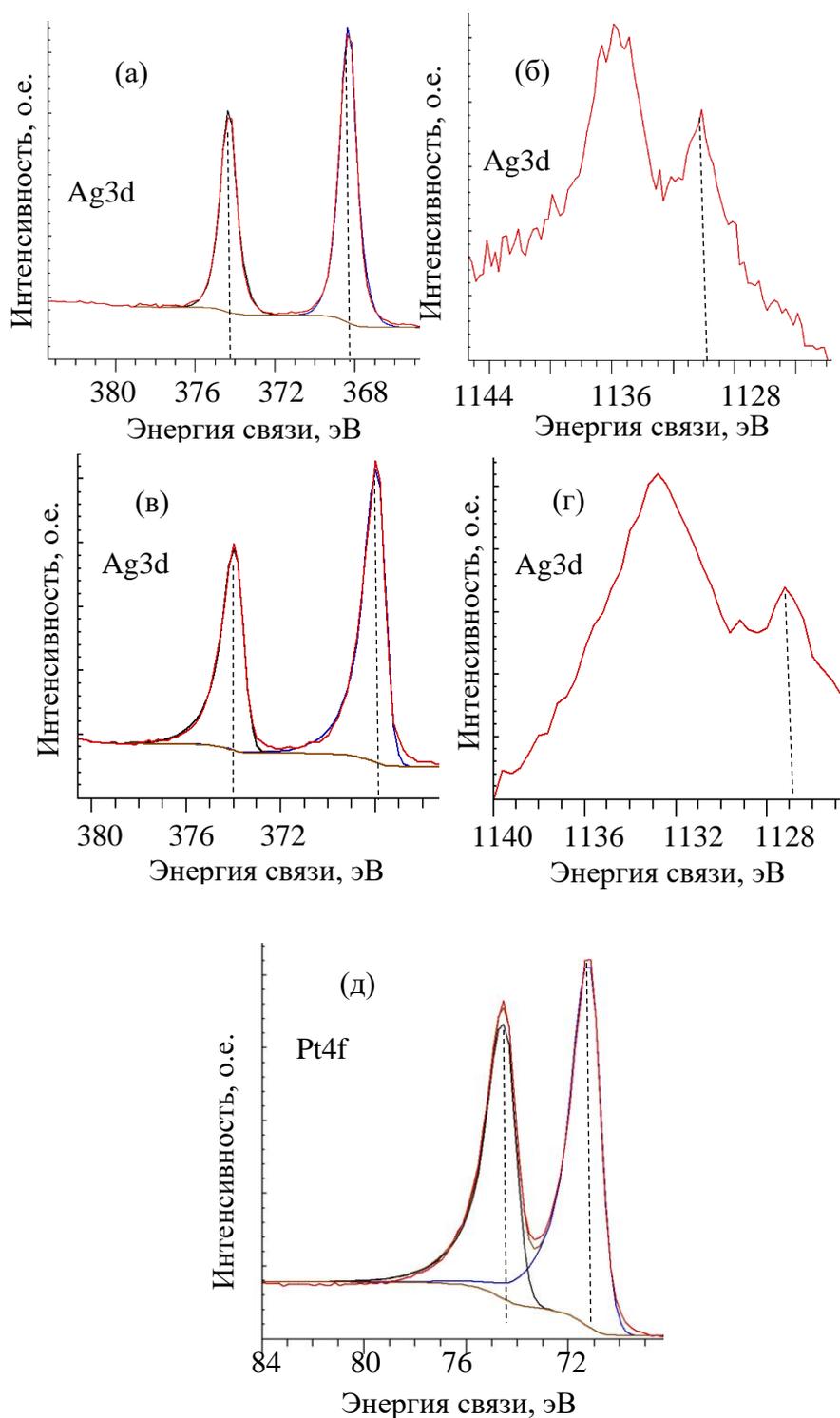


Рисунок 4.8 – Спектры (а,в,д) РФЭС высокого разрешения (д) ПЭО- TiO_2/Pt и (а,в) ПЭО- TiO_2/Ag покрытий с аппроксимацией и (б,г) спектры электронной оже-спектроскопии (а,б) до и (в,г) после травления поверхности

Пики РФЭС спектра Pt4f имели асимметричную форму и находились в положениях 71,1 и 74,5 эВ, что типично для металлической Pt (рисунок 4.8д). Спектры Ag3d были изучены до (рисунок 4.8а) и после травления ионами Ar⁺ при 2 кВ в течение 2 мин (рисунок 4.8в). Образец без ионного травления имел в спектре Ag3d почти симметричный дублет с положениями пиков при 368,1 и 374,3 эВ. Положения пиков РФЭС для оксида и металла близки (368,1±0,1 (Ag), 367,7±0,1 (Ag₂O) и 367,3±0,1 (AgO)) [261], однако форма пика Ag3d_{5/2} свидетельствует об окисленном состоянии НЧ Ag. Травление ионами Ar⁺ привело к уширению пиков спектра Ag3d, нарушению их симметричности и смещению в сторону более низких значений ЭС (367,9 и 374 эВ), что типично для металлического Ag.

Оже-спектры покрытия ПЭО-TiO₂/Ag до и после травления ионами Ar⁺ представлены на рисунке 4.8б,г. Оже параметр α' (ОП) был рассчитан с использованием следующего уравнения:

$$\text{ОП} = \text{ЭС}_{\text{РФЭС}} + h\nu - E, \quad (4.1)$$

где ЭС_{РФЭС} – энергия связи, E – наблюдаемая энергия связи оже-электронов, hν – энергия фонона, используемого для РФЭС.

Значения ОП до (724,8 эВ) и после травления Ar⁺ (726,0 эВ) позволили подтвердить окисленное и металлическое состояние НЧ Ag, соответственно [260].

4.5. Выход ионов

Целью данного раздела являлось изучение кинетики выхода ионов Са, Р, Ag и Pt. Выход ионов исследовали в течение 72 часов, измеряя концентрацию ионов в растворе через 3, 12, 24, 48 и 72 часа (рисунок 4.9) выдержки образцов.

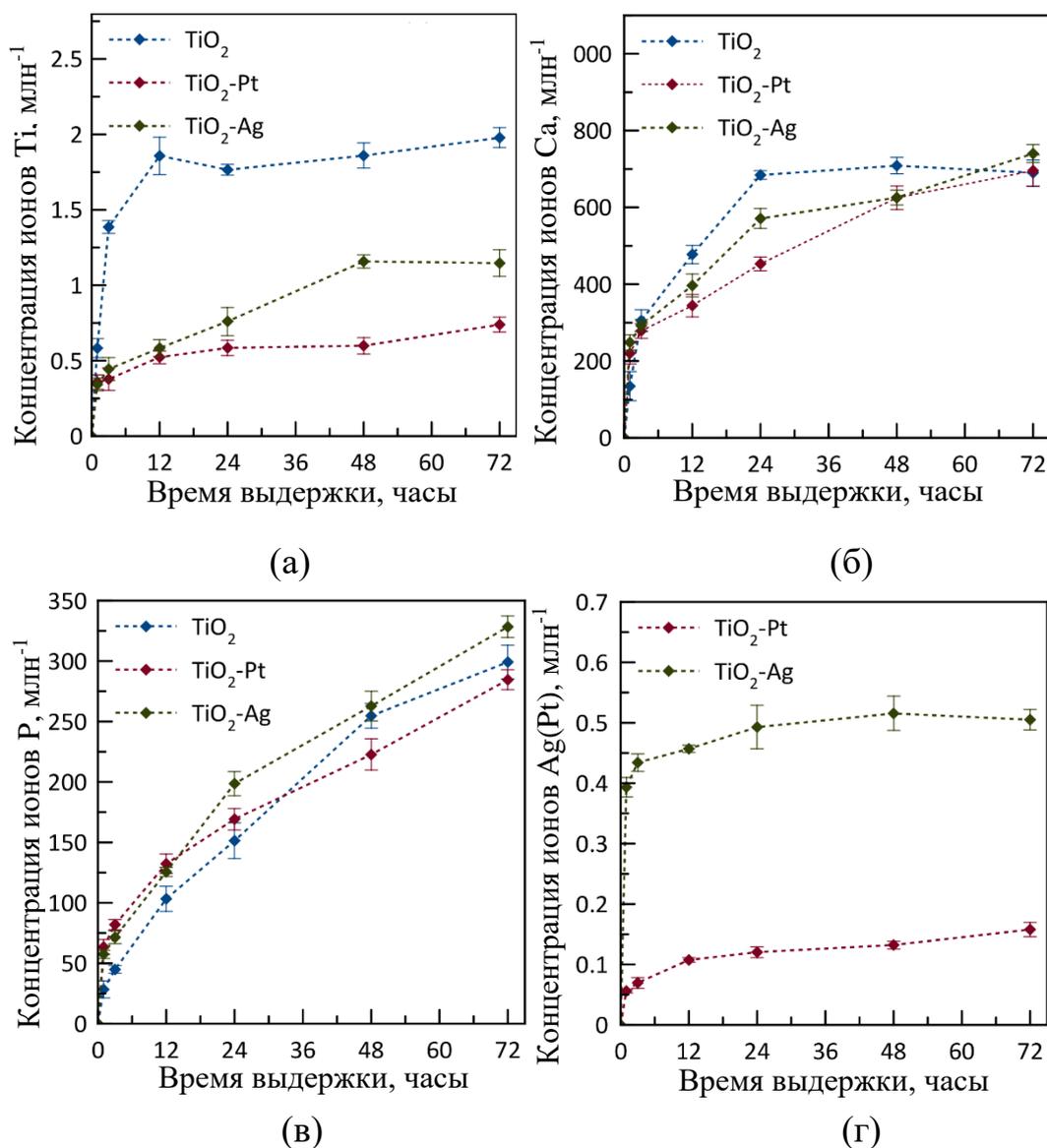


Рисунок 4.9 – Концентрации ионов (а) Ti^+ , (б) Ca^{2+} , (в) P^{3-} и (г) Pt^{2+} , Ag^+ , выходящих в ФР с течением времени

На рисунке 4.9 показана зависимость содержания ионов Ti^+ , Ca^{2+} , P^{3-} и Pt^{2+} и Ag^+ от времени. Для образца TiO_2 концентрация ионов Ti^+ быстро увеличивалась до $1,4 \text{ млн}^{-1}$ в течение 3 часов, достигала значения $1,85 \text{ млн}^{-1}$ через 12 часов и далее оставалась постоянной в диапазоне $1,75\text{--}1,9 \text{ млн}^{-1}$ (рисунок 4.9а). Концентрация ионов Ti^+ для образца ПЭО- TiO_2/Pt быстро увеличивалась до $0,35 \text{ млн}^{-1}$ в первые 3 часа, затем высвобождение замедлилось и прекратилось на уровне $0,6\text{--}0,7 \text{ млн}^{-1}$ через 12 часов. Покрытие ПЭО- TiO_2/Ag обеспечило концентрацию $0,35 \text{ млн}^{-1}$ ионов Ti^+ в первые 3 часа, которая затем достигла значений $1,2 \text{ млн}^{-1}$ после 48 часов и высвобождение прекратилось. Кинетика высвобождения Ca^{2+} для всех покрытий была похожей.

Са быстро растворялся в ФР, и через 3 часа его концентрация достигла 250 млн^{-1} (рисунок 4.9б), затем происходило медленное увеличение содержания ионов Са до значений $600\text{--}700 \text{ млн}^{-1}$ через 48 часов. Среднее количество ионов Р постепенно увеличивалось с $45\text{--}80 \text{ млн}^{-1}$ (3 часа) до $285\text{--} \text{ млн}^{-1}$ (72 часа) для всех покрытий (рисунок 4.9в). Концентрация ионов благородных металлов быстро увеличивалась до $0,05 \text{ млн}^{-1}$ (Pt) и $0,4 \text{ млн}^{-1}$ (Ag) в течение 3 часов, затем выход ионов замедлился и через 72 часа их концентрация не превышала $0,13 \text{ млн}^{-1}$ (Pt) и $0,5 \text{ млн}^{-1}$ (Ag) (рисунок 4.9г)

Обобщая результаты исследований, можно сделать вывод, что:

- а) быстрое высвобождение ионов происходило в первые 3 часа, затем замедлялось, а после 24 часов прекращалось;
- б) присутствие НЧ замедляет выход ионов Ti;
- в) концентрация Р увеличивается непрерывно;
- д) концентрация ионов Pt очень низкая и не превышает $1,3 \text{ млн}^{-1}$.

4.6. Генерация АФК

Целью данного раздела было изучение влияния НЧ Ag и Pt на количество генерируемых TiO_2 покрытиями АФК.

Концентрацию АФК измеряли после воздействия УФ и видимого света в течение 1 часа, а также после выдержки образцов в темноте (рисунок 4.10). Площадь поверхности образцов, использованных в тестах генерации АФК, составляла $10,5 \times 10^8 \text{ мкм}^2$.

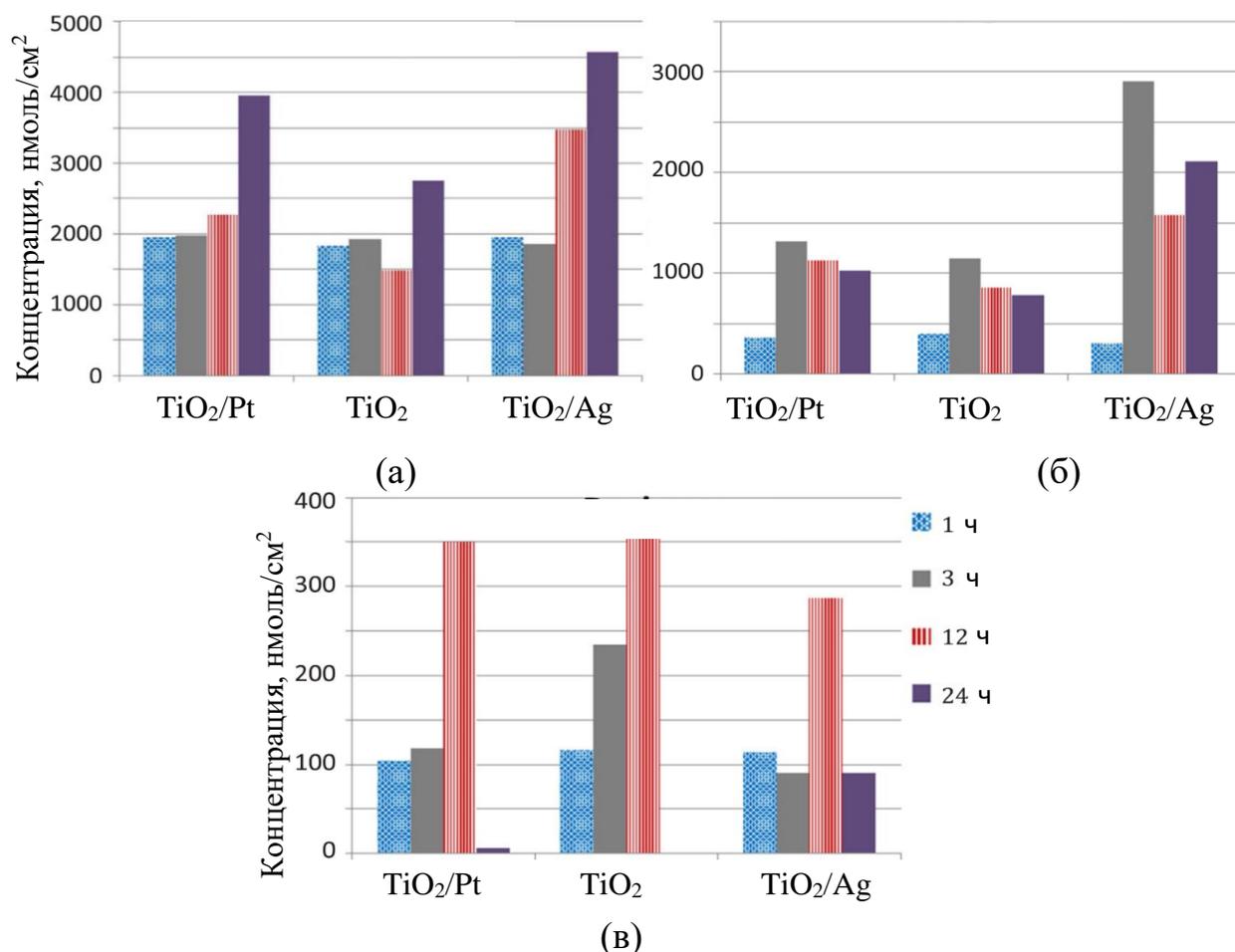


Рисунок 4.10 – Концентрация АФК, образующихся в ФР после воздействия (а) УФ-облучения (1 час), (б) солнечного света (1 час) и (в) темноты

Гистограммы рисунка 4.10 показывают, что инкубация образцов после УФ облучения в течение 3 часов в ФР привела к образованию 1835–1980 нмоль/см² АФК для всех образцов. Разница в концентрации АФК между образцами возрастает при увеличении времени выдержки. Максимальная концентрация АФК 2750 (ПЭО-TiO₂), 3960 (ПЭО-TiO₂/Pt) и 4565 нмоль/см² (ПЭО-TiO₂/Ag) была достигнута через 24 часов выдержки (рисунок 4.8а). Присутствие НЧ Ag и Pt соответственно в 2 и 1,5 раза увеличило максимальную концентрацию АФК после воздействия УФ облучения.

При облучении солнечным светом абсолютные концентрации АФК снизились для всех покрытий. Максимальные концентрации АФК были зафиксированы через 6 часов и составляли 1150 (ПЭО-TiO₂), 1315 (ПЭО-TiO₂/Pt) и 2905 нмоль/см² (ПЭО-TiO₂/Ag). Покрытие ПЭО-TiO₂/Ag генерировало в три раза больше АФК в сравнении с ПЭО-TiO₂/Pt и ПЭО TiO₂

(рисунок 4.10б). Через 6 часов концентрация АФК снижалась. Даже в темноте все образцы генерировали некоторое количество АФК с максимальной концентрацией через 12 ч (рисунок 4.10в) 360 (TiO_2), 350 (ПЭО- TiO_2/Pt) и 290 нмоль/ cm^2 (ПЭО- TiO_2/Ag), которая была на порядок ниже чем после УФ воздействия. Количество АФК, генерируемых покрытиями TiCaPCON с НЧ в аналогичных условиях, было на три порядка ниже (глава 3).

Результаты исследований позволили установить, что:

- а) все покрытия генерируют АФК под действием УФ излучения и солнечного света;
- б) НЧ Pt и Ag на поверхности TiO_2 повышают количество генерируемых после УФ воздействия АФК в 1,5 и 2 раза, соответственно;
- в) покрытия с НЧ Ag эффективнее генерировали АФК, чем покрытия с НЧ Pt, особенно после воздействия солнечного света;

4.7. Исследование влияния НЧ на гидрофильность покрытий

Гидрофильность поверхности благоприятно сказывается на распластывании и дифференцировке клеток остеобластов [261]. Одним из способов изучения гидрофильности является оценка краевого угла смачивания. Смачиваемость изучали, оценивая угол контакта лежащей капли с поверхностью через 1 час после получения покрытий. Измерения проводили с интервалом 0, 6 и 10 мин (таблица 4.2).

Таблица 4.2. Контактный угол смачивания

Образцы	Угол контакта, °		
	0 мин	5 мин	10 мин
TiO_2	87±2	60±2	30±2
ПЭО- TiO_2/Pt	99±2	77±2	39±2
ПЭО- TiO_2/Ag	98±2	77±2	41±2

Покрытие ПЭО TiO_2 без НЧ имело КУС около 87°, что говорит о слабых гидрофильных свойствах. Оба покрытия с НЧ на поверхности, показали

значения краевых углов $98\text{--}99^\circ$, что свидетельствует о гидрофобности их поверхностей. Длительное нахождение каплей на поверхности образца привело к их растеканию с течением времени. Угол смачивания уменьшался до 77° через 5 мин и до $39\text{--}41^\circ$ через 10 мин. Растекание каплей воды связано с проникновением жидкости в поры покрытия.

4.8. Исследование влияния НЧ на биоактивность покрытий *in vitro*

Целью данного раздела было исследование влияния НЧ на биоактивность исходных ПЭО TiO_2 покрытий *in vitro*.

Модельные эксперименты на биоактивность были проведены в SBF в течение 28 дней для покрытий ПЭО TiO_2/Pt и ПЭО TiO_2/Ag (рисунок 4.11)

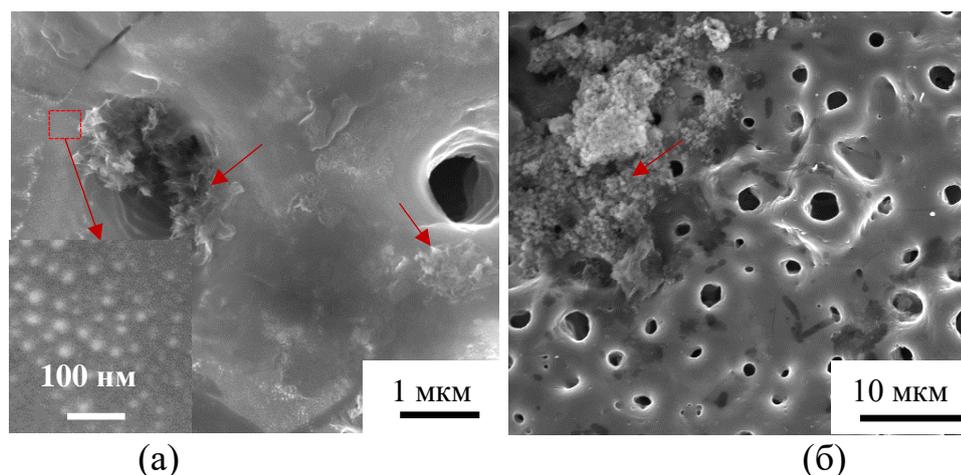


Рисунок 4.11 – Изображения РЭМ образцов (а) TiO_2/Pt и (а) TiO_2/Ag после выдержки в SBF в течение 28 дней

Поверхность исходного образца ПЭО TiO_2 была покрыта игловидными выделениями СаР-фазы (раздел 4.3). В случае образцов с НЧ Pt и Ag на поверхности наблюдались скопления наночастиц на основе СаР (стрелки на рисунке 4.5а,б). ЭДС анализ показал, что соотношение Са/Р в агломератах ниже 1,67. Это свидетельствует о том, что они являются фазой-предшественником ГА. Поверхность контроля (Ti) была лишена этих выделений.

ГЛАВА 5. Разработка покрытий в системе $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-B}$

Биосовместимость покрытий TiCaPCON клинически доказана и сочетается с превосходными механическими свойствами. Эти покрытия наносятся магнетронным распылением СВС мишени, что позволяет вводить в рамках одного технологического цикла большое количество элементов. Однако, перечень биосовместимых компонентов в покрытии можно расширить за счет распыления дополнительной мишени. Показано (глава 1), что бор (В) является перспективным элементом, способным улучшить биосовместимость и биоактивность материала. Ряд соединений бора, например, борная кислота, обладают бактерицидными свойствами. Известен подход, основанный на присоединении к поверхности антибиотиков за счет их химического или механического связывания с поверхностью. Однако, применение антибиотиков связано с рядом недостатков, которые были описаны в литературном обзоре (глава 1). Нанесение растворимого В-содержащего соединения на поверхность имплантата может также обеспечить антибактериальные свойства. Целью настоящего раздела являлось изучение влияния бора на микроструктуру покрытий на основе TiCaPCON и осаждение верхнего антибактериального слоя на основе VO_x .

В работе использовались два подхода: бор в покрытие TiCaPCON вводили путем магнетронного распыления дополнительной мишени TiB_2 , а антибактериальный слой на основе VO_x создавали методом ионного распыления мишени V_2O_3

5.1. Исследование влияния бора на состав и структуру покрытий

Целью настоящего раздела являлось изучение влияния тока на магнетроне на концентрацию В, структуру и фазовый состав покрытий TiCaPCON .

Распределение элементов по глубине, толщина и атомный состав покрытий были определены методом ОЭСТР (рисунок 5.1 и таблица 5.1).

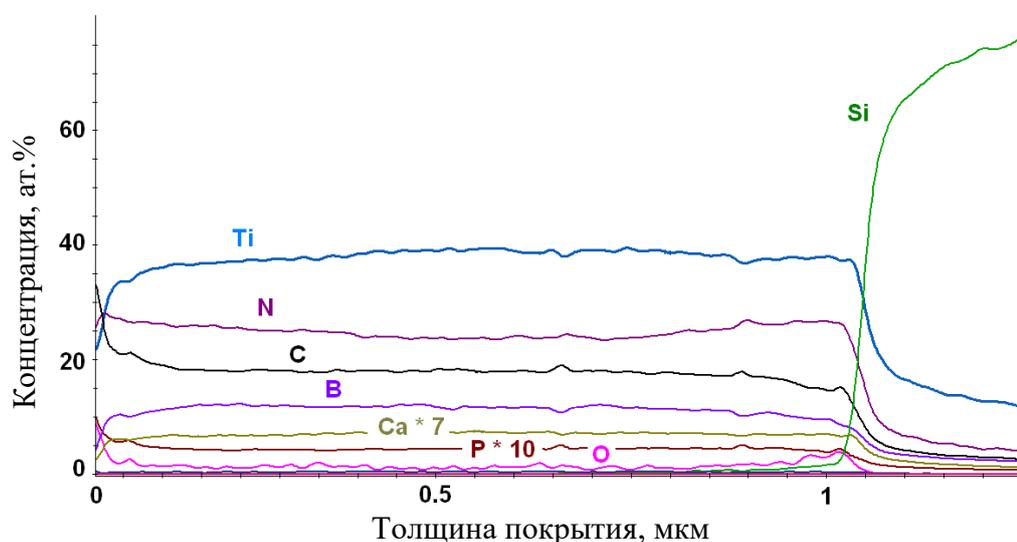


Рисунок 5.1 - Профили распределения элементов по толщине покрытия TiCaPCON–11% B

Таблица 5.1. Элементный состав TiCaPCON-B покрытий

Ток на магнетроне (мишень TiB ₂), А	Концентрация, ат, %						
	Ti	N	C	O	Ca	P	B
1,0	36,0	28,6	21,2	5,3	1,1	0,4	8,4
1,2	40,0	24,4	19,1	2,1	1,2	0,5	10,7
1,4	32,3	32,3	15,1	4,0	0,8	0,5	15,0

Концентрационные профили элементов показали, что все элементы равномерно распределены по всей глубине покрытия TiCaPCON-B толщиной 1 мкм. Увеличение тока магнетрона с мишенью TiB₂ с 1 до 1,2 и 1,4 А приводит к возрастанию концентрации В с 8,0 до 11,0 и 15,0 ат.%. Также наблюдается увеличение содержания N и уменьшение C. Интенсивное распыление мишени TiB₂ при 1,4 А приводит к снижению содержания Ca в слое в два раза с 1,6 до 0,8 ат. %.

Структуру и толщину покрытий изучали методом РЭМ (рисунок 5.2).

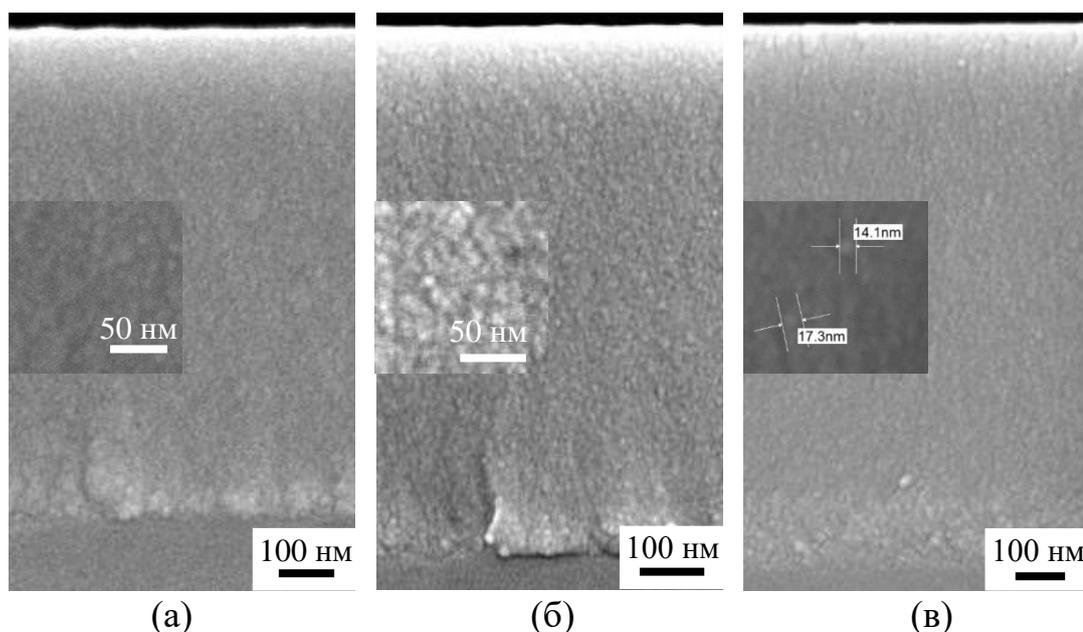


Рисунок 5.2 – Изображения РЭМ поперечного сечения покрытий TiCaPCON-V с 8 (а), (б) 11 и (в) 15 ат.% В

Толщина покрытий согласно рисунку 5.2 составляла 0,85–1,12 мкм, что согласуется с данными ОЭСТР. Увеличение толщины покрытия связано с увеличением мощности распыления мишени TiV₂ и, соответственно, скорости осаждения покрытий. Морфология покрытий состоит из зерен размером не более 20 нм (рисунок 5.2в (вставка)). Переходный слой 100 нм на границе раздела покрытие/подложка образовался в процессе ионной имплантации, проводимой в первые минуты магнетронного осаждения. Структура покрытий не зависела от концентрации В.

Исходное покрытие TiCaPCON содержало элементы Ti – 43,3, Ca – 1,6, С – 31,5, О – 8,2, N – 15,4 ат.%. Основной структурной составляющей была фаза Ti(C,N), окруженная аморфной матрицей (глава 3, раздел 3.2). Возможность образования новых В-содержащих фаз предварительно оценивалась на основе анализа фазовой диаграммы системы Ti-V-N, исходя из допущения, что атомы С могут замещать атомы N в неметаллической подрешетке Ti(C,N). Исходя из элементного состава покрытий таблицы 5.1., было определено положение покрытий на фазовой диаграмме Ti-V-N(C) (рисунок 5.3).

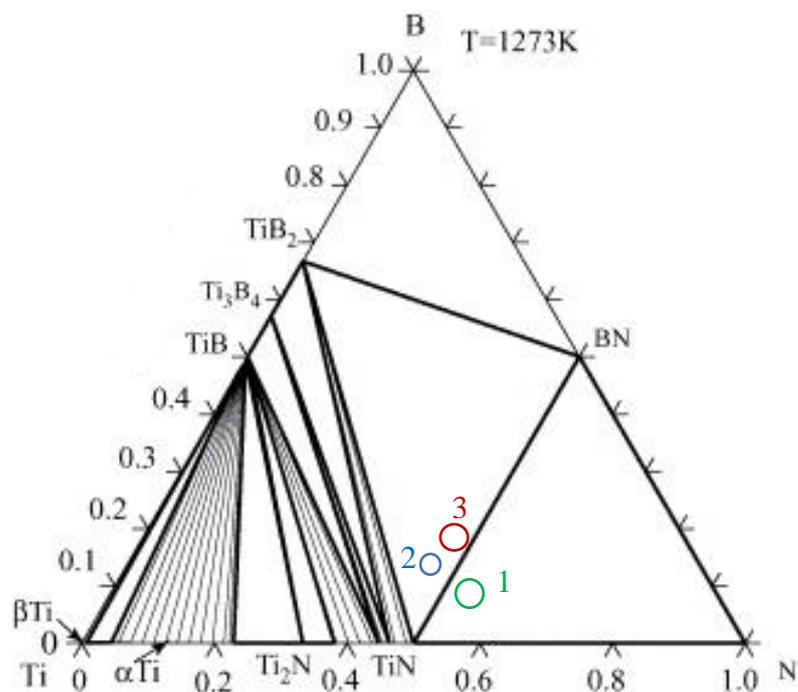


Рисунок 5.3 – Изотермический разрез системы Ti–B–N при 1273 К [262]

Анализ изотермического разреза системы Ti–B–N позволил установить, что составы покрытий с высокой вероятностью находятся в областях $TiB_2+TiN+BN$ (покрытия 2 и 3) и $TiN+BN+N$ (покрытие 1) (рисунок 5.3). Это может свидетельствовать о наличии различий в фазовом составе покрытий с 8 ат. % и покрытий с 11 и 15 ат. % В.

Согласно элементному составу, приведенному в таблице 5.1, покрытия имеют избыток углерода, необходимого для образования фазы $Ti(C,N)$. Было выдвинуто предположение, что этот избыток углерода выделяется в виде аморфной фазы. Фазовый состав покрытий TiCaPCON экспериментально был изучен методом РФА рисунок 5.4.

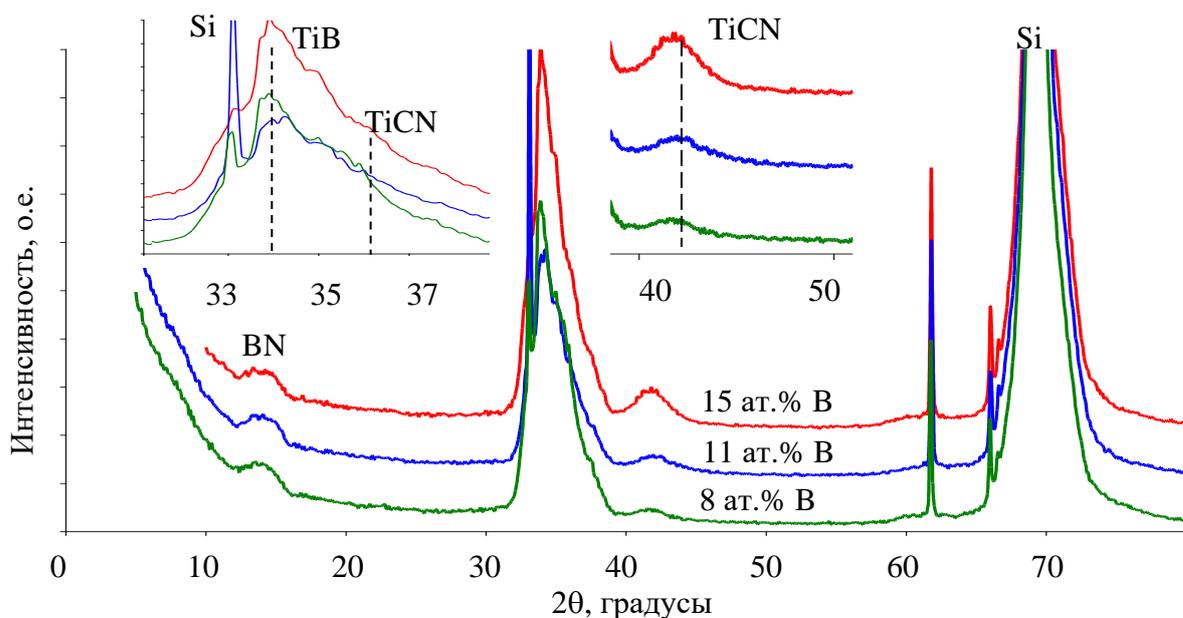


Рисунок 5.4 – Дифрактограммы покрытий TiCaPCON-B с содержанием 8 ат.% (зеленые), 11 ат.% (синие) и 15 ат.% (красные) В

Дифрактограммы покрытий TiCaPCON-B с 8, 11 и 15 ат.% В, полученные методом РФА, представлены на рисунке 5.4. Широкие максимумы в диапазоне 33–37° 2θ были разложены на два дублета, которые отнесли к фазам Ti(C,N) и TiB₂ (вставка). Соотношение интенсивностей пиков TiB₂/Ti(C,N) увеличивалось с 2 (8 ат.% В) до 2,35 (11 ат.%) и 2,75 (15 ат.%) с увеличением концентрации В в покрытиях. Острый пик при 33°2θ являлся сигналом от подложки Si, а широкие максимумы низкой интенсивности, расположенные между 10 и 20° 2θ, были отнесены к фазе BN (JCPDS №18–0251). Структура покрытий была дополнительно изучена методом ПЭМ и ПЭМВР (рисунок 5.5).

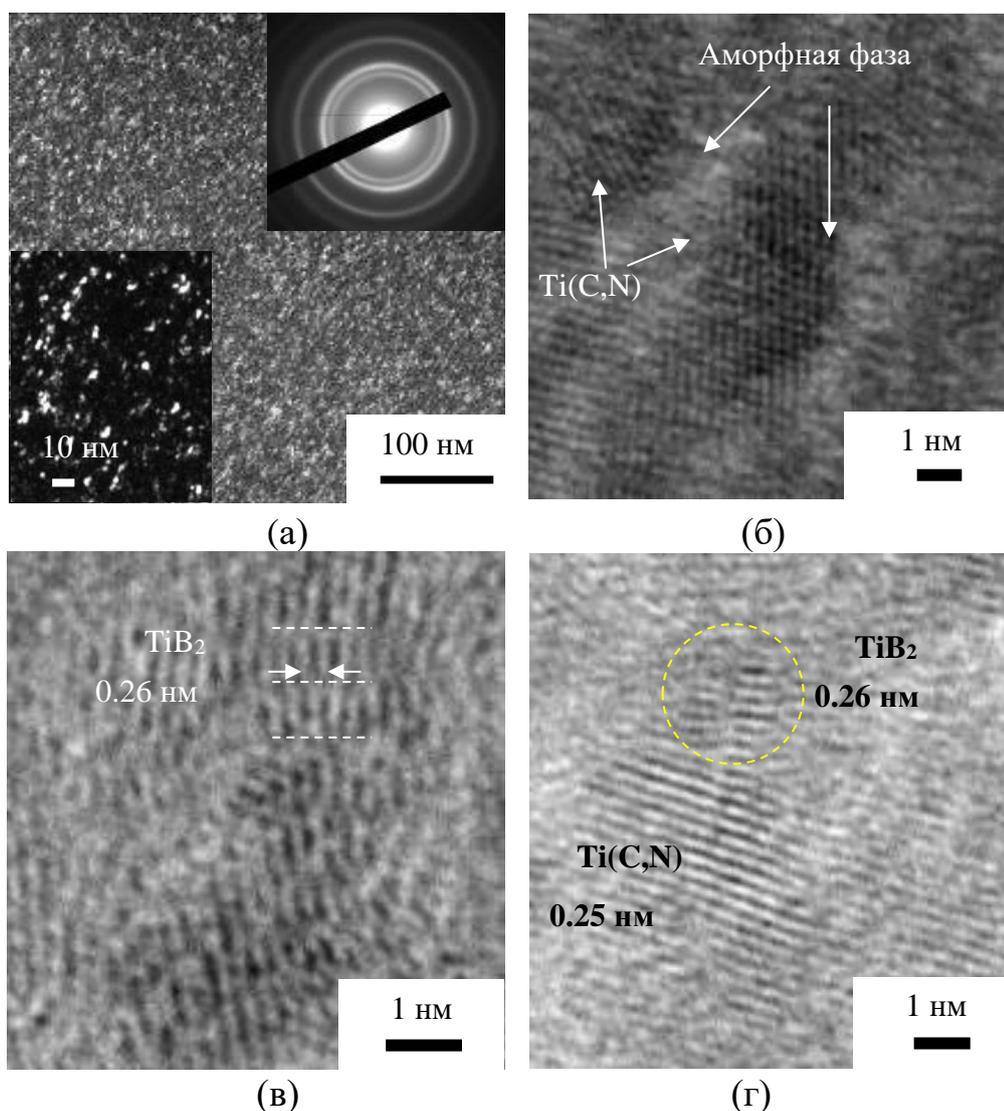


Рисунок 5.5 – Изображение (а,б) темнопольной ПЭМ и (в,д) ПЭМВР и электронограмма (вставка)покрытия TiCaPCON-11% В

На рисунке 5.5 приведены изображения, полученные методом темнопольной ПЭМ и ПЭМВР. Размер зерен фазы Ti(C,N) в покрытиях TiCaPCON-В составляет 2-6 нм (рисунок 5.5а). Дифракция электронов с выбранной области продемонстрировала наличие отражений от плоскостей (111), (200) и (220), характерных для фазы ГЦК Ti(C,N). Нанокристаллические зерна Ti(C,N) окружены аморфной матрицей (рисунок 5.5б). На ряде изображений наблюдается полосчатый контраст с шагом 0,25-0,26 нм (рисунок 5.5в,г), который совпадает с межплоскостным расстоянием фазы TiB₂, хотя эта фаза не была обнаружена на элеткхронограмме. На границах зерен TiB₂ обнаружено большое количество дислокаций.

Результаты исследования позволяют утверждать:

- а) введение В привело к образованию новых фаз TiB_2 , BN ;
- г) введение В привело к измельчению исходной структуры покрытия и уменьшению зерен $Ti(C,N)$ фазы в три раза с 6-15 нм до 2-6 нм.

5.2. Исследование влияния В на химическое состояние поверхности

Поверхность покрытий была исследована методами спектроскопии КР и ИК-Фурье (рисунок 5.6).

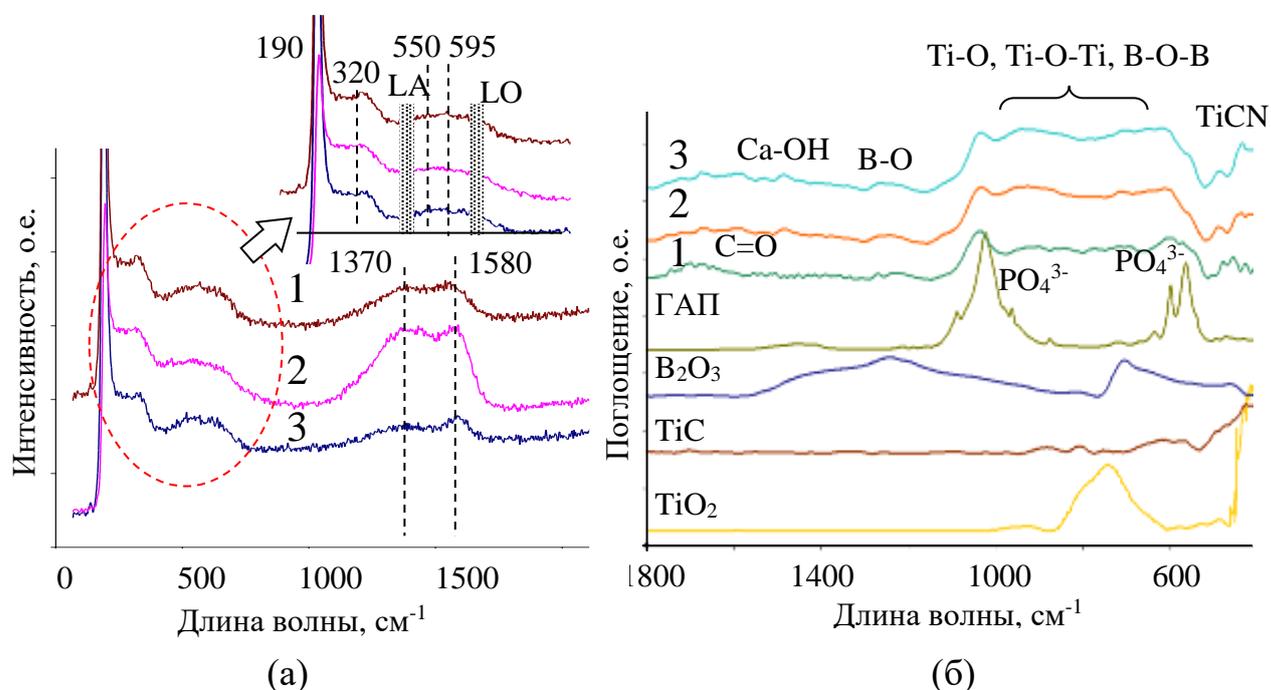


Рисунок 5.6 – Спектры (а) КР и (б) ИК-Фурье покрытий $TiCaPCON-B$ с (1) 8 ат.%, (2) 11 ат.% В, (3) 15 ат.% В и образцов сравнения

Отметим следующие особенности спектров КР (рисунок 5.6а):

- (а) сильный пик около 190 см^{-1} , который можно отнести к моде E_g фазы анатаза TiO_2 [263];
- (б) широкий пик в диапазоне $320\text{--}380\text{ см}^{-1}$, являющийся следствием наложения пиков LA от TiN (315 см^{-1}) и TiC (386 см^{-1});
- (в) широкий максимум при 570 см^{-1} , который является результатом наложения TO моды TiN (550 см^{-1}) и TiC (595 см^{-1}), а также 2A- акустической

(TiN) и LO-оптической (TiC) моды второго порядка, расположенных примерно при 450 и 675 см^{-1} [264];

(г) два широких пика при 1370 и 1580 см^{-1} , которые можно отнести к фазе TiB_2 [265,266].

Максимумы в положениях 1370 и 1580 см^{-1} также могут соответствовать графиту. Однако, покрытие TiCaPCON-11\% B имело максимальную интенсивностью сигнала в диапазоне 1250–1600 см^{-1} при минимальном содержании углерода (таблица 5.1). Это свидетельствует о том, что пики 1250–1600 см^{-1} связаны с присутствием именно фазы TiB_2 .

На рисунке 5.6б приведены ИК-спектры образцов сравнения TiO_2 , TiC, V_2O_3 и ГА, а также покрытий TiCaPCON-B . ИК спектры покрытий сильно не различались. Острый интенсивный пик при 430–500 см^{-1} принадлежал фазе Ti(C,N) . Характерной особенностью всех спектров являлась широкая полоса поглощения в диапазоне 550–1050 см^{-1} . Это может быть следствием наложения сигналов от кислородсодержащих соединений на окисленной поверхности (связи Ti-O и Ti-O-Ti в решетке TiO_2 ; B-O-B изгибающие и B-O растягивающие колебания в боратных соединениях) [267-270]. Пик при 1035 см^{-1} характерен для групп PO_4^{3-} , хотя его также можно отнести к C-O группам. Спектр поглощения V_2O_3 имеет характерный сигнал в районе 1250 см^{-1} , связанный с B-O растягивающими колебаниями в VO_x соединениях [267]. Аналогичный сигнал был обнаружен на всех спектрах TiCaPCON-B покрытий. Широкие пики при 1700 и 1500 см^{-1} отнесли к группам карбонила (C=O) и связям Ca-OH, соответственно, а полосы поглощения выше 3500 см^{-1} , свидетельствовали о присутствии молекулярной воды на поверхности образцов. Поверхность некоторых покрытий была дополнительно изучена методом РФЭС (рисунок 5.7).

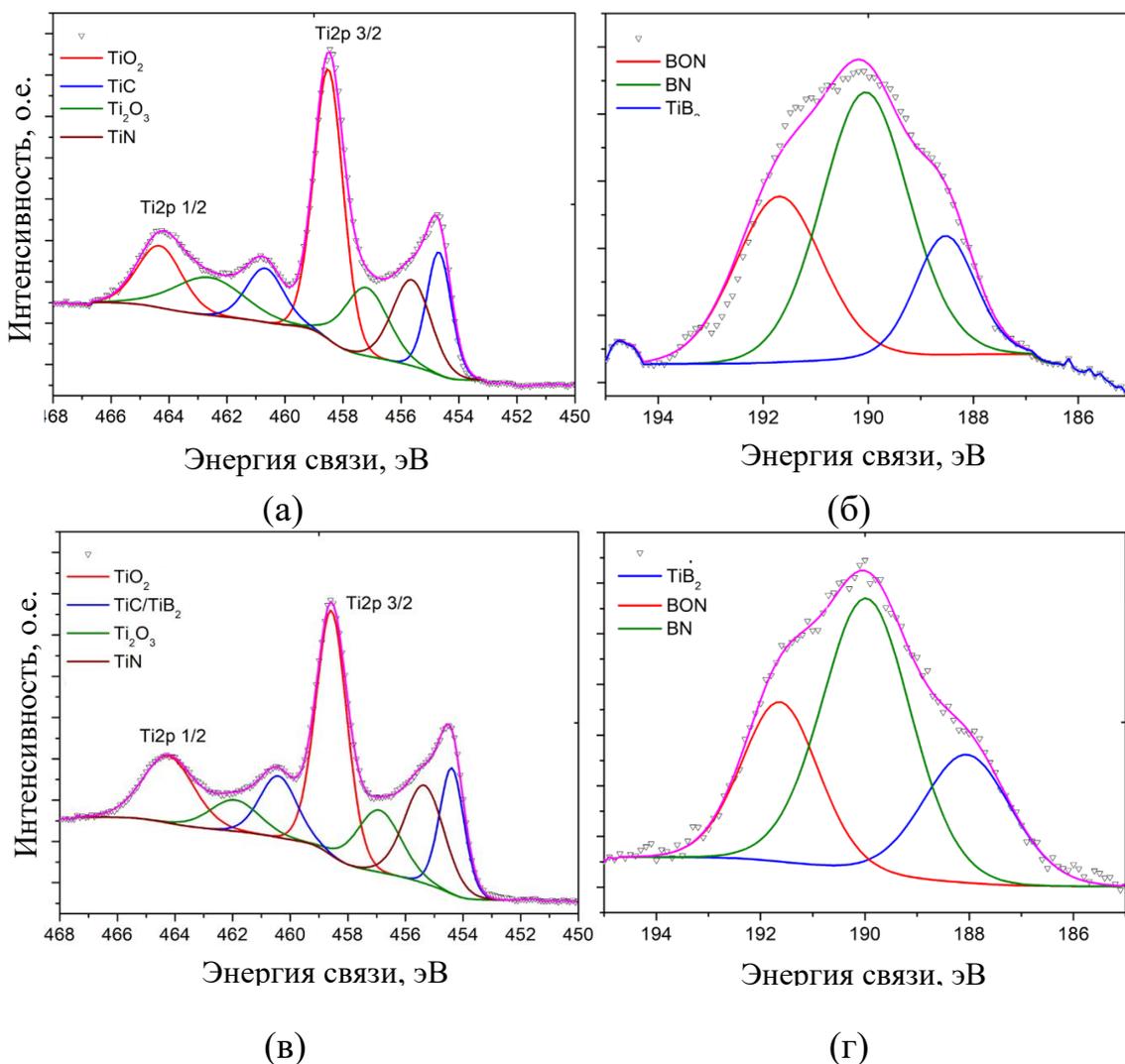


Рисунок 5.7 – Спектры РФЭС (а,в) Ti2p и (в,г) B1s и их аппроксимация для покрытий (а) TiCaPCON, (б) TiCaPCON-8% В, (в, г) TiCaPCON-11% В

Характерные спектры РФЭС Ti2p и B1s покрытий TiCaPCON, TiCaPCON-8% В и TiCaPCON-11% В представлены на рисунке 5.7. Эти покрытия были выбраны из-за оптимального содержания Са. Спектры Ti2p были разложены на четыре компонента: TiC (TiC/TiB₂ в случае образцов, легированных В), TiN, Ti₂O₃ и TiO₂ [268,271]. Спектры B1s были разложены на три компонента: TiB₂, BN_xO_y и BN [269,270].

Методом РФЭС определены концентрации элементов на поверхности покрытий (таблица 5.2), и процентное содержание соединений на основе Ti и В с их энергиями связи (ЭС) (таблицы 5.3 и 5.4).

Таблица 5.2. Атомная концентрация элементов (РФЭС)

Образец	Концентрация, ат.%					
	[Ti]	[Ca]	[C]	[O]	[N]	[B]
TiCaPCON	12,3	1,5	48,2	29,0	9,1	0,0
TiCaPCON-8%B	12,3	1,2	43,9	28,6	8,5	5,5
TiCaPCON-11%B	10,5	1,0	38,6	24,3	10,0	15,6

Таблица 5.3. Процентное соотношение Ti-содержащих фаз

Образец	Энергия связи, эВ			
	458.6±0.1	457.2±0.1	455.9±0.1	455.0±0.1
	Ti связи, %			
	TiO ₂	Ti ₂ O ₃	TiN	TiC/TiB ₂
TiCaPCON	48.2	17.4	14.8	19.6
TiCaPCON-8%B	49.0	10.8	20.4	18.8
TiCaPCON-11%B	47.0	19.0	5.2	28.6

Таблица 5.4. Процентное соотношение B-содержащих фаз

Образец	Энергия связи, эВ				
	194.1	192.9	192 ±0.2	190.2±0.2	188.1±0.2
	B связи, %				
	B ₂ O ₃	BO _x	BN _x O _y	BN	TiB ₂
TiCaPCON-8%B	0.0	0.0	32.0	52.0	16.0
TiCaPCON-11%B	0.0	0.0	25.0	51.0	24.0

Результаты РФЭС подтвердили наличие в покрытиях TiCaPCON-B фазы BN и фазы TiB₂, количество которой зависит от концентрации B, что подтверждает данные РФА (раздел 5.1). Кроме окисленного состояния титана (TiO₂ и Ti₂O₃) на поверхности была обнаружены фаза BN_xO_y, что подтверждает данные ИК-Фурье спектроскопии (рисунок 5.6б). Увеличение концентрации B привело к увеличению количества фазы TiB₂,

5.3. Исследования влияния B на свойства покрытий

Целью данного раздела являлось исследование смачиваемости и электрохимических свойств покрытий TiCaPCON-B.

Было изучено коррозионное поведение TiCaPCON-B в ФР и определен краевой угол смачивания покрытий (рисунок 5.8 и таблица 5.5)

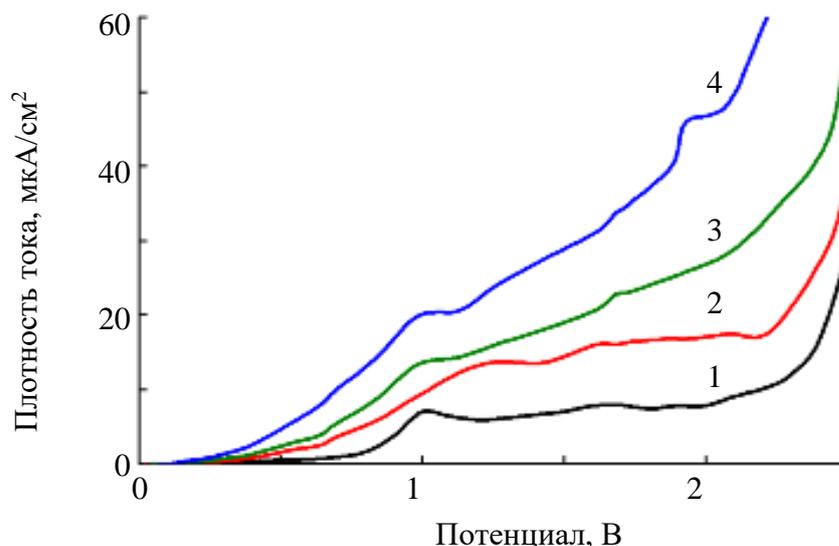


Рисунок 5.8 – Стандартные АПП кривые покрытий. 1 - TiCaPCON, 2 - TiCaPCON-8% В, 3 - TiCaPCON-11% В, 4 - TiCaPCON-15% В

Таблица 5.5. Электрохимические характеристики и смачиваемость покрытий

Образец	Потенциал коррозии, В	Плотность тока, мА /см ²	Контактный угол, °.	
			1 ч	24 ч
TiCaPCON	0.25	0.01	-	-
TiCaPCON-8%В	0.23	0.01	42±1	72±4
TiCaPCON-11%В	0.23	0.03	51±4	71±2
TiCaPCON-15%В	0.24	0.03	56±4	73±3

Краевой угол смачивания был измерен через 1 и 24 часа после нанесения покрытий. Измерения показали, что все поверхности являлись гидрофильными со значениями краевого угла от 42 до 56°. Выдержка образцов на воздухе в течение 1 суток привела к увеличению контактного угла смачивания до 71-73°, но гидрофильные свойства сохранились.

Введение бора не привело к изменению потенциала свободной коррозии покрытий TiCaPCON. Стабильно низкие значения потенциала коррозии при любой концентрации В указывали на формирование качественной пассивной пленки. Начальные участки (ниже 0,5 В) анодных поляризационных кривых (рисунок 5.8б) позволили оценить поведение покрытий в биологической среде

(жидкости организма). При низких значениях потенциала коррозии все покрытия находились в стабильном пассивном состоянии. Характерный для покрытия TiCaPCON без В пик при 1 В связан с процессами растворения Ti и образования защитной оксидной пленки. В случае покрытий TiCaPCON-В пик активации был менее заметным из-за увеличения плотности анодного тока (ПАТ). Наличие качественных пассивных пленок на поверхности образцов подтверждается ходом обратных кривых, лежащих ниже исходных анодных поляризационных кривых. Разрушение покрытий произошло только при потенциале выше 2,5 В. Увеличение содержания В привело к возрастанию ПАТ, что можно объяснить увеличением количества менее устойчивой к окислению TiB₂ фазы и уменьшением доли фазы Ti(C,N).

5.4. Изучение кинетики выхода бора

Кинетика выхода В была изучена методом МС-ИПС в течение 7 суток (рисунок 5.9).

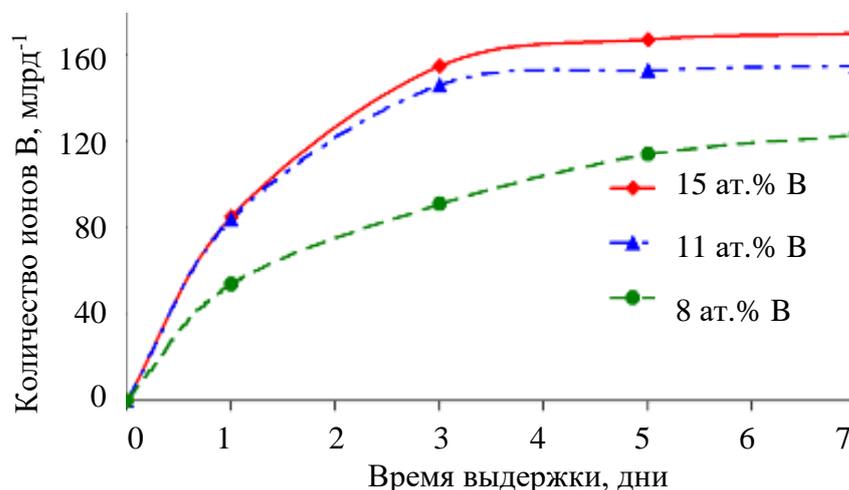


Рисунок 5.9 – Результаты МС-ИСП о количестве вышедших в ФР ионов В из покрытий (1) TiCaPCON, (2) TiCaPCON-8% В, (3) TiCaPCON-11% В, (4) TiCaPCON-15% В

Рисунок 5.9 демонстрирует, что все образцы можно разделить на две группы по кинетике высвобождения В: с медленными и высокими скоростями

высвобождения. В течении первых часов содержание бора в растворе линейно увеличивалось от времени, затем выход ионов В значительно замедлился и прекратился только через 4 (образцы с 11 и 15 ат.% В) и 7 дней (8 ат.% В). За первый день высвободилось примерно 55 и 85 млрд⁻¹ ионов В, а через 3 дня концентрация ионов В достигла 90 и 150 млрд⁻¹ для образцов с низким (8 ат.%) и высоким (11 и 15 ат.%) содержанием В, соответственно. Таким образом, более быстрое высвобождение и наивысшую концентрацию В обеспечивали образцы с 11 и 15 ат.% В.

Критерием любого материала имплантатов является отсутствие токсичности, поэтому выделение ионов должно отвечать критериям безопасности. Уровень безопасной концентрации бора в питьевой воде установлен 40–150 млн⁻¹, что гораздо выше высвобождаемого покрытиями количества [272]. По литературным данным относительно низкая концентрация В (по разным данным, <100 млрд⁻¹ [273] или <8 млн⁻¹ [274]) может быть благоприятна для пролиферации и экспрессии генов остеобластов.

5.5. Создание антибактериального слоя на ВO_x

Целью данного раздела было создание на поверхности TiCaPCON-В покрытий дополнительного антибактериального слоя.

Оптимальным покрытием для модернизации был выбран образец TiCaPCON-11% В, так как он имел высокий уровень высвобождения ионов В и сохранил исходную концентрацию Са (в отличии от покрытия TiCaPCON-15% В). Верхний слой на основе ВO_x был создан ионным распылением мишени В₂О₃. В результате были получены двухслойные покрытия ВO_x/TiCaPCON–11% В (рисунок 5.10).

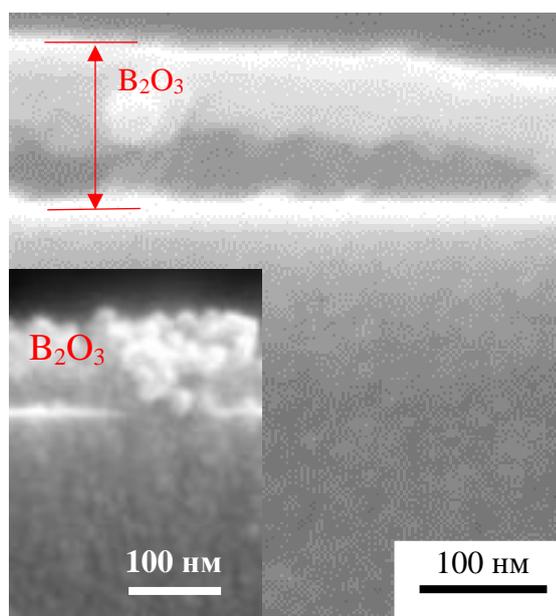


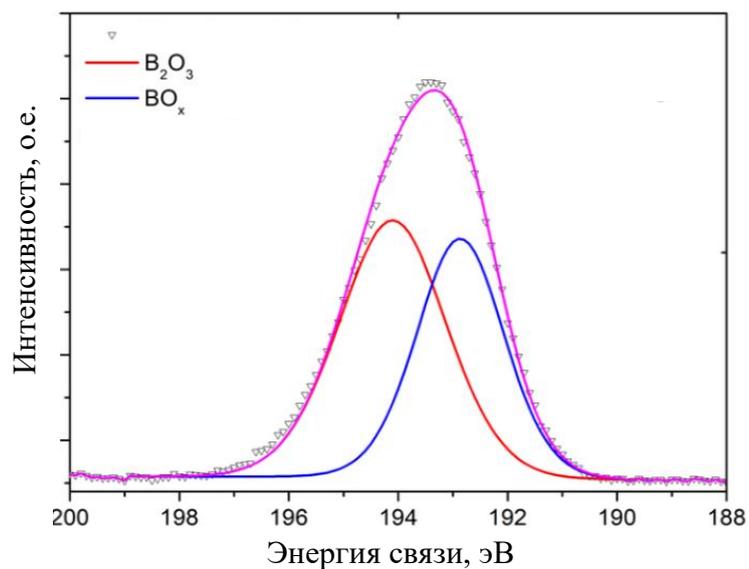
Рисунок 5.10 – Изображения РЭМ поперечного сечения покрытий $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-11ат.}\% \text{ В}$ (вставка – после выдержки на воздухе)

На Рисунке 5.10 показана микроструктура двухслойного покрытия $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-11ат.}\%$ с дополнительной вставкой, демонстрирующей его состояние после выдержки (хранения) на воздухе. Толщина слоя VO_x в покрытиях $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-11}\% \text{ В}$ по данным РЭМ составила примерно 100–120 нм. Длительная выдержка на воздухе приводила к превращению слоя VO_x в отдельные агломераты (рисунок 5.11в) и частичному испарению.

Процентное содержание различных В-содержащих фаз на поверхности двухслойного покрытия $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-11}\% \text{ В}$ было определено методом РФЭС (рисунок 5.11). Результаты анализа приведены на показаны на рисунке 5.11 и в таблице 5.6.

Таблица 5.6. Процентное соотношение В-содержащих фаз в слое VO_x

Образец	Энергия связи, эВ				
	194.1	192.9	192 ± 0.2	190.2 ± 0.2	188.1 ± 0.2
	В связи, %				
	B_2O_3	VO_x	BN_xO_y	BN	TiB_2
$\text{B}_2\text{O}_3/\text{TiCaPCON-11}\% \text{ В}$	57.0	43.0	0.0	0.0	0.0



(в)

Рисунок 5.11 – Спектр РФЭС B1s и его аппроксимация для двухслойного покрытия $BO_x/TiCaPCON-11\% B$

Спектр РФЭС B1s поверхностно-модифицированного образца (рисунок 5.11) показал, что распыление мишени B_2O_3 привело к полному покрытию поверхности образца оксидом бора. Примерно 57% составлял стехиометрический оксид бора (B_2O_3), остальная часть находилась в форме субоксида бора (BO_x).

ГЛАВА 6. Биологические испытания

Биологические испытания покрытий были проведены для определения их антибактериальной активности, биосовместимости и биоактивности. Антибактериальные испытания имплантатов с покрытиями TiCaPCON-Ag,Zn, TiCaPCON-Pt,Fe, ПЭО TiO₂/Ag,Pt и VO_x/TiCaPCON-B были исследованы в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ). Биосовместимость и биоактивность имплантатов с покрытиями TiCaPCON-Ag,Zn, TiCaPCON-Pt,Fe, ПЭО TiO₂/Ag,Pt и VO_x/TiCaPCON-B была изучена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»). Акты испытаний покрытий приведены в приложении А. В данной главе изложены методики и основные результаты испытаний.

6.1. Исследование антибактериальных свойств покрытий

6.1.1 Методика исследования антибактериальных свойств

Антибактериальную активность покрытий оценивали путем подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий с использованием антибиотикоустойчивых клинически изолированных грамотрицательных штаммов *E.coli* K-261 и U20, а также грамположительных *S.aureus* ATCC 25923, 839 и 224/228 (коллекция Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии). Штаммы бактерий культивировали на твердом питательном агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия) или в жидком питательном бульоне (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия). Все покрытия стерилизовали УФ-излучением с расстояния 150 мм в течение 30 или 60 мин и поверхностью с НЧ, обращенной вверх, помещали в стерильный 12-луночного культурального планшета Corning® Costar® (Sigma-Aldrich) с

0,5 мл (или 1,96 мл) физиологического раствора (ФР). Одну лунку без образца и вторую лунку с базовым TiCaPCON или ПЭО TiO₂ покрытием без модификаций использовали в качестве контроля. Все манипуляции с пластинами проводили в асептических условиях, исключая их контакт друг с другом. Затем в каждую лунку добавляли 3 мл суспензии ночной культуры тестируемых штаммов (10⁴-10⁶ КОЕ/мл), полученной в стерильном ФР (9 г/л NaCl) и инкубировали в термостате при 37°C. Аликвоты объемом 0,04 мл отбирали для каждого образца после инкубации в течение 3 и 24 ч (*E. coli*) и 3, 8 и 24 ч (*S. aureus*). Эти бактериальные суспензии использовали для определения концентрации КОЕ. Содержимое каждой лунки титровали с использованием серийных 10-кратных разведений бактерий в 0,3 мл ФР. Затем по 0,01 мл из каждого разведения помещали в чашки Петри со средой агара Мюллера-Хинтона. Образцы 10 минут сушили в закрытой чашке при комнатной температуре, а затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 часов и подсчитывали титр культуры. Значение pH бактериальной суспензии при проведении тестов составляло 7,2. Эксперименты были выполнены в трех экземплярах, а статистические расчеты проведены, применяя инструмент анализа данных Microsoft Office, Excel 2010 (Microsoft Corp.).

Способность бактерицидных пленок ингибировать рост биопленок изучали с помощью модифицированного купонного метода [275]. Образцы инкубировали с бактериями при 37°C на 8 или 24 часа в жидком питательном бульоне. Далее их извлекали из раствора, дважды промывали 10 мл стерильного ФР, обрабатывали ультразвуком в 5 мл ФР с амплитудой 2 мкм в течение 2 мин на гомогенизаторе Soniprep 150 (MSE Ltd, Великобритания), а затем определяли концентрации КОЕ. Во всех экспериментах для каждого зонда проводилось по три измерения. Все данные были представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическая значимость оценивалась вариационным анализом.

6.1.2. Результаты исследования антибактериальных свойств покрытий TiCaPCON-Ag,Zn и TiCaPCON-Pt,Fe

6.1.2.1. Антибактериальные свойства покрытий TiCaPCON-Ag,Zn

Антибактериальную активность образцов в отношении бактерий *E. coli* K-261 и *S. aureus* ATCC-25923 оценивали по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ). Полученные результаты представлены на рисунке 6.1.

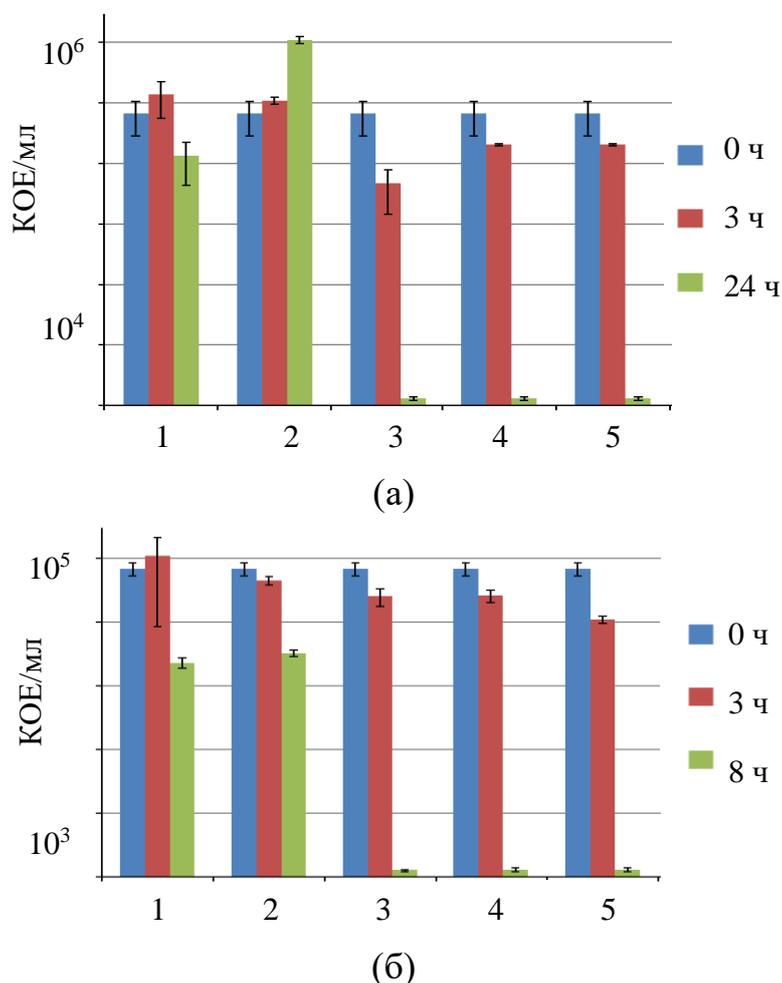


Рисунок 6.1 – Антибактериальная активность покрытий против штаммов (а) *E.coli* K-261 и (б) *S.aureus* ATCC 25923. 1 - Контроль, 2 - TiCaPCON, 3 - TiCaPCON-Ag, 4 - TiCaPCON-AgZn, 5 - TiCaPCON-Zn

Рисунок 6.1. демонстрирует, что покрытие с НЧ Ag показало выраженный антибактериальный эффект (95%) уже после 3 часа погружения в бактериальную культуру *E. coli*. Образцы с НЧ Zn и НЧ Ag+Zn уничтожали 80% КОЕ штаммов *E. Coli* через 3 часа. Количество КОЕ *E.coli* после 24 часов

инкубации уменьшилось до нуля в присутствии всех образцов. По данным РФЭС оба типа НЧ находились в окисленном состоянии (глава 3). Различные механизмы или их комбинация, описанные в литературе (прямой контакт НЧ с клетками, высвобождение бактерицидных ионов и образование АФК), могли стать причиной гибели клеток *E. coli* и *S. aureus* (глава 1).

Антибактериальные испытания против штаммов *S. aureus* важно проводить, учитывая их слабую выживаемость в течение 24 часов даже в присутствии нетоксичного контрольного образца [276,277]. По этой причине окончательный отбор аликвот в тестах против *S. aureus* проводили через 8 часов инкубации. Антибактериальный эффект через 3 часа погружения в бактериальную суспензию *S. aureus* проявил только образец с НЧ Zn. Полная инактивация КОЕ *S. aureus* произошла через 8 часов инкубации в присутствии всех образцов. (рисунок 6.16).

Результаты испытаний показали, что:

а) покрытия с НЧ Zn и Ag проявляют высокую антибактериальную активность против грамотрицательных штаммов *E. coli* K-261, и грамположительных штаммов *S. aureus* ATCC 25923.

а) образец с Ag уничтожил 95% КОЕ *E. coli* при очень низкой концентрации ионов Ag ($0,1 \text{ млрд}^{-1}$) через 3 часа (глава 3). Покрытия с НЧ продемонстрировали антибактериальный эффект против *E. coli* и *S. aureus* при самой низкой концентрации ионов Ag из известных по литературе (Глава 1);

б) погружение покрытие Zn-содержащего покрытия в бактериальные культуры *E. coli* и *S. aureus* на 3 часа привело к антибактериальному эффекту, при концентрации ионов Zn на два порядка выше (15 млрд^{-1}), чем для Ag;

в) из образца Ag+Zn выход ионов Ag и Zn через 3 часа был выше, но синергетического антибактериального эффекта не наблюдалось;

в) действие ионов Ag^+ было не единственным антибактериальным механизмом для покрытий с Ag, активные формы кислорода (АФК) также могли играть значительную роль в инактивации бактерий покрытиями.

6.1.2.2. Антибактериальные свойства покрытий TiCaPCON-Pt,Fe

Антибактериальная активность покрытий была сначала исследована против чувствительных к антибиотикам штаммов *E. coli* U20 (рисунок 6.2), после проведен дополнительный эксперимент сразу после осаждения покрытий (рисунок 6.2б) и изучено формирование биопленки (рисунок 6.2в).

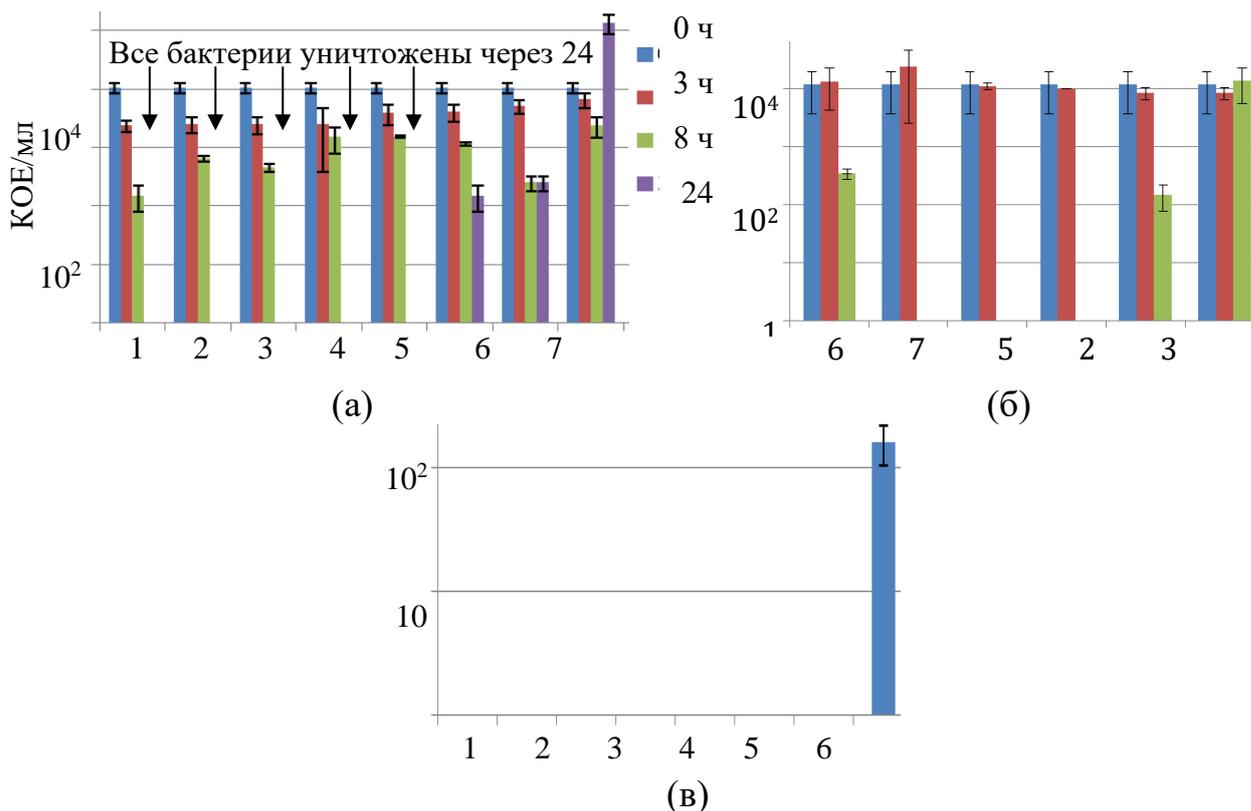


Рисунок 6.2 – Антибактериальная активность покрытий против (1 – Fe, 2 – Pt, 3 – Pt+Fe, 4 – Pt_{от}+Fe, 5 – Fe_{от}, 6 – Pt_{от}, 7 – (Pt+Fe)_{от}, 8 – контроль) (а,б) штаммов *E. coli* U20 и (в) образования биопленок на поверхности образцов

Образцы Fe, Pt, Pt +Fe, Pt_{от}+Fe и Fe_{от} полностью уничтожали клетки через 24 часа, а Pt_{от} и (Pt+Fe)_{от} инактивировали 97-98% бактериальных клеток. Покрытия Fe, Pt и (Pt+Fe) снижали значения КОЕ/мл на 2–3 порядка уже через 8 часов инкубации. Дополнительный независимый антибактериальный тест проводили с недавно нанесенными покрытиями Pt_{от}, (Pt+Fe)_{от}, Fe_{от}, Pt и Pt+Fe (рисунок 6.2б). Результаты обоих тестов согласовывались: все исследуемые образцы снизили значения КОЕ/мл на три-четыре порядка уже через 8 часов.

Согласно литературе бактерии предпочитают колонизировать твердый субстрат (биопленку), а не жить в планктонном состоянии [278]. Купонным методом была оценена вероятность образования биопленок (рисунок 6.2б). Полученные результаты показывают, что на поверхностях с НЧ биопленка отсутствовала, а на покрытии TiCaPCON образовалась (рисунок 6.2в).

Результаты антибактериального теста против штаммов *E.coli* K261, *S. aureus* 839 и их биопленок представлены на рисунке 6.3.

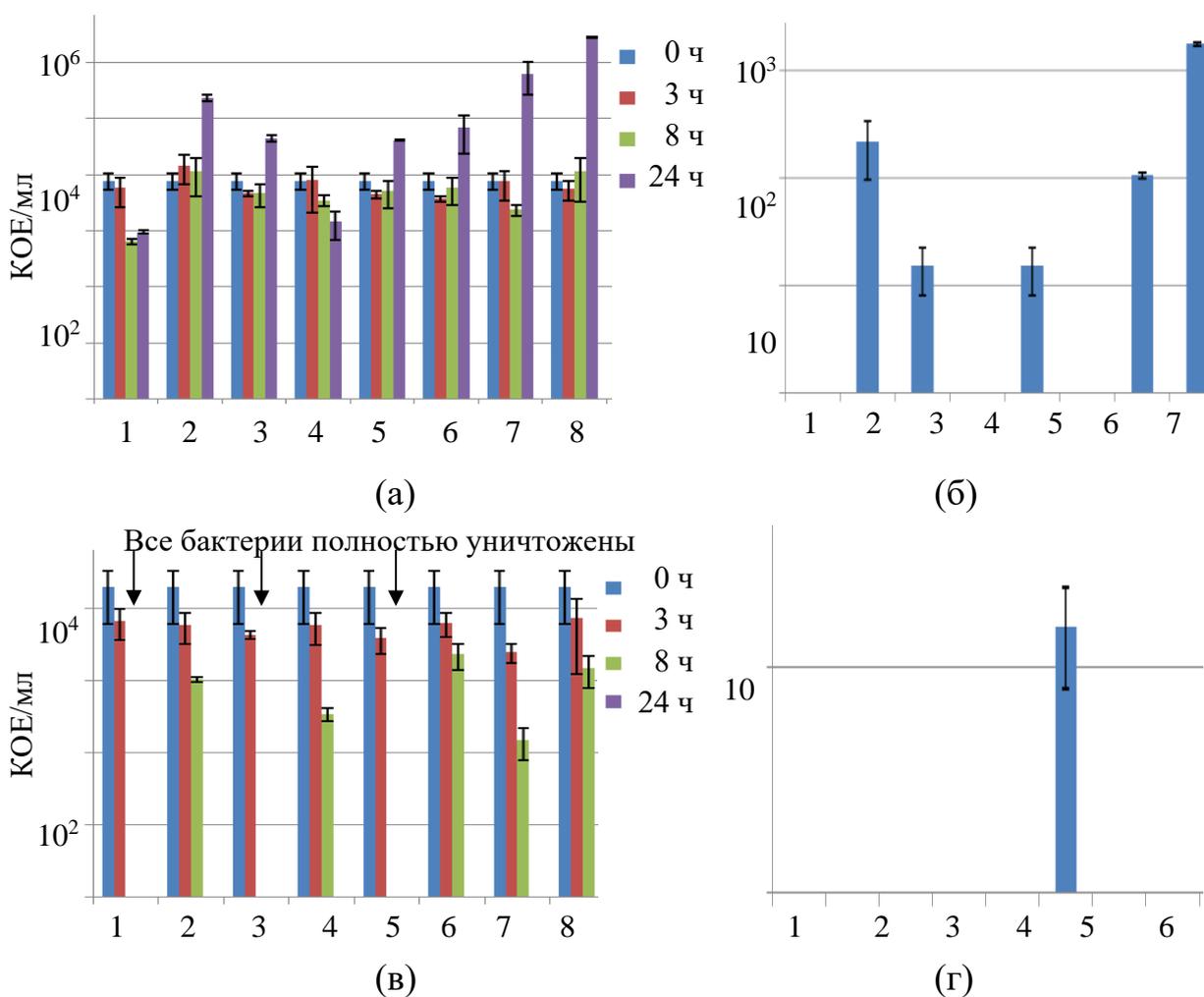


Рисунок 6.3 – Антибактериальная активность покрытий против (1 – Fe, 2 – Pt, 3 – Pt+Fe, 4 – Pt_{от}+Fe, 5 – Fe_{от}, 6 – Pt_{от}, 7 – (Pt+Fe)_{от}, 8 – контроль) штаммов (а) *E. coli* K261, (в) *S. aureus* №839 и (б,г) образование биопленок на поверхности

Образцы Fe и Pt_{от}+Fe показали 91 и 80% антибактериальный эффект против *E. coli* K261 через 8 и 24 часов, соответственно. Плотность КОЕ на поверхности покрытий Pt, Pt+Fe, Fe_{от} и (Pt+Fe)_{от} также снизилась по

сравнению с контролем (рисунок 6.3а). Рост биопленок *E. coli K261* на своей поверхности полностью подавляли покрытия Fe, Pt_{от}+Fe и Pt_{от} (рисунок 6.3б). Образцы Fe, Fe_{от} и Pt+Fe проявили высокую антибактериальную активность против штаммов *S. aureus №839*; все клетки были полностью уничтожены через 8 часов (рисунок 6.3в). Количество КОЕ в образцах Pt_{от}+Fe и (Pt+Fe)_{от} также уменьшилось после инкубации с *S. aureus №839* на 8 часов. Все образцы, включая контрольный, предотвращали образование биопленки (рисунок 6.3г).

Антибактериальную активность четырех образцов Fe, Pt_{от}, Pt_{от}+Fe и (Pt+Fe)_{от} тестировали против 8-ми типов бактерий (*E. coli K261*, *K. pneumoniae B1079k / 17-3*, *A. baumannii B1280A / 17*, *S. aureus № 839*, *S. epidermidis i5189-1*, *E. faecium Ya-235: VanA*, *E. faecium I-237: VanA* и *E. coli U20*) (рисунок 6.4).

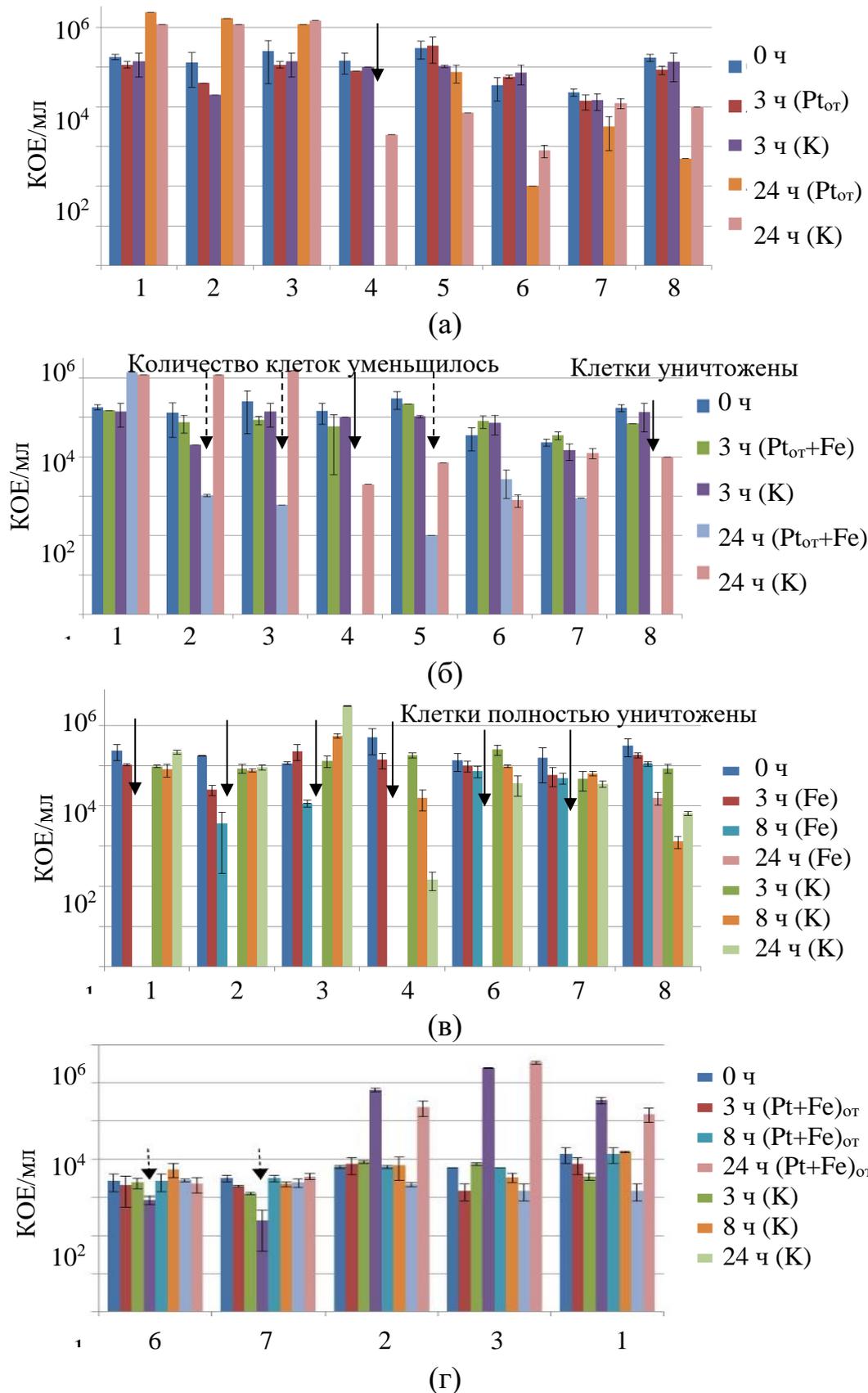


Рисунок 6.4 – Антибактериальная активность образцов (а) $Pt_{от}$ (б), $Pt_{от}+Fe$ и (в) Fe и (г) $(Pt+Fe)_{от}$ против: 1 – *E. coli* K261, 2 – *K. pneumoniae* B1079k/17-3, 3 – *A. baumannii* B1280A/17, 4 – *S. aureus* №839, 5 – *S. epidermidis* i5189-1, 6 – *E. faecium* Ya-7 235:Van, 7 – *E. faecium* I-237:VanA, 8 – *E. coli* U20. К – контроль

Образец Pt_{от} был эффективен только против штаммов *S. aureus* и *E. coli* U20 (рисунок 6.4а). Отсутствие инактивации штамма *E. coli* K262 можно объяснить более высокой исходной концентрацией бактерий, чем в первом тесте (10⁵ вместо 10⁴ КОЕ/мл) (рисунок 6.3а). Образец Pt_{от}+Fe показал 100% антибактериальную эффективность в отношении: *E. coli* U20, *E. coli* K261 и *S. aureus* №839, а также *K. pneumoniae* B1079k/17-3 (99%), *A. baumannii* B1280A/17 (99%), *S. epidermidis* i5189-1 (99,9%) и *E. faecium* I-237: VanA (90%). Покрытия с НЧ Fe оказались лучшими среди всех тестируемых образцов – полностью инактивировали штаммы *E. faecium* Ya-235:VanA и были более эффективны в отношении *E. faecium* I-237:VanA и *E. coli* K261 (рисунок 6.4в). Покрытия (Pt+Fe)_{от} в течение 24 часа привели к снижению на порядок (99%) КОЕ/мл бактерий *E. faecium* Ya-235:VanA (55%) и *E. faecium* I-237:VanA, однако, не были эффективны в отношении других штаммов (рисунок 6.4г).

Существует три основных фактора, обеспечивающих антибактериальные свойства покрытий с НЧ: высвобождение ионов, генерация АФК и поверхностные микрогальванические пары. Модельные антибактериальные тесты были поставлены для определения вклада каждого из этих факторов.

Данные о выходе ионов, количестве АФК и наличии разницы потенциалов на поверхности (глава 3) были соотнесены результатами антибактериальных испытаний покрытий. Концентрация ионов Pt в ФР была очень низкой и для образцов Pt и (Pt+Fe) составляла менее 4 млрд⁻¹. Минимальная известная ингибирующая концентрация для ионов Pt в растворах против планктонных штаммов *P. pneumoniae*, *A. baumannii* и *E. faecium* составляет 3,9, 5,8 и 11,7 млн⁻¹, соответственно. [279]. Эти данные превосходят полученные в экспериментах главы 3 значения выхода на три порядка, что позволило исключить высвобождение ионов Pt в качестве антибактериального фактора.

Гипотеза антибактериального действия микрогальванических пар проверена дополнительными модельными тестами с целью исключения

второго фактора – генерации АФК. Образцы предварительно погружали в ФР на 24 часа для полного высвобождения ионов Pt и Fe, а затем подвергали антибактериальному тесту в отношении штаммов *E. coli* U20 (рисунок 6.5).

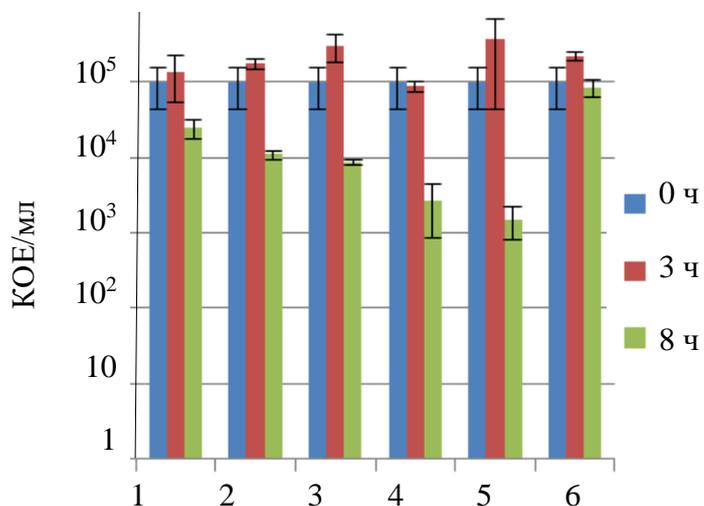


Рисунок 6.5 – Антибактериальная активность образцов в отношении штаммов *E. coli* U20 после предварительной выдержки в ФР в течение 24 часов. 1 – Pt, 2 – Pt_{от}, 3 – Pt+Fe, 4 – (Pt+Fe)_{от}, 5 – Fe_{от}, 6 – контроль

Антибактериальный эффект образцов усиливался в следующей последовательности Pt (70%) → Pt_{от} (89%) и Pt+Fe (89%) → (Pt+Fe)_{от} (97%) → Fe_{от} (98%). Дополнительные тесты генерации АФК (глава 3) были выполнены в условиях аналогичных антибактериальному тесту, а их результаты позволили полностью исключить вклад АФК в общую антибактериальную активность после предварительной 24 часовой выдержки образцов в ФР. В главе 3 было показано, что покрытия способны проводить ток, а на поверхности присутствовала разность потенциалов НЧ/матрица для всех покрытий, кроме Pt. Таким образом, исключив вклад ионов и АФК, было доказано, что бактерии могут быть уничтожены с помощью микрогальванического взаимодействия.

Покрyтия TiCaPCON, декорированные НЧ Pt, Fe и PtTi_x генерировали АФК в видимом свете и УФ-облучении (глава 3). Все образцы были стерилизованы УФ-излучением перед антибактериальными тестами, что

привело к образованию большого количества АФК. Действие АФК производимых НЧ, стало дополнительным фактором, который обеспечил повышенную антибактериальную активность покрытий.

Результаты испытаний позволили:

- а) подтвердить гипотезу об антибактериальном действии микрогальванических пар, которые образуются на покрытиях с НЧ Pt и Fe;
- б) установить прямую зависимость между концентрацией АФК и уровнем антибактериальной активности образцов с НЧ Fe и Pt.

6.1.3. Результаты исследования антибактериальных свойств покрытий ПЭО TiO₂/Ag,Pt

6.1.3.1. Антибактериальные свойства. Тест 1

Антибактериальную активность и противодействие обрастанию биопленки покрытий ПЭО TiO₂, без НЧ и с Ag и Pt, оценивали в отношении двух типов грамотрицательных (*E. coli* U20, *E. coli* K261) и двух типов грамположительных (*S. aureus* 839, *S. aureus* 224/228) штаммов (рисунок 6.6).

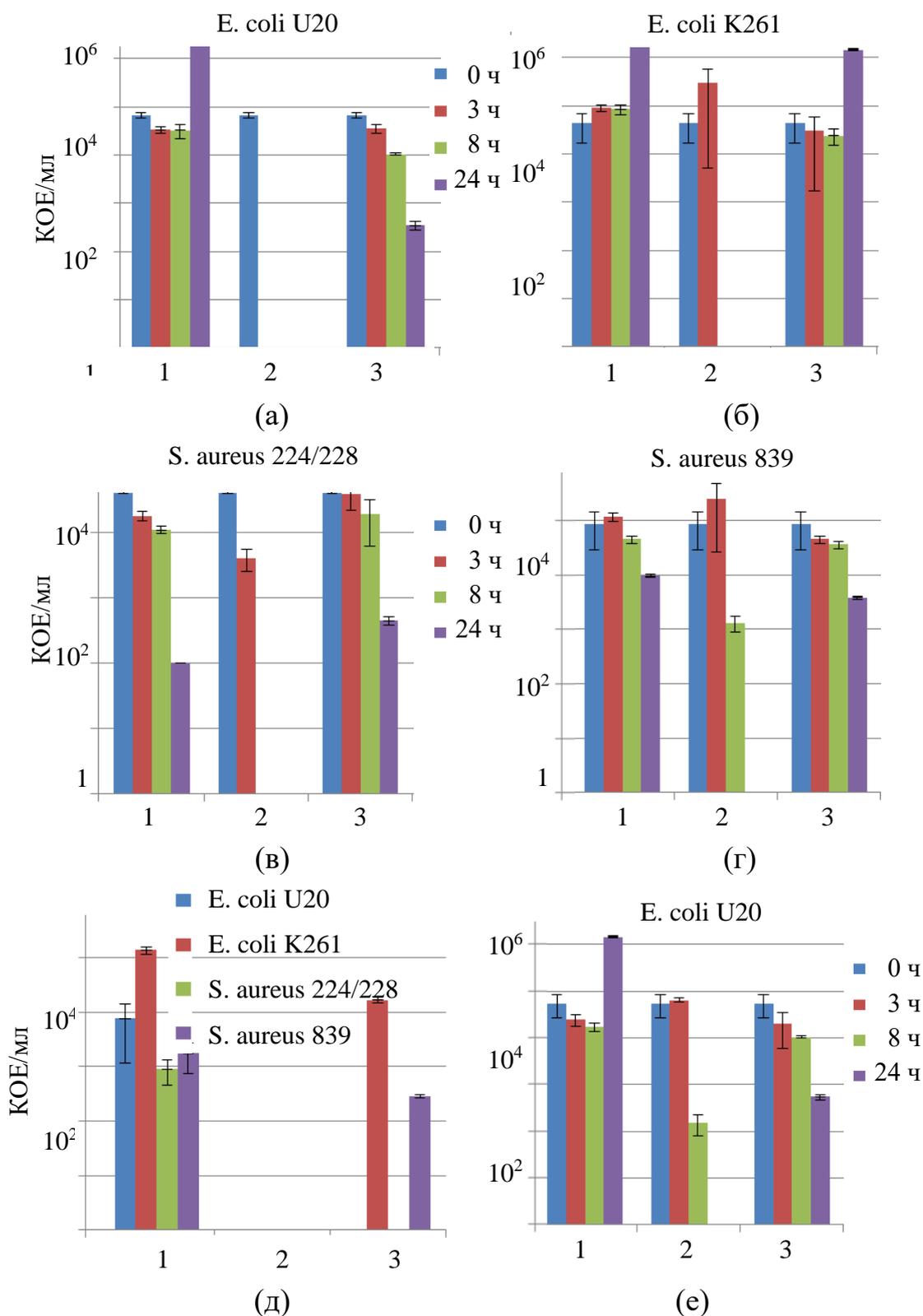


Рисунок 6.6 – Антибактериальная активность покрытий ПЭО TiO₂ (1) без НЧ, с НЧ (2) Ag и (3) Pt против (а-г) различных бактериальных штаммов, (д) образования биопленки и (е) дополнительный антибактериальный тест

Рисунок 6.6. демонстрирует, что образцы ПЭО TiO₂/Ag показали 100% бактерицидный эффект против всех штаммов через 3 часа (*E. coli U20*), 8 часов

(*E. coli* K261 и *S. aureus* 224/228) и 24 часа (*S. aureus* 839). КОЕ/мл штаммов *S. aureus* 839 снизилось на два порядка через 8 часов (99% антибактериальный эффект). Покрытие ПЭО TiO₂/Pt было эффективно только в отношении штамма *E. coli* U20 (рисунок 6.6а): бактерицидный эффект составил 86% (через 8 часов) и 99,4% (через 24 часа). Обнаруженный антибактериальный эффект образца ПЭО TiO₂/Pt в отношении штамма *E. coli* U20 был подтвержден дополнительным антибактериальным тестом (рисунок 6.6е).

Покрытия ПЭО TiO₂/Ag предотвращали образование биопленок для всех типов тестируемых бактериальных штаммов (рисунок 6.6д). ПЭО TiO₂/Pt покрытия не были эффективны против *E. coli*, K261 и *S. aureus* 839 штаммов, но полностью подавляли рост *E. coli* U20 и колоний *S. aureus* 224/228.

Результаты свидетельствуют, что ПЭО TiO₂/Ag покрытия обладают сильным бактерицидным действием в отношении *E. coli* U20, *E. coli* K261, *S. aureus* 224/228 и *S. aureus* 839 и подавляют образование их биопленок. ПЭО TiO₂/Pt покрытия проявляют антибактериальную активность только против *E. coli* U20 и являются антиадгезивными для *S. aureus* 224/228. Результаты главы 4 показали, что ПЭО TiO₂/Pt генерируют АФК, которые и являются фактором их антибактериальной активности. Ионы Ag и АФК в покрытиях ПЭО TiO₂/Ag действуют совместно, поэтому их антибактериальная активность выше.

6.1.3.2. Антибактериальные свойства. Тест 2

С целью изучения длительности антибактериального эффекта образца ПЭО TiO₂/Ag был проведен дополнительный тест, когда выход ионов Ag⁺ почти прекращался (через 24 часа в ФР). Концентрация ионов Ag у поверхности имплантата *in vivo* со временем будет снижаться из-за их ассимиляции окружающей тканью. Ситуацию смоделировали, оценив антибактериальную активность против *E. coli* K261 после предварительной выдержки ПЭО TiO₂/Ag в ФР в течение 24 часов (рисунок 6.7).

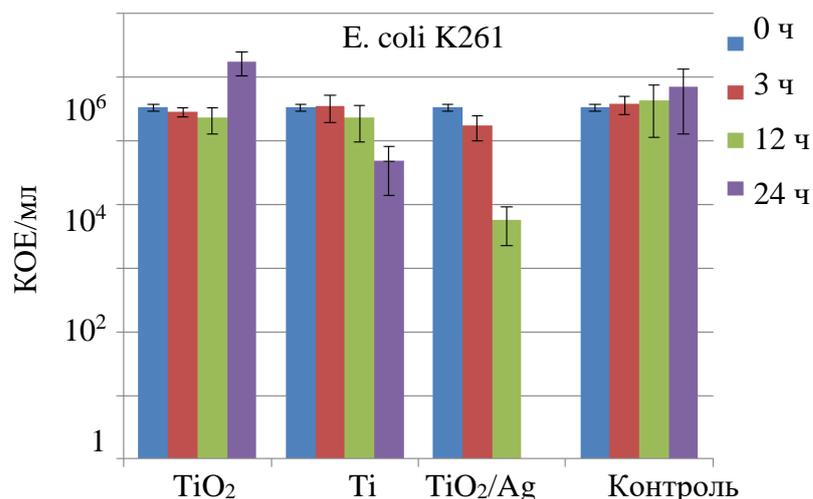


Рисунок 6.7 – Антибактериальная активность ПЭО TiO₂-Ca,P и ПЭО TiO₂/Ag в отношении штаммов *E. coli K261* после предварительной выдержки в ФР в течение 24 часов

Рисунок 6.7 демонстрирует, что выраженный антибактериальный эффект наблюдался уже через 12 часов (значения КОЕ/мл снизилось на 2–3 порядка), а все штаммы *E. coli* были полностью инактивированы через 24 часа.

Результаты испытаний показали:

а) покрытия на ПЭО TiO₂ генерировали большое количество АФК, но не проявляли фотоактивированного бактерицидного эффекта.

б) генерируемые образцами ПЭО TiO₂/Ag АФК оказывают бактерицидный эффект независимо от действия ионов (через 24 часа)

в) совместное действие АФК и ионов Ag повышает антибактериальную активность покрытия ПЭО TiO₂/Ag (через 8 часов)

6.1.4. Результаты исследования антибактериальных свойств покрытий VO_x/TiCaPCON-B

Антибактериальную активность однослойных и двухслойных образцов, легированных В, определяли против клинически выделенных бактерий *E. coli K-261* (рисунок 6.8). Оценка образования биопленки на поверхности образцов показана на рисунке 6.9.

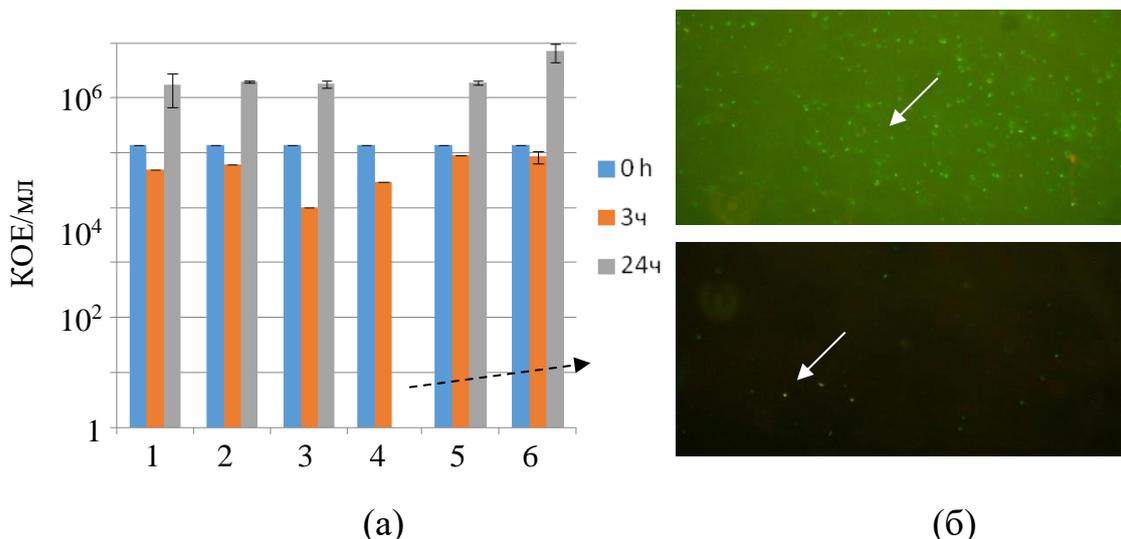


Рисунок 6.8 – (а) Антибактериальная активность против *E. coli* K-261 образцов: 1 - TiCaPCON-15% В, 2 - TiCaPCON-11% В, 3 - TiCaPCON-8% В, 4 - В₂O₃/TiCaPCON-11% В, 5 - TiCaPCON, 6 – контроль и (б) флуоресцентные изображения (200х150 мкм) штаммов *E. coli* K-261 после их инкубации с В₂O₃/TiCaPCON-11% В (нижний) и контрольным образцов (верхний)

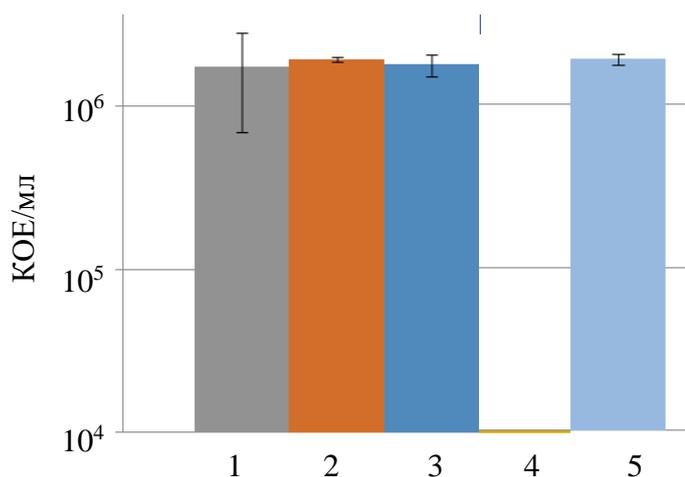


Рисунок 6.9 – Ингибирование образования биопленки штаммов *E. coli* K-261. 1 - TiCaPCON-15% В, 2 - TiCaPCON-11% В, 3 - TiCaPCON-8% В, 4 - В₂O₃/TiCaPCON-11% В, 5 - TiCaPCON, 6 – контроль

Антибактериальную активность против *E. coli* K-261 проявило только покрытие В₂O₃/TiCaPCON 11% В, которое уменьшило количество КОЕ на порядок через 3 часа, а через 24 часа инактивировало все клетки *E. coli*. Бактерицидную активность качественно подтвердили с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием акридинового оранжевого, который используется для обнаружения и подсчета микроорганизмов. [276]. Количество клеток *E. coli* K-261 на покрытии В₂O₃/TiCaPCON-11% В было

значительно меньше, чем на контрольном образце (рисунок 6.8б). Покрытие $B_2O_3/TiCaPCON$ 11% В также полностью предотвратило образование биопленки.

Результаты исследований показали, что:

а) высвобождения ионов В на уровне $80 \text{ млрд}^{-1}/\text{день}$ из покрытий $TiCaPCON$ -В было недостаточно для антибактериальной активности.

б) слой B_2O_3 уничтожал бактерии *E.coli* и ингибировал образование биопленки, что подтверждает эффективность борной кислоты против воспалительной реакции [281].

6.2. Исследование биосовместимости покрытий

6.2.1. Методика исследования биосовместимости покрытий

Биосовместимость покрытий проверяли, анализируя такие характеристики клеток MC3T3-E1 и лимфоцитов на поверхности, как: распластывание, пролиферация, жизнеспособность, форма и фокальные адгезии.

6.2.1.1. Площадь и распластывание клеток

Клетки MC3T3-E1 (10^4 клетки/мл) высевали на поверхность образцов, помещенных в 12-луночные планшеты, содержащие культуральную среду DMEM/F12 (Invitrogen) с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Культуры выращивали в увлажненном инкубаторе, заполненном 5% CO_2 , при $37^\circ C$ в течение 24 часов. Распластывание клеток изучали после 24 часов инкубации, для этого клетки фиксировали 3,7% параформальдегидом (Sigma) в течение 10 мин, пропитывали 0,5% TritonX 100 (Sigma) и окрашивали Alexa488-фаллоидином (Molecular Probes) или родамин-фаллоидином (Fluka BioChemicals). Тридцать изображений клеток получали в зеленом или красном канале с помощью микроскопа Axioplan (Zeiss) с объективом Plan Fluor x40 и

камерой DP70 (Olympus). С помощью ПО ImageJ были обрисованы контуры, измерена площадь и определена средняя площадь клеток.

6.2.1.2. Цитоскелет и фокальные адгезии

Клетки MC3T3-E1 (10^4 клетки/мл) высевали на поверхность образцов, помещенных в 12-луночные планшеты, содержащие культуральную среду DMEM/F12 (Invitrogen) с 10% FBS. Культуры выращивали в увлажненном инкубаторе, заполненном 5% CO₂, при 37°C в течение 24 часов. Для визуализации актинового цитоскелета и очаговых адгезий клетки фиксировали 3,7% параформальдегидом (Sigma) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 10 минут, промывали PBS, пропитывали 0,5% Triton X-100 (Sigma) в PBS в течение 3 минут и промыли PBS. Образцы инкубировали с родамин-фаллоидином (Fluka BioChemicals, №77418, 1:300) и мышинными моноклональными антителами против паксиллина (BD Transduction Laboratories, №610052, 1:300) в течение 40 минут, трижды промывали PBS и затем инкубировали с конъюгированными с Alexa488 козьими антителами против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch, №115-545 146, 1:200) в течение 40 минут. После промывки PBS образцы помещали в Elvanol на предметные стекла. Для выявления актинового цитоскелета и фокальных спаек снимки получали с помощью микроскопа AxioPlan с объективом Plan-Neofluar x40 и камера ДП-70

6.2.1.3. МТТ анализ (жизнеспособность)

Жизнеспособность клеток оценивали по методу МТТ анализа. Клетки выращивали на образцах, помещенных в 12-луночный планшет в культуральной среде DMEM/F12 с 10% FBS в течение 5 дней. Среду заменили через 3 дня. После культивирования в течение 5 дней тестируемые образцы переносили в другой планшет, содержащий 2 мл среды DMEM/F12 без FBS. В

каждую лунку добавляли 200 мкл реагента МТТ (3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид, 5 мг/мл (Sigma)). После инкубации в течение 4 часов супернатанты осторожно аспирировали, формазановый продукт, образованный живыми клетками, растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) в течение 20 минут. Для измерения оптической плотности из каждого образца отбирали 150 мкл солюбилизированного продукта формазана. Спектрофотометрический анализ выполняли с использованием системы спектрофотометра для микропланшетов Benchmark Plus (Bio-Rad) при длине волны 570 нм. Значения поглощения нормализовали к холостому ходу (150 мкл ДМСО). Жизнеспособность клеток рассчитывали, как процент от значений оптической плотности исследуемых образцов, деленных на таковые для контроля.

6.2.1.4. Пролиферация

Цитосовместимость тестируемых покрытий также оценивали с помощью анализа пролиферации. Стандартное количество клеток МС3Т3-Е1 (104 клеток/см²) высевали на поверхности образцов, помещенные в 12-луночные планшеты, содержащие культуральную среду DMEM/F12 (Invitrogen) с 10% FBS. Среду заменяли новую через 3 и 5 дней инкубации. Через 1, 3, 5 и 7 дней инкубации клетки фиксировали 3,7% параформальдегидом/PBS, промывали PBS и пропитывали 0,5% Triton X-100 в PBS. Образцы инкубировали в течение 30 минут с 300 нМ DAPI/PBS (Sigma) для флуоресцентного окрашивания нуклеиновых кислот, трижды промывали PBS и помещали в Elvanol на предметные стекла. С помощью микроскопа AxioPlan, оснащенного объективом Plan Fluor x40 и камерой DP70, подсчитывали количество клеток в 30 полях и определяли среднее значение плотности популяции клеток.

6.2.1.4. Иммуномодуляция на клетки лимфоцитов

Для оценки цитотоксичности НЧ Pt и Fe, изучали жизнеспособность, пролиферацию лимфоцитов, а также экспрессию маркеров активации CD69 и CD25 на поверхности лимфоцитов. Гепаринизированную кровь, разбавленную в 2 раза PBS с 2% FBS, наслаивали на градиент плотности Histopaque-1077 (Sigma, США) в соотношении 1:1 и центрифугировали с ускорением 400g при комнатной температуре за 30 мин. Выбранное опалесцирующее кольцо дважды промывали при 250 г в 10 мл PBS с 2% FBS. Осадок ресуспендировали в полной питательной среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS, 2 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), 10 мМ 4- (2-гидроксиэтил) -1 пиперазинэтансульфоновую кислоту (Sigma, США) и 25 мкМ 2-меркаптоэтанол (Sigma, США). Жизнеспособность клеток определяли путем анализа трипанового синего. Концентрацию клеточной суспензии доводили до 10^6 клеток/мл с помощью счетчика TC-20 (Bio-Rad, США).

После разделения в градиенте плотности лимфоциты инкубировали в присутствии тестируемых образцов в полной питательной среде RPMI 1640 и 5% CO₂ при 37°C в течение 7 дней. Жизнеспособность лимфоцитов определяли ежедневно с использованием живого 7-аминоактиномицина D (7-AAD), интеркалирующего ДНК-красителя, который проникает в клетку только при нарушении целостности мембраны. Раствор 7-AAD (5 мкл) добавляли к суспензии мононуклеарных клеток (10^6 клеток/мл), выбранной в градиенте плотности, и инкубировали в течение 10 мин. Образцы анализировали через 15 мин окрашивания на проточном цитометре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0).

Разрастание лимфоцитов определяли с использованием красителя карбоксифлуоресцеин (КФСИ). Когда клетка, меченная КФСИ, делится, ее потомство снабжается половиной количества молекул, меченных КФСИ, и, таким образом, каждое деление клетки может быть оценено путем измерения

соответствующего уменьшения флуоресценции клетки с помощью проточной цитометрии. Чем больше произошло делений клеток (митозов), тем ниже уровень люминесценции. На цитометрической гистограмме клетки, окрашенные КФСИ, расположены в виде серии последовательных пиков с уменьшающейся интенсивностью люминесценции. Лимфоциты (10^6 клеток/мл) перед культивированием окрашивали 5 mMCFSE (BD e-Bioscience, США). Клетки инкубировали с КФСИ и/или митогеном ConA (10 мкг/мл) в присутствии исследуемых образцов в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 10 мин. Затем добавляли 3 мл охлажденной среды RPMI-1640, инкубировали на холоду в течение 5 минут, а затем дважды промывали охлажденным RPMI-1640, содержащим 10% FBS. Центрифугирование проводили при ускорении 400g в течение 5–7 мин. Клетки ресуспендировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640 до их исходной концентрации. Суспензию клеток вносили в лунки 96-луночного планшета и инкубировали с тестируемыми образцами и/или митогеном ConA (10 мкг/мл) в 5% CO₂ при 37°C в течение 6 дней, при необходимости обновляя среду. После инкубации суспензию клеток переносили в цитометрические пробирки, а затем добавляли 1 мл PSB. После центрифугирования при 400 g в течение 5 минут супернатант удаляли, ресуспендировали, фиксировали 1% раствором формалина и анализировали методом проточной цитометрии.

6.2.2 Результаты исследования биосовместимости покрытий

TiCaPCON-Ag,Zn и TiCaPCON-Pt,Fe

6.2.2.1. Биосовместимость покрытий TiCaPCON-Ag,Zn

Проведены тесты на дифференцировку и пролиферацию клеток MC3T3-E1 (рисунок 6.10) и оценена их форма (рисунок 6.11)

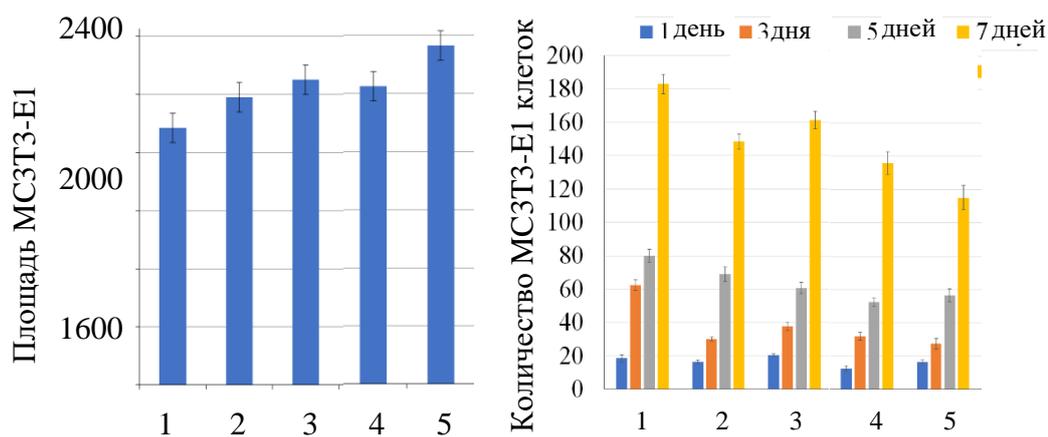


Рисунок 6.10 – (а) Дифференцировка и (б) пролиферация клеток MC3T3-E1 на поверхности покрытий. 1 – Контроль (стекло), 2 – TiCaPCON, 3 – TiCaPCON-Ag, 4 – TiCaPCON-Ag-Zn, 5 – TiCaPCON-Zn, $P < 0.005$

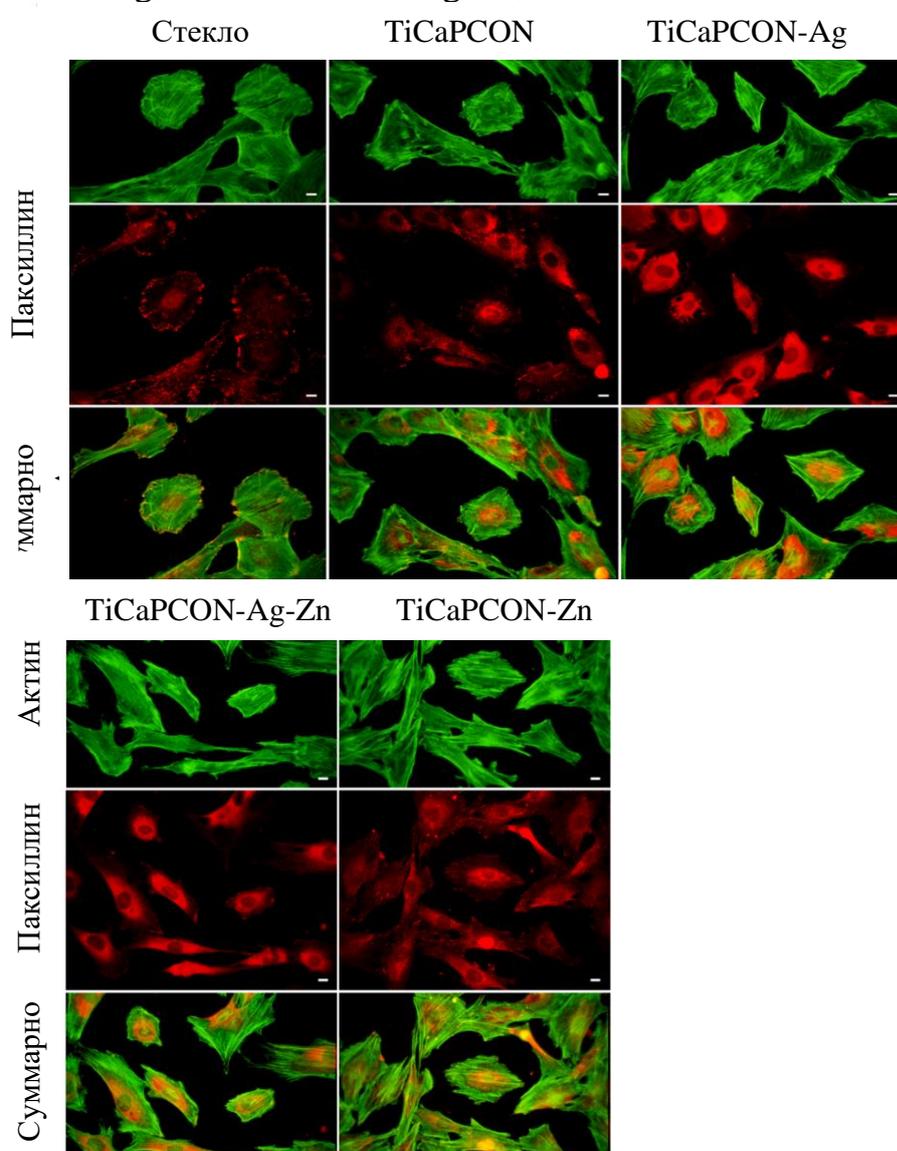


Рисунок 6.11 – Актиновый цитоскелет и очаговые адгезии клеток MC3T3-E1 на поверхности исследуемых образцов

Тесты на дифференцировку показали, что поверхность всех испытанных образцов была адгезивной для клеток MC3T3-E1 (рисунок 6.10а). Статистически значимых различий в средней площади клеток, культивируемых на поверхности разных покрытий обнаружено не было. Высокая активность пролиферации клеток происходила на поверхности покрытий TiCaPCON и TiCaPCON-Ag (рисунок 6.10б). Поверхность других покрытий также была способна поддерживать высокую скорость пролиферации клеток, хотя через 7 дней их количество было немного ниже, однако разница была незначительной в сравнении с образцом, не содержащим НЧ.

Изображения, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, представлены на рисунке 6.11. Форма клеток не изменилась, их актиновый цитоскелет был хорошо организован, а на периферии всех клеток наблюдались очаговые адгезии.

Проведенные испытания показали, что:

а) образцы с НЧ обеспечивали хорошее прикрепление, распространение и пролиферацию MC3T3-E1 клеток и, следовательно, не токсичны.

б) покрытия TiCaPCON с НЧ Ag на поверхности продемонстрировали хорошие остеокондуктивные характеристики.

Эти результаты вместе с антибактериальными тестами открывают новые возможности для производства биологически безопасных материалов с улучшенными антибактериальными характеристиками для ортопедии.

6.2.2.1. Биосовместимость покрытий TiCaPCON-Pt,Fe

Инфекция, связанная с имплантатом, представляет собой комбинацию патогенов, имплантата и иммунной системы, поэтому кроме бактерицидной активности (раздел 6.1.2.2.) требовалось изучение иммуномодулирующей активности покрытий с НЧ Pt и Fe. НЧ взаимодействуют с иммунной системой и модулируют ее функцию [282]. Процент мертвых мононуклеарных клеток и

пролиферационная активность лимфоцитов в клеточных культурах с образцами с Pt и Fe и без них приведены в таблицах 6.1 и 6.2, соответственно.

Таблица 6.1. Процент мертвых мононуклеаров в клеточных культурах

Образец	Время инкубации, дни		
	1	2	7
Культуральная среда (контроль)	0,2	1,0	1,5
Культуральная среда + TiCaPCON-Fe	5,3	3,4	5,8
Культуральная среда + TiCaPCON-Pt	4,9	5,6	8,0

Таблица 6.2. Пролиферационная активность лимфоцитов

Образец	Количество пролиферирующих клеток, %	
	Среда	Среда + Con A
Культуральная среда (контроль)	0,4	71,6
Культуральная среда + TiCaPCON-Fe	1,1	61,8
Культуральная среда + TiCaPCON-Pt	0,9	67,2

Покрyтия, с НЧ Pt и Fe, не влияли на жизнеспособность лимфоцитов через 1 и 2 дня инкубации. Покрyтие Pt привело к небольшому увеличению количества мертвых клеток через 7 дней (таблица 6.1). Образцы с НЧ Pt и Fe, не влияли на пролиферативную активность лимфоцитов (таблица 6.2). Небольшое ее снижение, индуцированное митогеном Con A, было зафиксировано, но разница с контролем не являлась статистически значимой.

Было проведено измерение уровня экспрессии маркеров активации CD69 и CD25 на поверхности Т- и В-лимфоцитов (таблица 6.3).

Таблица 6.3. Изменение уровня экспрессии маркеров активации CD69 и CD25 на поверхности Т- и В-лимфоцитов

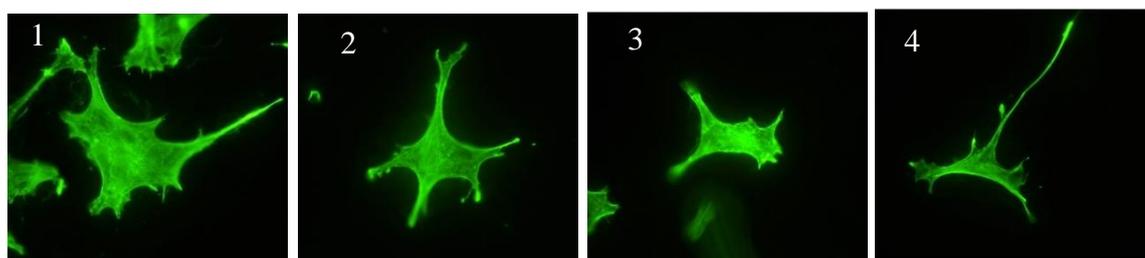
Sample	Субпопуляция лимфоцитов, %			
	CD19+CD69+	CD19+CD25+	CD3+CD69+	CD3+CD25+
RPMI	9.7	23.2	0.6	4.8
TiCaPCON-Fe	23	29.7	3.8	4.9
TiCaPCON-Pt	31.4	34.1	7.1	5.3

Популяция CD3⁺ Т-лимфоцитов и CD19⁺ В-лимфоцитов в образцах с НЧ Pt и Fe после 48 часов инкубации не отличалось от контроля и составляло 83,4±0,7 и 8,1±0,6%, соответственно. Одним из индикаторов, отражающих активацию клеток, является повышенная экспрессия маркеров активации, например CD69 и CD25. Анализ В-лимфоцитов с маркером CD69 на поверхности, показал, что НЧ Fe и Pt увеличивают процент клеток CD19⁺CD69⁺ в 2 и 3 раза, соответственно. Образцы с НЧ Pt и Fe увеличили экспрессию молекулы CD25 на поверхности В-лимфоцитов и CD69 на поверхности Т-лимфоцитов. Количество Т-лимфоцитов с молекулой CD25 на поверхности, существенно не различалось.

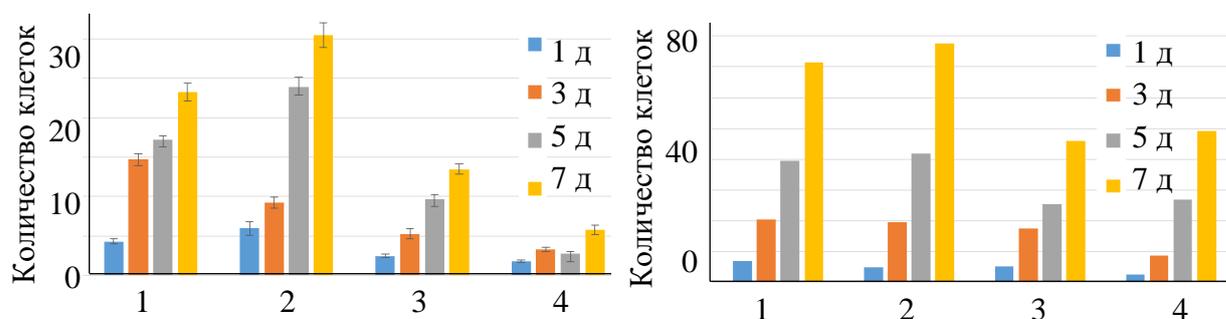
Результаты показали, что покрытия TiCaPCON, легированные Pt и Fe, не оказывают выраженного токсического действия на мононуклеары; процент мертвых клеток через 7 дней был менее 6-8%. НЧ не снижали пролиферативную активность лимфоцитов, и неспецифическая активация клеток не происходила. НЧ не оказывали заметного влияния на способность лимфоцитов активироваться в ответ на митоген. Однако, наблюдалась некоторая реакция лимфоцитов на НЧ, о чем свидетельствует повышенная экспрессия маркеров активации на поверхности как В-, так и Т-лимфоцитов.

6.2.3. Результаты исследования биосовместимости покрытий ПЭО TiO₂/Ag,Pt

Рисунок 6.12 иллюстрирует организацию актинового цитоскелета и пролиферацию клеток МС3Т3-Е1 на поверхности ПЭО TiO₂/Ag,Pt покрытий.



(a)



(б)

(в)

Рисунок 6.12. (а) Актиновый цитоскелет и пролиферация (б,в) клеток МС3Т3-Е1 на поверхности исследуемых образцов (б) до и (в) после воздействия в ФР в течение 24 часов. 1 – Ti, 2 – TiO₂, 3 – TiO₂/Pt, 4 – TiO₂/Ag

Характерные флуоресцентные микроскопические изображения показывают, что актиновый цитоскелет клеток был хорошо организован, а их форма изменилась только на покрытии Ag/TiO₂ (рисунок 6.12а). Количество клеток на ПЭО TiO₂ покрытии было заметно выше, чем на Ti через 5 и 7 дней, что говорит о хорошей пролиферации. Поверхность покрытия ПЭО TiO₂/Pt также была способна поддерживать пролиферацию клеток, но их количество было меньше. Поверхность ПЭО TiO₂/Ag была цитотоксична и значительно снижала скорость пролиферации клеток. Это можно объяснить высокой концентрацией ионов Ag⁺ (~ 0,4 млн⁻¹), достигаемой уже через 3 часа (глава 4). В условиях *in vivo* концентрация бактерицидных ионов быстро снижается из-за их ассимиляции окружающей тканью. Эти условия были смоделированы путем предварительной выдержки ПЭО TiO₂/Ag, Pt в ФР в течение 24 часов, после чего была изучена пролиферация клеток на них (рисунок 6.12в).

На рисунке 6.12в сравнивается скорость пролиферации клеток на образцах Ti, TiO₂, ПЭО TiO₂/Pt и ПЭО TiO₂/Ag после их выдержки в ФР в течение 24 часов. Количество клеток МС3Т3-Е1 на поверхности образцов TiO₂

с НЧ Pt и Ag, было ниже по сравнению с контролями TiO₂ и Ti без НЧ, однако, оба образца продемонстрировали положительную динамику пролиферации клеток. Этот результат позволил установить, что образцы ПЭО TiO₂/Pt и ПЭО TiO₂/Ag не токсичны при этих уровнях ионов Pt и Ag. Незначительное снижение количества клеток можно объяснить несколько худшей адгезией клеток к поверхности TiO₂ с, что подтверждают данные о смачиваемости поверхности (глава 4)

Проведена оценка дифференцировки клеток на поверхности и цитосовместимости образцов ПЭО TiO₂, ПЭО TiO₂/Pt, ПЭО TiO₂/Ag, которую дополнительно оценивали с помощью МТТ-анализа (рисунок 6.13). Образцы подвергали предварительной выдержке в ФР в течение 24 часов чтобы сравнить результаты анализа МТТ с результатами тестов на пролиферацию (рисунок 6.12в).

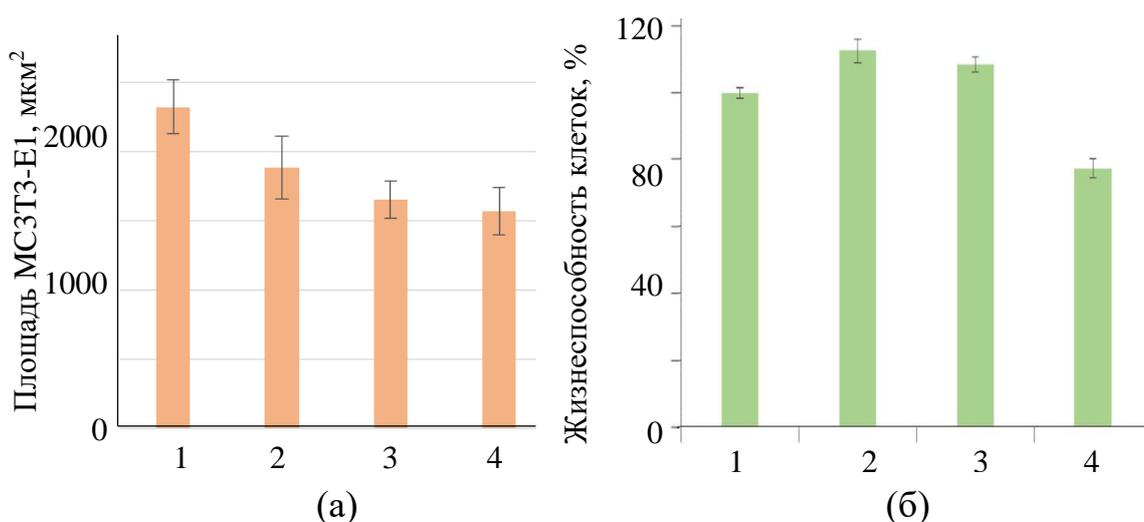


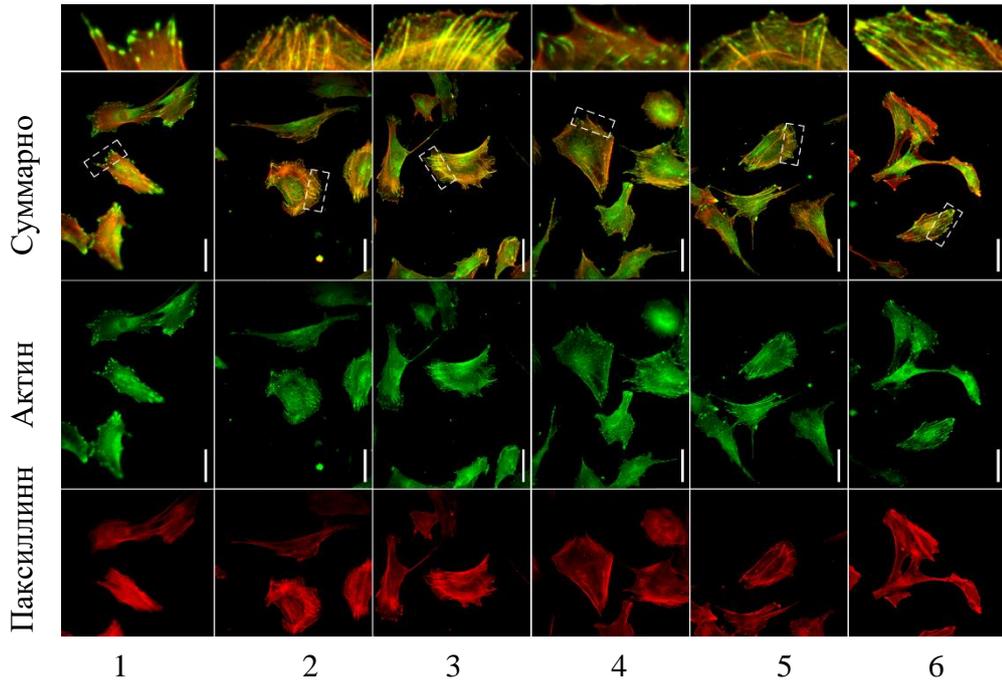
Рисунок 6.13 – (а) Дифференцировка клеток MC3T3-E1 и (б) анализ МТТ (воздействие в ФР в течение 24 часов). 1 – Ti, 2 – TiO₂, 3 – TiO₂/Pt, 4 – TiO₂/Ag

. Поверхность всех образцов была адгезивной для клеток, но средняя площадь незначительно уменьшалась в последовательности: плоский Ti (контроль) → ПЭО TiO₂ → ПЭО TiO₂/Pt → ПЭО TiO₂/Ag. Разница между образцами без НЧ и образцами с НЧ, не была статистически значимой. Цитотоксичность покрытия ПЭО TiO₂ и TiO₂/Pt была сравнима с контролем Ti. Образец ПЭО TiO₂/Ag немного снизил жизнеспособность клеток.

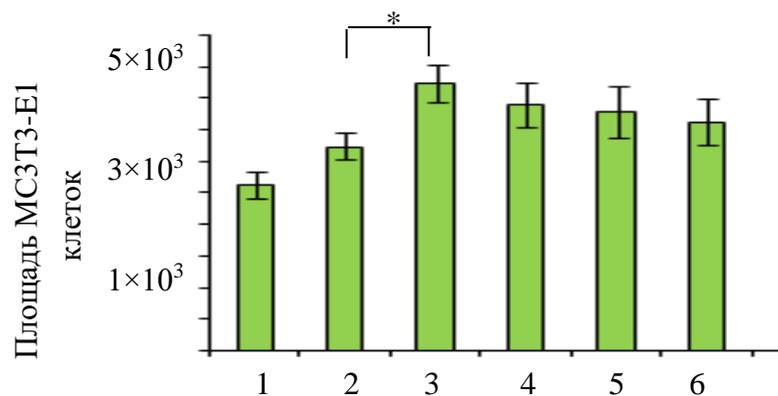
Результаты теста МТТ и пролиферации хорошо согласуются и указывают на цитосовместимость покрытий ПЭО.

6.2.4. Результаты исследования биосовместимости покрытий $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-B}$

Результаты морфометрического анализа и исследований на дифференцировку клеток МС3Т3-Е1 приведены на рисунке 6.12.



(а)



(б)

Рисунок 6.14 – (а) Морфология и (б) дифференцировка клеток МС3Т3-Е1. 1 - контроль (стекло), 2 - контроль (TiCaPCON), 3 - TiCaPCON-8% В, 4 - TiCaPCON-11% В, 5 - TiCaPCON-15% В, 6 - $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}$ -11% В. * $p < 0,001$

Морфометрический анализ показал, что поверхность покрытий TiCaPCON-B адгезионна для клеток MC3T3-E1, они хорошо распределились по субстратам, а сеть их актиновых пучков была хорошо организована (рисунок 6.14а). VO_x /TiCaPCON-11% B покрытие незначительно изменяло их форму. Средняя площадь клеток на поверхности покрытий с B, была заметно выше по сравнению с двумя контрольными образцами (рисунок 6.14б), повышение концентрации B привело к увеличению площади. Таким образом, результаты показали, что легирование B улучшает прикрепление и распространение клеток.

Была проведена оценка пролиферации клеток MC3T3-E1 на поверхности всех покрытий TiCaPCON-B и VO_x /TiCaPCON-11% B (рисунок 6.15)

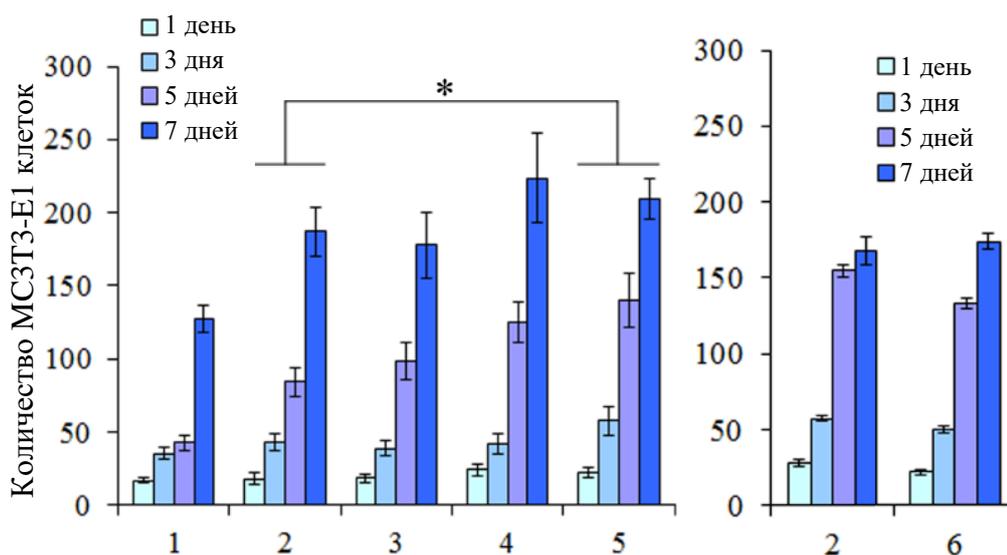


Рисунок 6.15 – Пролиферация клеток MC3T3-E1 на поверхности: 1 - контроль (стекло), 2 - контроль (TiCaPCON), 3 - TiCaPCON-8% B, 4 - TiCaPCON-11% B, 5 - TiCaPCON-15% B, 6 - VO_x /TiCaPCON-11% B. * p < 0,001

Рисунок 6.15 демонстрирует, что на поверхности покрытий TiCaPCON-B скорость пролиферации была высокой (рисунок 6.15). Количество клеток на образцах TiCaPCON с 11 и 15 ат.% B после 5 и 7 дней выдержки было больше, чем на контроле. Двухслойное покрытие VO_x / TiCaPCON-11% B оказалось

способно поддерживать такой же уровень пролиферации клеток, как и покрытие TiCaPCON. Результаты испытаний показали, что все типы В-содержащих покрытий нетоксичны для клеток независимо от их поверхностного состава.

6.3. Исследование биоактивности покрытий

6.3.1. Методика исследования биоактивности покрытий

Биоактивность покрытий оценивали по их способности поддерживать остеогенную дифференциацию. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ), которая является ранним маркером дифференцировки остеобластических клеток, оценивали с помощью количественного колориметрического метода. Клетки MC3T3-E1 (10^4 клетки/мл) высевали на поверхности покрытых образцов, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 и 10% FBS. На следующий день среду заменяли на α -MEM (Invitrogen) с 10% FBS, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma) и 10 мМ β -глицерофосфата (Sigma). Культуры выращивали в инкубаторе с 5% CO₂, при 37°C в течение 14 дней, среду заменяли каждые три дня. После 14 дней инкубации образцы промывали сбалансированным солевым раствором Эрла и переносили в другой планшет. Клетки отделяли от образцов с помощью раствора трипсин/ЭДТА, промывали PBS и ресуспендировали в 200 мкл 0,1% Triton X-100, 10 мМ Tris-Cl (pH = 7,5), 1 мМ MgCl₂ и подвергали 4 циклам заморозки/разморозки и обработки ультразвуком. После этого 100 мкл п-нитрофенилфосфата (pNPP) добавляли к 10 мкл клеточного лизата с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C. Планшет считывали при длине волны 405 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc.). Активность ЩФ определяли как скорость высвобождения п-нитрофенола из pNPP и выражали в нмоль/мин п-нитрофенола на миллиграмм клеточного белка. Все измерения были представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

6.2.2 Результаты исследования биоактивности покрытий TiCaPCON-Ag,Zn

В таблице 6.4 сравнивается активность ЩФ клеток MC3T3-E1, культивируемых на поверхности покрытий после имплантации ионов Ag и Zn.

Таблица 6.4. Активность ЩФ клеток MC3T3-E1, культивируемых на поверхности исследуемых образцов

Образец	Активность ЩФ
F12 (недифференцируемая среда)	160 ± 17
TiCaPCON (контроль)	787 ± 38
TiCaPCON-Ag	549 ± 23
TiCaPCON-Ag-Zn	616 ± 17
TiCaPCON-Zn	719 ± 15*

* значения, существенно не отличающиеся от TiCaPCON. (t-тест, $p < 0.001$)

Покрытие с Zn, было способны поддерживать относительно высокий уровень активности ЩФ в клетках MC3T3-E1, растущих на их поверхности, что указывает на его хорошие остеокондуктивные характеристики. Различие с контрольным образцом не было статистически значимым. Покрытия, содержащие ионы Ag незначительно снижали активность ЩФ.

6.2.3. Результаты исследования биоактивности покрытий ПЭО TiO₂/Ag,Pt

В таблице 6.5 показаны активности ЩФ клеток MC3T3-E1, культивируемых на поверхности протестированных покрытий TiO₂, ПЭО TiO₂/Pt и ПЭО TiO₂/Ag до и после выдержки 24 часа в ФР.

Таблица 6.5. Активность ЩФ клеток МС3Т3-Е1 культивируемых на поверхности

Образцы	Активность ЩФ (нмоль/мг протеин/мин)	
	Тест 1	Тест 2 (после выдержки в ФР в течение 24 часов)
F12 (недифференцируемая среда)	40 ± 2	220 ± 10
Ti (контроль)	750 ± 80	870 ± 50
Ti	580 ± 30	780 ± 70
TiO ₂	230 ± 20	830 ± 50
TiO ₂ /Ag	270 ± 20	870 ± 40
TiO ₂ /Pt	250 ± 15	960 ± 30

Поверхности всех покрытий ПЭО TiO₂ поддерживали в два раза более низкую активность ЩФ, чем образец Ti. Активности ЩФ для TiO₂, ПЭО TiO₂/Pt и ПЭО TiO₂/Ag покрытий были очень похожи, что указывает на отсутствие заметного влияния НЧ Pt и Ag. Принимая во внимание результаты тестов на биологическую активность в РИВС (глава 4), было предположено, что наблюдаемое снижение уровня активности ЩФ в образцах ПЭО может указывать на удачу биоактивности из-за высоких концентраций P и Ca на поверхности материала.

ЩФ — это фермент, который удаляет фосфатные группы из многих молекул путем дефосфорилирования [283]. Активность ЩФ очень чувствительна к концентрациям ионов Ca и P [284]. Ca и P способствуют пролиферации, дифференцировке остеобластических клеток и усилению минерализации, но могут подавлять активность ЩФ. Низкая активность ЩФ часто наблюдается при высокой концентрации растворенного неорганического фосфата [285]. В присутствии ионов P даже небольшое количество ионов Ca (4–40 млн⁻¹) приводило к потере митохондриальной функции остеобластических клеток [286]. Исследования главы 4 демонстрируют, что покрытия ПЭО-TiO₂/Ag,Pt выпускают около 275–325 млн⁻¹ ионов P через 72 часа. Формой ионов P в ФР в основном являются фосфаты PO₄³⁻. Необходимо было изучить активность ЩФ после выхода основной части ионов Ca и P (через 72 часа).

Выявить возможный вклад высокой концентрации Р и, возможно, ионов Са в общую активность ЩФ, было решено дополнительным тестом 2 после предварительной выдержки образцов TiO₂, ПЭО TiO₂/Pt и ПЭО TiO₂/Ag в ФР в течение 72 часов (таблица 6.5). Выдержка 24 часа приводила практически к полному выходу ионов Са, а выщелачивание ионов Р значительно замедлилось (глава 4). Тест показал, что уровень активности ЩФ был высоким и существенно не отличался от контроля Ti для всех изученных образцов (таблица 6.5).

Процесс минерализации сопровождается высвобождением ионов кальция и ортофосфата, в результате чего сначала образуется аморфный фосфат, а после преобразуется в кристаллическую фазу на основе фосфата кальция [287-288]. Высококристаллический ГА обычно нерастворим и не обладает остеоиндуктивным потенциалом, что препятствует прорастанию новой кости и интеграции с нативной костью [289]. Исследования главы 4 показали, что все образцы ПЭО-TiO₂/Ag,Pt способствовали образованию фазы СаР в РИВС. Таким образом покрытия ПЭО-TiO₂/Ag,Pt показывают хорошую минерализующую способность, которая связана с интенсивным высвобождением ионов Са и Р, хотя чрезмерное количество Са²⁺ краткосрочно понижает активность ЩФ. Концентрация ионов в условиях *in vivo* ионы будут быстро снижаться из-за удаления током крови, поэтому краткосрочное снижение пролиферации остеобластических клеток или активности ЩФ, учитывая хорошую минерализационную способность *in vitro* и высокую антибактериальную эффективность, оправдано.

Результаты испытаний показали, что

- а) высокая концентрация Са²⁺ в первые 48 часов снизила уровень активности ЩФ, которая восстановилась только после высвобождения Са²⁺.
- б) непрерывное высвобождение ионов Р не повлияло на активность ЩФ.
- в) активность ЩФ в тестах не зависела от НЧ Ag или Pt.
- г) отсутствует прямая корреляция между активностью ЩФ и способностью к минерализации в РИВС.

6.2.4. Результаты исследования биоактивности покрытий $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON-B}$

Рисунок 6.16 показывает активность ЩФ клеток MC3T3-E1 на поверхности покрытий TiCaPCON-B и контрольных образцов.

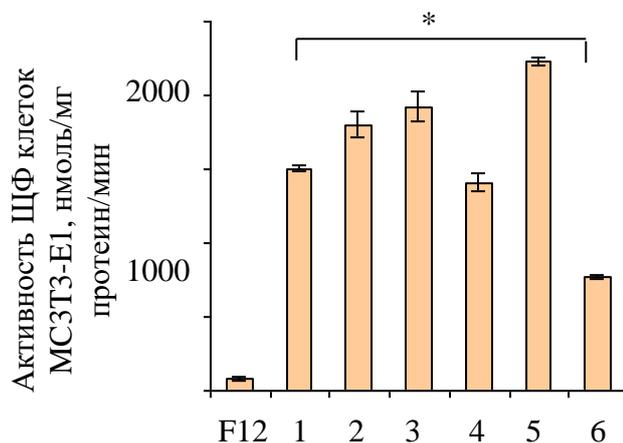


Рисунок 6.16 – Активность ЩФ клеток MC3T3-E1 на поверхности: 1 - контроль (стекло), 2 - контроль (TiCaPCON), 3 - TiCaPCON-8% В, 4 - TiCaPCON-11% В, 5 - TiCaPCON-15% В, 6 - $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}$ -11% В. * $p < 0,001$

Рисунок 6.16 показывает, что максимальный уровень активности ЩФ имело покрытие TiCaPCON-15% В. Покрытия TiCaPCON и TiCaPCON-8% В также продемонстрировали способность поддерживать высокий уровень активности ЩФ клеток MC3T3-E1. Покрытие с 11 ат.% В, имело самую низкую активность ЩФ, однако, такая же активность была и для контрольного образца 1. Результаты исследований подтвердили данные о том, что высвобождение ионов В значительно усиливает активность ЩФ [290] и способность образовывать апатит [291]. Важно отметить, что даже при самой низкой концентрации Са и Р, покрытие с 15 ат.% В имело самый высокий уровень активности ЩФ.

Покрытие $\text{VO}_x/\text{TiCaPCON}$ -11% В, которое обладало высокими бактерицидными свойствами, показало самую низкую активность ЩФ по сравнению с контрольными образцами (рисунок 6.16).

Результаты экспериментов на биосовместимость и биоактивность образцов TiCaPCON, легированных В, демонстрируют:

а) клетки MC3T3-E1 лучше дифференцировали по поверхности покрытий с В, чем на покрытии без В.

б) Остеобластические клетки MC3T3-E1 продемонстрировали высокую скорость пролиферации на всех В-содержащих поверхностях

в) слой В₂О₃ слабо стимулировал клетки MC3T3-E1 к остеогенной дифференцировке и снижал активность ЩФ.

г) покрытия с В способствовали высокой активности ЩФ даже при низкой концентрации Са и Р.

Введение В оказывает положительное влияние на прикрепление, распространение, пролиферацию и дифференцировку остеобластических клеток, а дополнительный растворимый слой В₂О₃ обеспечивает антибактериальную активность. Разработанные покрытия открывают новые возможности для производства биологически безопасных материалов с сильными антибактериальными характеристиками для будущего применения в ортопедической области.

ВЫВОДЫ

1. Комбинацией методов магнетронного распыления, ионной имплантации и последующего низкотемпературного отжига получены покрытия TiCaPCON, декорированные наночастицами Ag, Zn, Pt, Fe и их оксидами. Выявлены закономерности выхода ионов металлов с поверхности покрытий в зависимости от типа, комбинации и окисленного состояния наночастиц. Показано, что частицы разнородных металлов (Ag, Pt, Zn и Fe) на поверхности покрытий TiCaPCON выполняют функцию активных катодов или анодов, ускоряя или замедляя процесс выхода ионов. В присутствии наночастиц Zn, растворение наночастиц Ag замедляется, так как они находятся под катодной защитой. И, наоборот, в присутствии наночастиц Ag или Pt, растворение наночастиц Zn или Fe ускоряется. В случае двухкомпонентных наночастиц Ag+Zn и Pt+Fe быстрый выход ионов Zn и Fe на начальном этапе растворения приводит к «захвату» ионов Ag и Pt.

2. Выявлены закономерности структурных превращений под действием ионной имплантации и последующего отжига: Pt взаимодействовала с Ti с образованием интерметаллических соединений PtTi, а присутствие наночастиц Fe или Pt замедляло процесс окисления поверхности покрытий TiCaPCON.

3. Показано, что покрытия TiCaPCON с наночастицами Pt и Fe на поверхности являются активными фотокатализаторами и генерируют активные формы кислорода под действием ультрафиолетового облучения (УФ) и искусственного света, что обеспечивает их бактерицидные характеристики. Без наночастиц, концентрация АФК была низкой. Образцы, имплантированные Pt и Fe, показали максимальные концентрации АФК после УФ облучения и нахождения в физиологическом растворе (0.9 вес.% NaCl в воде) в течение 3-12 часов: 720 (Pt), 1700 (Pt_{от}), 1310 (Fe_{от}), 2970 (Pt+Fe), 1970 (Pt_{от}+Fe) и 1180 нмоль/см² (Pt+Fe)_{от}. Скорость рекомбинации АФК с катионами раствора составила 1,3–7,8 нмоль/см² в час.

4. Методом Кельвин-зондовой силовой микроскопии продемонстрировано наличие разности потенциалов между наночастицами Pt (с преобладанием PtTi) и покрытием TiCaPCON. Исключив вклад бактерицидных ионов и АФК, показано, что гибель бактерий может быть связана с микрогальваническим взаимодействием бактерий с поверхностью покрытий TiCaPCON, декорированной наночастицами.

5. Методом плазменного электролитического окисления и последующей ионной имплантации получены покрытия на основе TiO₂ легированные Ca и P, и декорированные наночастицами Ag и Pt. Определен оптимальный состав электролита и режим получения покрытий, обеспечивающий толщину покрытия 6–7 мкм, пористость 12,1 %, равномерное распределение однородных пор размером 1–2 мкм и содержание Ca и P равное 6,3 и 4,8 ат.%, соответственно. Покрытия состояли из TiO₂ (анатаз), в качестве основного компонента, и небольшого количества TiO₂ (рутил), фосфата и ортофосфата кальция. Наночастицы Ag со структурой ядро-оболочка Ag@AgO_x имели размер 3–6 нм, а наночастицы Pt, размером 10–20 нм, находились в металлическом состоянии.

6. Исследования кинетики выхода элементов и эксперименты *in vitro*, в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма показали, что вследствие быстрого выхода ионов Ca и P (соответственно 700 млн⁻¹ и 300 млн⁻¹ через 72 часа) на поверхности ПЭО покрытий TiO₂/(Ag,Pt) образуются кристаллиты кальций-фосфатной фазы, что свидетельствует об их биоактивности. Установлено, что после УФ-облучения в течение 1 ч (условия стерилизации образцов перед антибактериальными тестами) максимальная концентрация АФК составляла 2750 (TiO₂), 3960 (TiO₂/Pt) и 4565 нмоль/см² (TiO₂/Ag).

7. ПЭО покрытия TiO₂/Ag и TiO₂/Pt показали быстрый выход ионов Ag и Pt в первые 3 часа до концентрации 0,45 млн⁻¹ и 0,08 млн⁻¹, после чего выход ионов замедлился. На основе результатов биологических испытаний сделано заключение о том, что ярко выраженный бактерицидный эффект

связан с воздействием на клетки бактерицидных ионов Ag и образующихся АФК. На примере образца, выдержанного в физиологическом растворе в течение 24 часов продемонстрирована длительная антибактериальная активность покрытий TiO₂/Ag.

8. Установлены закономерности влияния бора (8, 11 и 15 ат.%) на структуру, состав, электрохимические и биологические свойства покрытий TiCaPCON. Структурный анализ показал образование борсодержащих фаз TiB₂, BN и BN_xO_y в покрытиях. Введение бора не сильно влияло на потенциал свободной коррозии и плотность анодного тока покрытий. После начальной линейной зависимости выхода ионов бора от времени в течение 12 часов наблюдается замедление выхода ионов. Несмотря на относительно высокую концентрацию ионов бора, которая достигалась через 3 дня и составляла 90 млн⁻¹ (8% В) и 150 млн⁻¹ (11 и 15 ат.% В), образцы не показали антибактериальной активности во время биологических испытаний, но являлись биоактивными.

9. Биологические испытания, проведенные в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии показали, что покрытия TiCaPCON, имплантированные Ag, обладают ярко выраженной антибактериальной активностью в отношении бактериальных штаммов кишечной палочки (95% через 3 часа) и золотистого стафилококка (100% через 8 часов) при малой концентрации ионов серебра 0.11-0.3 млрд⁻¹. Кроме того, покрытия TiCaPCON, имплантированные Zn, проявили бактерицидную активность против бактерий *E. coli* (80% через 3 часа) при концентрации ионов Zn 15 млрд⁻¹. Покрытия TiCaPCON-Ag и TiCaPCON-Zn полностью деактивировали оба типа бактериальных штаммов через 24 часа. Все покрытия системы TiCaPCON-Pt,Fe инактивировали 97-100% бактериальных клеток *E. coli* U20 и 80-100% клеток *S.aureus* №839 (кроме образцов TiCaPCON-Pt и TiCaPCON-Pt_{от}). Некоторые покрытия также оказались эффективны в отношении *E. coli* K261, *K. pneumoniae* B1079k / 17-3, *A. baumannii* B1280A / 17, *S. aureus* № 839, *S. epidermidis* i5189-1, *E. faecium* Ya-235: VanA, *E. faecium* I-237: VanA. Покрытия

уничтожают 70-98% клеток *E.coli U20* после предварительной выдержки в ФР в течение 24 часов.

10. Биологические испытания, проведенные в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, показали, что покрытия TiO_2/Ag проявляют сильное бактерицидное действие в отношении штамма *E. coli U20* (чувствительного к антибиотикам), *E. coli K261* (устойчивого к антибиотикам), *S. aureus 839* и *S. aureus 224/228* (устойчивый к метициллину) и препятствовали образованию биопленки. Образец TiO_2/Pt проявил бактерицидную активность только в отношении штамма *E. coli U20*, но был антиадгезивным для штамма *S. aureus 224/228*. Покрытия TiCaPCON с верхним оксидным слоем (57% оксида бора (B_2O_3) и 43% субоксида бора (BO_x)) показали высокую антибактериальную активность в отношении антибиотик-устойчивого штамма *E. coli K261* и полностью предотвращали образование биопленки.

11. Биологические испытания, проведенные в ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, показали, что образцы покрытий TiCaPCON , модифицированные ионами Ag и Zn обеспечивают хорошую адгезию, распластывание и пролиферацию клеток остеобластов и поэтому не являются токсичными. Кроме того, покрытия TiCaPCON , декорированные наночастицами Ag и Zn продемонстрированы хорошие osteoconductive характеристики. Токсичное действие покрытий системы TiCaPCON-Pt,Fe в отношении лимфоцитов отсутствует. Биологические испытания также показали, что поверхность ПЭО покрытий на основе TiO_2 была адгезивной для остеобластов и способной поддерживать высокий уровень пролиферации клеток MC3T3-E1. Адгезия и пролиферация клеток также наблюдались на поверхности покрытий TiO_2/Pt , однако количество клеток было немного ниже по сравнению с TiO_2 без наночастиц. Цитосовместимость покрытий TiO_2 , TiO_2/Ag и TiO_2/Pt также была подтверждена МТТ-тестом. Покрытия TiCaPCON , модифицированные бором,

показали высокий уровень пролиферации, дифференцировки остеобластов и активности щелочной фосфатазы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Иванов, С.Ю. Стоматологическая имплантология: учебное пособие / С. Ю. Иванов, А.Ф. Бизяев. - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000. - 96 с
- 2 B. D. Ratner, A. S. Hoffman, A. S. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2004.
- 3 B. D. Ratner, A. S. Hoffman, A. S. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2004.
- 4 Brånemark P-I, G. Zarb, and T. Albrektsson, "Introduction to osseointegration," in *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*, Quintessence Publishing Co, 1985, pp. 11–76.
- 5 P. Hallam, F. Haddad, and J. Cobb, "Pain in the well-fixed, aseptic titanium hip replacement. The role of corrosion," *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B*, vol. 86, no. 1, pp. 27–30, Jan. 2004, doi: 10.1302/0301-620X.86B1.14326.
- 6 R. M. Urban, J. J. Jacobs, J. L. Gilbert, and J. O. Galante, "Migration of corrosion products from modular hip prostheses. Particle microanalysis and histopathological findings," *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A*, vol. 76, no. 9, pp. 1345–1359, 1994, doi: 10.2106/00004623-199409000-00009.
- 7 N. S. Manam et al., "Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 701. Elsevier Ltd, pp. 698–715, Apr. 15, 2017, doi: 10.1016/j.jallcom.2017.01.196.
- 8 A. Siddiqi, A. G. T. Payne, R. K. De Silva, and W. J. Duncan, "Titanium allergy: Could it affect dental implant integration?," *Clinical Oral Implants Research*, vol. 22, no. 7. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 673–680, Jul. 01, 2011, doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02081.x.
- 9 H. Egusa, N. Ko, T. Shimazu, and H. Yatani, "Suspected association of an allergic reaction with titanium dental implants: A clinical report," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 100, no. 5, pp. 344–347, Nov. 2008, doi: 10.1016/S0022-3913(08)60233-4.
- 10 P. Tengvall and I. Lundström, "Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial," *Clinical Materials*, vol. 9, no. 2. Elsevier, pp. 115–134, Jan. 01, 1992, doi: 10.1016/0267-6605(92)90056-Y.

- 11 J. Mungkalasiri, L. Bedel, F. Emieux, J. Doré, F.N.R. Renaud, F. Maury, DLI-CVD of TiO₂-Cu antibacterial thin films: growth and characterization, *Surf. Coat. Technol.* 204 (2009) 887-892.
- 12 Q. Dong, C. Chen, D. Wang, and Q. Ji, "Research status about surface modification of biomedical Ti and its alloys by micro-arc oxidation," *Surf. Rev. Lett.*, vol. 13, no. 1, pp. 35–43, Feb. 2006, doi: 10.1142/S0218625X06007792.
- 13 Хобкек, Д.А. Руководство по дентальной имплантологии / Д.А. Хобкек, Р.М. Уотсон, Л.Д. Сизн; под общ. ред. проф. М.З. Миргазизова. – 2-е изд. – М.: МЕДпресс информ, 2010. – 224 с.
- 14 Q. Dong, C. Chen, D. Wang, Q. Ji, Research status about surface modification of biomedical Ti and its alloys by micro-arc oxidation, *Surf. Rev. Lett.* 13 (2006) 35-43.
- 15 Q. Dong, C. Chen, D. Wang, and Q. Ji, "Research status about surface modification of biomedical Ti and its alloys by micro-arc oxidation," *Surf. Rev. Lett.*, vol. 13, no. 1, pp. 35–43, Feb. 2006, doi: 10.1142/S0218625X06007792.
- 16 Y. Wang, H. Yu, C. Chen, Z. Zhao, Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys, *Mater. Des.* 85 (2015) 640-652.
- 17 X. Rao, C. L. Chu, Q. Sun, and Y. Y. Zheng, "Fabrication and apatite inducing ability of different porous titania structures by PEO treatment," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 66, pp. 297–305, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.04.038.
- 18 A. Krzakała, A. Kazek-Kęsik, and W. Simka, "Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys," *RSC Advances*, vol. 3, no. 43. The Royal Society of Chemistry, pp. 19725–19743, Nov. 21, 2013, doi: 10.1039/c3ra43465f.
- 19 M. B. Sedelnikova et al., "Modification of titanium surface via Ag-, Sr- and Si-containing micro-arc calcium phosphate coating," *Bioact. Mater.*, vol. 4, pp. 224–235, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.07.001.
- 20 A. M. Greiner, A. Sales, H. Chen, S. A. Biela, D. Kaufmann, and R.

Kemkemer, “Nano- and microstructured materials for in vitro studies of the physiology of vascular cells,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 7, no. 1. Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften, pp. 1620–1641, 2016, doi: 10.3762/bjnano.7.155.

21 Wang, H. Hu, Y. Qiao, Z. Zhang, and J. Sun, “Enhanced Performance of Osteoblasts by Silicon Incorporated Porous TiO₂ Coating,” *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 28, no. 2, pp. 109–117, Feb. 2012, doi: 10.1016/S1005-0302(12)60030-9.

22 Q. Dong, C. Chen, D. Wang, Q. Ji, Research status about surface modification of biomedical Ti and its alloys by micro-arc oxidation, *Surf. Rev. Lett.* 13 (2006) 35-43.

23 A. Santos-Coquillat, M. Mohedano, E. Martinez-Campos, R. Arrabal, A. Pardo, and E. Matykina, “Bioactive multi-elemental PEO-coatings on titanium for dental implant applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 97, pp. 738–752, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.12.097.

24 F. Rupp, L. Scheideier, N. Olshanska, M. De Wild, M. Wieland, and J. Geisgerstorfer, “Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 76, no. 2, pp. 323–334, Feb. 2006, doi: 10.1002/jbm.a.30518.

25 D. Buser, R. K. Schenk, S. Steinemann, J. P. Fiorellini, C. H. Fox, and H. Stich, “Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 889–902, Jul. 1991, doi: 10.1002/jbm.820250708.

26 Q. Li, W. Yang, C. Liu, D. Wang, and J. Liang, “Correlations between the growth mechanism and properties of micro-arc oxidation coatings on titanium alloy: Effects of electrolytes,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 316, pp. 162–170, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.surfcoat.2017.03.021.

27 H.-J. Song, S.-H. Park, S.-H. Jeong, Y.-J. Park, Surface characteristics and bioactivity of oxide films formed by anodic spark oxidation on titanium in different electrolytes *J. Mater. Process. Tech.* 209 (2009) 864-870.

28 Биосовместимые материалы: учеб. пособие /Под ред. В.И. Севастьянова,

М.П. Кирпичникова. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011

29 Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO₂ nanotube composite coatings on titanium / Y. Yajing, Z. Xuejiao, H. Yong et al. // Applied Surface Science. – 2014. – Vol. 314. - pp. 348-357.

30 S. Xu, J. Long, L. Sim, C.H. Diong, K. Ostrikov, Plasma Process. Polym. 2005, 2, 373-390.

31 D. V. Shtansky, E. A. Levashov, N. A. Glushankova, N. B. D'yakonova, S. A. Kulinich, M. I. Petrzhik, F. V. Kiryukhantsev-Korneev. F. Rossi Structure and properties of CaO- and ZrO₂-doped TiC_xN_y coatings for biomedical applications. Surface and Coatings Technology 1 April 2004 Volume 182, Issue 1 Pages 101-111

32 Ивановский Г.Ф., Петров В.И. Ионно-плазменная обработка материалов. – М.: Радио и связь, 1986.

33 С. А. Першиков, И. И. Акимов, Н. Н. Краснобаев, А. О. Титов, Д. А. Крюков, В. Б. Смирницкий Сравнение методов магнетронного и термического напыления защитного покрытия для ленточных высокотемпературных сверхпроводников второго поколения / Альтернативная энергетика и экология : междунар. науч. журн. – 2012. – № 10. – С. 69–71

34 Кузьмичев А.И. Магнетронные распылительные системы. Киев: Изд-во Киевского политехн. ун-та, 2004. 108 с

35 Андриевский Р.А. Порошковое материаловедение / М.: Metallurgia (1991) 205

36 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.

37 E.A. Levashov and D.V. Shtansky, Rus. Chem. Rev., 2007, 76, 463-470.

38 E.A. Levashov, A.S. Rogachev, V.V. Kurbatkina, Y.K. Epishko and N.A. Kochetov, Int. J. SHS, 2007, 16, 218–24.

39 D.V. Shtansky, N.A. Glushankova, A.N. Sheveiko, M.A. Kharitonova, T.G. Moizhess, E.A. Levashov and F. Rossi, Biomaterials, 2005, 26, 2909-2924

- 40 D.V. Shtansky, E.A. Levashov, I.V. Batenina, N.A. Gloushankova, N.Y. Anisimova, M.V. Kiselevsky, I.V. Reshetov Recent progress in the field of multicomponent bioactive nanostructured films RSC Adv., 3 (2013), pp. 11107-11115
- 41 D.V. Shtansky, E.A. Levashov, I.V. Batenina, N.A. Gloushankova, N.Y. Anisimova, M.V. Kiselevsky, I.V. Reshetov Recent progress in the field of multicomponent bioactive nanostructured films RCS Advances, 3 (2013), pp. 11107-11115
- 42 Reid G. Biofilms in infectious disease and on medical devices // Int J Antimicrob Agents. – 1999. – Vol. 11 (3-4). – P. 223-226.
- 43 C. Fang, T.M. Wong, T.W. Lau, K.K. To, S.S. Wong, F. Leung Infection after fracture osteosynthesis - Part I Journal of orthopaedic surgery. 25 (2017)
- 44 Trampuz A., Widmer A.F. Infections associated with orthopedic implants // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 19, № 4. – P. 349-356.
- 45 K. Glinel, et al. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches Acta Biomater., 8 (2012), pp. 1670-1684
- 46 X. Li Bactericidal mechanism of nanopatterned surfaces Phys. Chem. Chem. Phys., 18 (2) (2016), pp. 1311-1316
- 47 Stewart P.S., Bjarnsholt T. Risk factors for chronic biofilm-related infection associated with implanted medical devices, Clinical Microbiology, and Infection. 26 (2020) 1034-1038
- 48 D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance Biomaterials, 27 (2006), pp. 2331-2339
- 49 Хобкек, Д.А. Руководство по дентальной имплантологии / Д.А. Хобкек, Р.М. Уотсон, Л.Д. Сизн; под общ. ред. проф. М.З. Миргазизова. – 2-е изд. – М.: МЕДпресс информ, 2010. – 224 с.
- 50 Donlan, R. M. Biofilms and Device-associated Infections. Emerging Infect. Dis. 2001, 7, 277-281. Page

- 51 C.R. Arciola, D. Campoccia Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion *Nat. Rev. Microbiol.*, 16 (2018), pp. 397-409
- 52 M. Wang, T. Tang Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning *J. Orthop. Transl.*, 17 (2019), pp. 42-54
- 53 Marrie T.J., Nelligan J., Costerton J.W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead // *Circulation*. - 1982. - Vol. 66. – P. 1339–1341.
- 54 Иванов, С.Ю. Стоматологическая имплантология: учебное пособие / С.Ю. Иванов, А.Ф. Бизяев. - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000. - 96 с.
- 55 Шкодкин С.В., Жернакова Н.И., Идашкин Ю.Б. Некоторые аспекты нозокомиальной инфекции // *Научные ведомости Белгородского государственного университета*. – 2013. - № 4(147). – С. 5-11.
- 56 Голуб А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // *Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия*. – 2012. - № 1. – С. 23-29.
- 57 Tuson NH, Weibel DB. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter* 2013;9:4368–80.
- 58 Jafar Hasan, Russell J. Crawford, and Elena P. Ivanova Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials
- 59 Z. Cao, *et al.* Reversibly switching the function of a surface between attacking and defending against bacteria *Angew. Chem.*, 124 (2012), pp. 2656-2659
- 60 Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications *Acta Biomaterialia*, Volume 16, 1 April 2015, Pages 1-13
- 61 Harrasser, N.; Jüssen, S.; Obermeir, A.; Kmeth, R.; Stritzker, B.; Gollwitzer, H.; Burgkart, R. Antibacterial Potency of Different Deposition Methods of Silver and Copper Containing Diamond-Like Carbon Coated Polyethylene. *Biomater. Res.* 2016, 20,17.
- 62 Rau, J.V.; Curcio, M.; Raucci, M.G.; Barbaro, K.; Fasolino, I.; Teghil, R.; Ambrosio, L.; De Bonis, A.; Voccaccini, A.R. Cu-Releasing Bioactive Glass

Coatings and Their in Vitro Properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11, 5812-5820.

63 Brobbey, K.J.; Haapanenb, J.; Mäkelä, J.M.; Gunell, M.; Eerola, E.; Rosqvist, E.; Peltonen, J.; Saarinen, J.J.; Tuominen, M.; Toivakka, M. Effect of Plasma Coating on Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Thin Solid Films* 2019, 672, 75–82.

64 Nastulyavichus, A.; Kudryashov, S.; Smirnov, N.; Saraeva, I.; Rudenko, A.; Tolordava, E.; Ionin, A.; Romanova, Y.; Zayarny, D. Antibacterial Coatings of Se and Si Nanoparticles. *Applied Surface Science* 2019, 469, 220–225.

65 Sukhorukova, I.V.; Sheveyko, A.N.; Kiryukhantsev-Korneev, Ph.V.; Anisimova, N.Yu.; Gloushankova, N.A.; Zhitnyak, I.V.; Benesova, J.; Amler, E.; Shtansky, D.V. Two Approaches to Form Antibacterial Surface: Doping with Bactericidal Element vs Drug Loading. *Applied Surface Science*, 2015, 330, 339-350.

66 Kaur, R.; Liu, S. Antibacterial Surface Design – Contact Kill. *Progress in Surface Science* 2016, 91, 136–153.

67 Sukhorukova, I.V.; Sheveyko, A.N.; Manakhov, A.M.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Denisenko, E.A.; Filippovich, S. Yu.; Ignatov, S.G.; Shtansky, D.V. Synergistic and Long-Lasting Antibacterial Effect of Antibiotic-Loaded TiCaPCON-Ag Films Against Pathogenic Bacteria and Fungi. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 90, 289-299.

68 Modaresifar, K.; Azizian, S.; Ganjian, M.; Fratila-Apachitei, L.E.; Zadpoor, A.A. Bactericidal Effects of Nanopatterns: A Systematic Review. *Acta Biomat.* 2019, 83, 29-36.

69 Elbourne, A.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. Nano-Structured Antimicrobial Surfaces: From Nature to Synthetic Analogues. *J. Colloid. Interface Sci.* 2017, 15, 603-616.

70 Linklater, D.P.; De Volder, M.; Baulin, V.A.; Werner, M.; Jessl, S.; Golozar, M.; Maggini, L.; Rubanov, S.; Hanssen, E.; Juodkazis, S.; Ivanova, E.P. High Aspect

Ratio Nanostructures Kill Bacteria via Storage and Release of Mechanical Energy. ACS Nano 2018, 12, 6657-6667.

71 M. Cloutier, D. Mantovani, F. Rosei Antibacterial coatings: challenges, perspectives, and opportunities Trends Biotechnol., 12 (2015), pp. 1-16

72 Sun Y., Tan J., W B. u, Wang J., Qu S., Weng J., Feng B. Identification and binding mechanism of phage displayed peptides with specific affinity to acid-alkali treated titanium // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, - 2016, - V. 146, - P. 307-317

73 Héquet A., Humblot V., Berjeaud J.-M., Pradier C.-M. Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, - 2011, - V. 84, - I. 2, - P. 301-309

74 Humblot V., Tejeda A., Landoulsi J., Vallée A., Naitabdi A., Taleb A., Pradier C.-M. Walking peptide on Au(110) surface: Origin and nature of interfacial process // Surface Science, - 2014, V. 628, P. 21-29

75 Godoy-Gallardo M., Mas-Moruno C., Fernández-Calderón M. C., Pérez-Giraldo C., Manero J. M., Albericio F., Gil F. J., Rodríguez D. Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation // Acta Biomaterialia, - 2014, - V.10, I. 8, - P. 3522-3534

76 Chauveau F., Pestourie C., Tavitian B. Aptamers: selection and scope of applications // Pathol. Biol. (Paris), - 2006, -№54, - p. 251-258

77 Kim H.M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment // J Mater Sci Mater Med, 8 (1997), pp. 341-347

78 Chen Z., Li Q., Chen J., Luo R., Maitz M. F., Huang N. Immobilization of serum albumin and peptide aptamer for EPC on polydopamine coated titanium surface for enhanced in-situself-endothelialization // Materials Science and Engineering: C, - 2016, - V. 60, - P. 219-229

79 Chen W.-C., Ko C.-L. Roughened titanium surfaces with silane and further RGD peptide modification in vitro // Materials Science and Engineering: C, - 2013, - V. 33, - I. 5, P. 2713-2722

- 80 Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel / C.N. Kraft, M. Hansis, S. Arens et al // Journal of Biomedical Materials Research. – 2000. – Vol. 49. – I. 2. – pp. 192–199.
- 81 Influence of silver content on the tribomechanical behavior on Ag-TiCN bioactive coatings / J.C. Sánchez-López, M.D. Abad, I. Carvalho et al. // Surface & Coatings Technology – 2012. – Vol. 206. – pp. 2192–2198
- 82 S. Myung, S. Jung, B. Kim Immobilization and controlled release of drug using plasma polymerized thin film Thin Solid Films, 584 (2015), pp. 13-17
- 83 Z. Yang, J. Wang, R. Luo, M.F. Maitz, F. Jing, H. Sun, N. Huang The covalent immobilization of heparin to pulsed-plasma polymeric allylamine films on 316L stainless steel and the resulting effects on hemocompatibility Biomaterials, 31 (2010), pp. 2072-2083
- 84 Atay, H.Y.; Çelik, E. Investigations of Antibacterial Activity of Chitosan in the Polymeric Composite Coatings. Prog. Org. Coat. 2017, 102, 194-200.
- 85 Lepoittevin, B.; Bedel, S.; Dragoé, D.; Bruzard, J.; Barthés-Labrousse, M.-G.; Mazerat, S.; Herry, J.-M.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Roger, P. Antibacterial Surfaces Obtained through Dopamine and Fluorination Functionalizations. Prog. Org. Coat. 2015, 82, 17–25.
- 86 Kato, T.; Shirai, T. Temporal Attenuation of Iodine Content and Its Effect on the Antibacterial Activity of Iodine-Supported Titanium Implants. J. Microb. Biochem. Technol. 2016, 8, 285–289.
- 87 Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C.R. A Review of the Biomaterials Technologies for Infection-Resistant Surfaces. Biomaterials 2013, 34, 8533–8554.
- 88 Cometa, S.; Bonifacio, M.A.; Baruzzi, F.; Candia, S.; Giangregorio, M.M.; Giannossa, L.C.; Dicarolo, M.; Mattioli-Belmonte, M.; Sabbatini, L.; Giglio, E. Silver-Loaded Chitosan Coating as an Integrated Approach to Face Titanium Implant-Associated Infections: Analytical Characterization and Biological Activity. Anal. Bioanal. Chem. 2017, 409, 7211-7221.

- 89 A. Onishi, K. St Ange, J.S. Dordick, R.J. Linhardt Heparin and anticoagulation *Front. Biosci. - Landmark*, 21 (2016), pp. 1372-1392 View Record in ScopusGoogle Scholar
- 90 W. Zhou, Z. Jia, P. Xiong, J. Yan, M. Li, Y. Cheng, Y. Zheng Novel pH-responsive tobramycin-embedded micelles in nanostructured multilayer coatings of chitosan/heparin with efficient and sustained antibacterial properties *Mater. Sci. Eng. C*, 90 (2018), pp. 693-705
- 91 A. Mazumdar, Y. Haddad, V. Milosavljevic, H. Michalkova, R. Guran, S. Bhowmick, A. Moulick Peptide-carbon quantum dots conjugate, derived from human retinoic acid receptor responder protein 2, against antibiotic-resistant gram positive and gram negative pathogenic bacteria *Nanomaterials*, 10 (2020), pp. 325-344
- 92 F. Siedenbiedel, J.C. Tiller Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: overview and functional principles *Polymers (Basel)*, 4 (2012), pp. 46-71
- 93 J.A. Lichter, K.J. Van Vliet, M.F. Rubner Design of antibacterial surfaces and interfaces: polyelectrolyte multilayers as a multifunctional platform *Macromolecules*, 42 (2009), pp. 8573-8586
- 94 P. Gentile, I. Carmagnola Modulation of release kinetics by plasma polymerization of ampicillin-loaded β -TCP ceramics *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 49 (2016), pp. 304004-304014
- 95 X. Shi, Y. Ye, H. Wang, F. Liu, Z. Wang Designing pH-responsive biodegradable polymer coatings for controlled drug release via vapor-based route *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10 (2018), pp. 38449-38458
- 96 T. Fouquet, H. Ibn, E. Ahrach, C. Becker, T.N.T. Phan, F. Ziarelli, D. Gigmes, D. Ruch Water sensitive coatings deposited by aerosol assisted atmospheric plasma process: tailoring the hydrolysis rate by the precursor chemistry *Plasma Process. Polym.*, 12 (2015), pp. 1293-1301
- 97 B.R. Coad, M. Jasieniak, S.S. Griesser, H.J. Griesser Controlled covalent surface immobilization of proteins and peptides using plasma methods *Surf. Coat. Technol.*, 233 (2013), pp. 169-177

- 98 K. Vasilev, S.S. Griesser, H.J. Griesser Antibacterial surfaces and coatings produced by plasma techniques *Plasma Process. Polym.*, 8 (2011), pp. 1010-1023
- 99 J. Liang, J. She, H. He, Zh. Fan, S. Chen, J. Li, B. Liu A new approach to fabricate polyimidazolium salt (PIMS) coatings with efficient antifouling and antibacterial properties *Appl. Surf. Sci.*, 478 (2019), pp. 770-778
- 100 M.J.R. Ahonen, D.J. Suchyta, H. Zhu, M.H. Schoenfisch Nitric oxide-releasing alginates *Biomacromolecules*, 19 (2019), pp. 1189-1197
- 101 L. Yuan, D.L. Slomberg, M.H. Schoenfisch Nitric oxide-releasing chitosan oligosaccharides as antibacterial agents *Biomaterials*, 35 (2015), pp. 1716-1724
- 102 H. Jin, L. Yang, M.J.R. Ahonen, M.H. Schoenfisch Nitric oxide-releasing cyclodextrins *J. Am. Chem. Soc.*, 140 (2019), pp. 14178-14184
- 103 N. Barraud, M.V. Storey, Z.P. Moore, J.S. Webb, S.A. Rice, S. Kjelleberg Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms *Microb. Biotechnol.*, 2 (2009), pp. 370-378
- 104 P. Krukowski, W. Kozłowski, W. Olejniczak, Z. Klusek, M. Puchalski, P. Dabrowski, P.J. Kowalczyk, K. Gwozdziński, G. Grabowski Formation of dense nitroxide radical layers on the Au(1 1 1) substrate for ESN-STM measurement *Appl. Surf. Sci.*, 255 (2008), pp. 1921-1928
- 105 S.A. Alexander, C. Kyi, C.H. Schiesser Nitroxides as anti-biofilm compounds for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* and mixed-culture biofilms *Org. Biomol. Chem.*, 13 (2015), pp. 4751-4759
- 106 A.D. Verderosa, S.C. Mansour, C. de la Fuente-núñez, R.E.W. Hancock, K.E. Fairfull-Smith Synthesis, and evaluation of ciprofloxacin-nitroxide conjugates as anti-biofilm agents *Molecules*, 21 (2016), pp. 841-857
- 107 Watnick, P., Kolter, R., Biofilm, city of microbes, *Journal of Bacteriology*. 182 (2000) 2675-2679
- 108 I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, A. Manakhov, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova, E.A. Denisenko, S.Yu. Filippovich, S.G. Ignatov, D.V. Shtansky Synergistic and long-lasting antibacterial effect of antibiotic-loaded TiCaPCON-Ag

- films against pathogenic bacteria and fungi *Mater. Sci. Eng. C*, 90 (2018), pp. 289-29
- 109 X. Liu, P.K. Chu, Ch. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Mat. Sci. Eng.* 47 (2004) 49-121.
- 110 M. Niinomi, Y. Liu, M. Nakai, H. Liu, H. Li, Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone, *Regen. Biomater.* 3 (2016) 173–185.
- 111 S. Bauer, P. Schmuki, K. von der Mark, J. Park, Engineering biocompatible implant surfaces, *Prog. Mater. Sci.* 58 (2013) 261–326.
- 112 M.L. Carman, T.G. Estes, A.W. Feinberg, J.F. Schumacher, W. Wilkerson, L.H. Wilson, M.E. Callow, J.A. Callow, A.B. Brennan, Engineered antifouling microtopographies--correlating wettability with cell attachment, *Biofouling* 22 (2006) 11-21.
- 113 C.M. Magin, C.J. Long, S.P. Cooper, L.K. Ista, G.P. Lopez, A.B. Brennan, Engineered antifouling microtopographies: the role of Reynolds number in a model that predicts attachment of zoospores of *Ulva* and cells of *Cobetia marina*, *Biofouling* 26 (2010) 719-727.
- 114 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.
- 115 D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials* 34 (2013) 8533-8554.
- 116 K. Anselme, P. Davidson, A.M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, L. Ploux, The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale, *Acta Biomat.* 6 (2010) 3824-3846.
- 117 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

- 118 C. Lüdecke, J. Bossert, M. Roth, K.D. Jandt, Physical vapor deposited titanium thin films for biomedical applications: Reproducibility of nanoscale surface roughness and microbial adhesion properties, *Appl. Surf. Sci.* 280 (2013) 578-589.
- 119 S.D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, T.J. Webster, The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment, *Biomaterials* 31 (2010) 706-713.
- 120 J.T. Seil, T. J. Webster, Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 2767-2781.
- 121 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
- 122 K. Hori, S. Matsumoto, Bacterial adhesion: From mechanism to control, *Biochem. Eng. J.* 48 (2010) 424-434.
- 123 M. Quirynen, C.M.L. Bollen, W. Papaioannou, J. Van Eldere, D. van Steenberghe, The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short term observations, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 11 (1996) 169-178.
- 124 D.P. Linklater, S. Juodkazis, E.P. Ivanova, Nanofabrication of mechano-bactericidal surfaces, *Nanoscale* 9 (2017) 16564-16585
- 125 Denver P Linklater, Saulius Juodkazis, Elena P. Ivanova Mechanical inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* by titanium substrata with hierarchical surface structures *Materialia*. 5 (2019) 100197
- 126 I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, N.V. Shvindina, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova, E.A. Denisenko, S.G. Ignatov, D.V. Shtansky, Approaches for Controlled Ag⁺ Ion Release: Influence of Surface Topography, Roughness, and Bactericide Content. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 4259-4271.
- 127 Therapeutic potential of boron-containing compounds / S.J. Baker, C.Z. Ding, T. Akama et al. // *Future Medicinal Chemistry*. - 2009. - Vol. 1. - №. 7. - pp. 1275–1288.

- 128 Doping TiO₂ with boron or/and cerium elements: Effects on photocatalytic antimicrobial activity / Y. Wang, Y. Wu, H. Yang et al. // *Vacuum*. – 2016. - Vol. 131. - pp. 58-64.
- 129 Y. Wang, X. Xue, H. Yang Synthesis and antimicrobial activity of boron-doped titania nano-materials *J. Chem. Chem. Eng.*, 22 (2014), pp. 474-479
- 130 Xiaolan Wang, Shaoxiang Liu, Mei Li, Peng Yu The synergistic antibacterial activity and mechanism of multicomponent metal ions-containing aqueous solutions against *Staphylococcus aureus* *Journal of Inorganic Biochemistry*. 163 (2016) 214-220
- 131 Y. Yang, N. Oh, Y. Liu, W. Chen, S. Oh, M. Appleford, S. Kim, K. Kim, S. Park, J. Bumgardner, W. Haggard, J. Ong, Enhancing osseointegration using surface-modified titanium implants, *JOM* 58 (2006) 71–76.
- 132 Q. Huang, X. Yang, R. Zhang, X. Liu, Q. Feng, Enhanced hydrophilicity and in vitro bioactivity of porous TiO₂ film through the incorporation of boron, *Ceram. Int.* 41 (2015) 4452-4459.
- 133 Q. Wang, H. Hu, Y. Qiao, Z. Zhang, J. Sun, Enhanced performance of osteoblasts by silicon incorporated porous TiO₂ coating, *J. Mater. Sci. Technol.* 28 (2012) 109-117.
- 134 L. Sopchenski, S. Cogo, M. F. Dias-Ntipanyj, S. Elifio-Espósito, P. Soares, Bioactive and antibacterial boron doped TiO₂ coating obtained by PEO, *Appl. Surf. Sci.*, 458 (2018) 49-58.
- 135 B.S. Necula, L.E. Fratila-Apachitei, S.A.J. Zaat, I. Apachitei, J. Duszczuk, In vitro antibacterial activity of porous TiO₂-Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 3573-3580.
- 136 Z. Yao, Y. Jiang, Z. Jiang, F. Wang, Z. Wu, Preparation and structure of ceramic coatings containing zirconium oxide on Ti alloy by plasma electrolytic oxidation, *J. Mater. Process. Technol.* 205 (2008) 303-307.
- 137 R. Zhou, D. Wei, S. Cheng, B. Li, Y. Wang, D. Jia, Y. Zhou, H. Guo, The structure and in vitro apatite formation ability of porous titanium covered bioactive

microarc oxidized TiO₂-based coatings containing Si, Na and Ca, *Ceram. Int.* 40 (2014) 501-509.

138 Yajing Y., Xuejiao Z., Yong H., Qiongqiong D., Xiaofeng P. Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO₂ nanotube composite coatings on titanium/ Y. Yajing, Z. Xuejiao, H. Yong, D. Qiongqiong, P Xiaofeng.// *Applied Surface Science.* – 2014. – Vol.314. - P.348-357.

139 Таранов С.Е.Р., Лифановская С.Ю., Дунин-Барковский Р.Л., Андреев В.И. О возможности использования гейзерита с нанесением серебряным покрытием в системе очистки питьевой воды / *Вестник Камчатского государственного технического университета.* 6 (2007) 77-79

140 C. Marambio-Jones, E.M.V. Hoek A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment *J. Nanopart. Res.*, 12 (2010), pp. 1531-1551

141 O.P. Terleeva, A.I. Slonova, I.V. Mironov, A.B. Rogov, Yu.P. Sharkeev, Microplasma synthesis of biocompatible coatings with additions of magnesium, silicon and silver on pure titanium from homogeneous electrolytes, *Surf. Coat. Technol.* 307 (2016) 1265-1273

142 Synthesis of Ag ion-implanted TiO₂ thin films for antibacterial application and photocatalytic performance / M. Xinggang, Ma Huiyan, L. Feng et al. // *Journal of Hazardous Materials.* – 2015. - Vol. 299. – pp.59-66.

143 D.V. Shtansky, I.V. Batenina, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev, A.N. Sheveyko Ag- and Cu-doped multifunctional bioactive nanostructured TiCaPCON films, *Appl. Surf. Sci.* 285 (2013) 331-343.

144 I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, N.V. Shvindina, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova, E.A. Denisenko, S.G. Ignatov, D.V. Shtansky, Approaches for Controlled Ag⁺ Ion Release: Influence of Surface Topography, Roughness, and Bactericide Content. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 4259-4271.

145 I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova, E.A. Denisenko, S.Y. Filipovich, S.G. Ignatov, D.V. Shtansky, Towards bioactive yet antibacterial surfaces, *Colloids Surf. B* 135 (2015) 158-165.

- 146 H. Yang, Y. Wang, X. Xue Influences of glycerol as an efficient doping agent on crystal structure and antibacterial activity of B-TiO₂ nano-materials *Col. Surf. B*, 122 (2014), pp. 701-708
- 147 X. Xue, Y. Wang, H. Yang Preparation and characterization of boron-doped titania nano-materials with antibacterial activity *Appl. Surf. Sci.*, 264 (2013), pp. 94-99
- 148 M. Benderdour, T. Bui-Van, A. Dicko, F. Belleville In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, 12 (1998), pp. 2-7
- 149 Z. Sayin, U.S. Ucan, A. Sakmanoglu Antibacterial and antibiofilm effects of boron on different bacteria *Biol. Trace Elem. Res.*, 173 (2016), pp. 241-246
- 150 Q. Luan, T. Desta, L. Chehab, V.J. Sanders, J. Plattner, D.T. Graves Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial *J. Dent. Res.*, 87 (2008), pp. 148-152
- 151 S.J. Baker, C.Z. Ding, T. Akama, Y.-K. Zhang, V. Hernandez, Y. Xia Therapeutic potential of boron-containing compounds *Future Med. Chem.*, 1 (2009), pp. 1275-1288
- 152 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 (2012) 236
- 153 Yifu Zhuang, Ling Ren, Kerong Dai Antibacterial effect of a copper-containing titanium alloy against implant-associated infection induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Acta Biomaterialia* 119 (2021) 472-484
- 154 Q. Huang, X. Li, T.A. Elkhoory, X. Liu, Y. Liu, The Cu-containing TiO₂ coatings with modulatory effects on macrophage polarization and bactericidal capacity prepared by micro-arc oxidation on titanium substrates, *Colloids Surf., B*. 170 (2018) 242-250.

- 155 B.S. Necula, J.P.T.M. van Leeuwen, L.E. Fratila-Apachitei, S.A.J. Zaat, I. Apachitei, J. Duszczyk, In vitro cytotoxicity evaluation of porous TiO₂-Ag antibacterial coatings for human fetal osteoblasts, *Acta Biomaterialia*, 8 (2012) 4191-4197.
- 156 B.S. Necula, I. Apachitei, F.D. Tichelaar, L.E. Fratila-Apachitei, J. Duszczyk, An electron microscopical study on the growth of TiO₂-Ag antibacterial coatings on Ti6Al7Nb biomedical alloy, *Acta Biomaterialia*, 7 (2011) 2751-2757.
- 157 Tahir, K.; Nazir, S.; Ahmad, A.; Li, B. Facile and Green Synthesis of Phytochemicals Capped Platinum Nanoparticles and in Vitro their Superior Antibacterial Activity. *J. Photochem. Photobiol.* 2017, 166, 246–251.
- 158 Hu, X., Li, F.; Noor, N.; Ling, D. Platinum Drugs: from Pt(II) Compounds, Pt(IV) Prodrugs, to Pt Nanocrystals/Nanoclusters, *Sci. Bull.* 2017, 62, 589-596.
- 159 Xia, H.; Li, F.; Hu, X.; Park, W.; Wang, S.; Jang, Y.; Du, Y.; Baik, S.; Cho, S.; Kang, T.; Kim, D.H.; Ling, D.; Hui, K.M.; Hyeon, T. PH-Sensitive Pt Nanocluster Assembly Overcomes Cisplatin Resistance and Heterogeneous Stemness of Hepatocellular Carcinoma. *ACS Cent. Sci.* 2016, 2, 802–811. H460
- 160 Dobrucka, R. Dlugaszewska, J. Antimicrobial Activity of the Biogenically Synthesized Core-Shell Cu@Pt Nanoparticles, *Saudi Pharm. J.* 2018,
- 161 Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seeni, A.; Kaus, N.H.M.; Ann, L.C.; Bakhori, S.K.M.; Hasan, H.; Mohamad, D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* 2015, 7, 219-242.
- 162 Pasquet, J.; Chevalier, Y.; Pelletier, J.; Couval, E.; Bouvier, D.; Bolzinger, M.-A. The Contribution of Zinc Ions to the Antimicrobial Activity of Zinc Oxide. *Colloid Surf. A* 2014, 457, 263-274.
- 163 Chwalibog, A.; Sawosz, E.; Hotowy, A.; Szeliga, J.; Mitura, S.; Mitura, K.; Grodzik, M.; Orłowski, P.; Sokolowska, A. Visualization of Interaction Between Inorganic Nanoparticles and Bacteria or Fungi. *Int. J. Nanomed.* 2010, 5, 1085-1094.
- 164 Cao, H.; Liu, X.; Meng, F.; Chu, P.K. Biological Actions of Silver Nanoparticles Embedded in Titanium Controlled by Micro-Galvanic Effects. *Biomaterials* 2011, 32, 693-705.

- 165 Park, M.V.D.Z.; Neigh, A.M.; Vermeulen, J.P.; de la Fonteyne, L.J.J.; Verharen, H.W.; Briede, J.J.; van Loveren, H.; de Jong, W.H. The Effect of Particle Size on the Cytotoxicity, Inflammation, Developmental Toxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles. *Biomaterials* 2011, 32, 9810-9817.
- 166 Li, J.; Liu, X.; Qiao, Y.; Zhu, H.; Ding, C. Antimicrobial Activity and Cytocompatibility of Ag Plasma-Modified Hierarchical TiO₂ Film on Titanium Surface. *Colloids Surf. B* 2014, 113, 134-145.
- 167 Qin, H.; Cao, H.; Zhao, Y.; Zhu, C.; Cheng, T.; Wang, Q.; Peng, X.; Cheng, M.; Wang, J.; Jin, G.; Jiang, Y.; Zhang, X.; Liu, X.; Chu, P.K. In Vitro and in Vivo Anti-Biofilm Effects of Silver Nanoparticles Immobilized on Titanium. *Biomaterials* 2014, 35, 9114-9125.
- 168 Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramirez, J.T.; Yacaman, M.J. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles, *Nanotechnology* 2005, 16, 2346-2353.
- 169 Cao, H.; Qiao, Y.; Liu, X.; Lu, T.; Cui, T.; Meng, F.; Chu P.K. Electron Storage Mediated Dark Antibacterial Action of Bound Silver Nanoparticles: Smaller is not Always Better. *Acta Biomater.* 2013, 9, 5100–5110
- 170 Kędziora, A.; Speruda, M.; Krzyzewska, E.; Rybka, J.; Łukowiak, A.; Bugla-Płoskońska G. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 444.
- 171 Ferraris S., Spriano S. Antibacterial titanium surfaces for medical implants *Materials Science and Engineering.* 61. (2016) 965-978
- 172 Y.Z. Wan, S. Raman, F. He, Y. Huang Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper *Vacuum*, 81 (2007), pp. 1114-1118
- 173 Y.Z. Wan, G.Y. Xiong, H. Liang, S. Raman, F. He, Y. Huang Modification of medical metals by ion implantation of copper *Appl. Surf. Sci.*, 253 (2007), pp. 9426-9429
- 174 A. L. Stepanov, R. I. Batalov, A. M. Rogov Pulse ion annealing of silicon layers with silver nanoparticles formed by ion implantation. 182 (2020) 109724

- 175 Ferraris, S.; Spriano, S. Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Mater. Sci. Eng. C* 2016, 61, 965-978.
- 176 Chourifa, H.; Bouloussa, H.; Migonney, V.; Falentin-Daudré, C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomater.* 2019, 83, 37-54.
- 177 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
- 178 Fletcher M. *Microbial Adhesion to Surfaces*. Chichester: Ellis Horwood, 1980.
- 179 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
- 180 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.
- 181 Cozens, D.; Read, R.C. Anti-Adhesion Methods as Novel Therapeutics for Bacterial Infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2012, 10, 1457-1468.
- 182 Cascioferro, S.; Grazia Cusimano, M.; Schillaci, D. Antiadhesion Agents against Gram-Positive Pathogens. *Future Microbiol.* 2014, 9, 1209–1220.
- 183 T. Albrektsson, P., I. Brånemark, H., A. Hansson, J. Lindström *Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man / Acta Orthopaedica Scandinavica* 52 (1981) 155-170
- 184 M. O. Riehle, M. J. Dalby, H. Johnstone, A. MacIntosh, and S. Affrossman, “Cell behaviour of rat calvaria bone cells on surfaces with random
- 185 Sileika, T.S., Kim, H.D., Maniak, P., Messersmith, P.B. Antibacterial Performance of Polydopamine-Modified Polymer Surfaces Containing Passive and Active Components. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2011, 3, 4602-4610.

- 186 Wang, G., Jin, W., Qasim, A.M., Gao, A., Peng, X., Li, W., Feng, H., Chu, P.K. Antibacterial Effects of Titanium Embedded with Silver Nanoparticles Based on Electron –Transfer-Induced Reactive Oxygen Species. *Biomaterials* 2017, 124, 25-34.
- 187 Chernousova, S.; Epple, M. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angew. Chem.* 2012, 52, 1636–1653.
- 188 Villanueva, M.E.; Diez, A.M.; González, J.A.; Pérez, C.J.; Orrego, M.; Piehl, L.; Teves, S.; Copello, G.J. Antimicrobial Activity of Starch Hydrogel Incorporated with Copper Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 16280-16288.
- 189 Mitra, D.; Li, M.; Kang, E.-T.; Neoh, K.-G. Transparent Copper-Loaded Chitosan/Silica Antibacterial Coating with Long-Term Efficacy, *ACS Appl Mater Inter* 2017, 9, 29515-29525.
- 190 Rai, A.; Prabhune, A.; Perry, C. Antibiotic Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles with Potent Antimicrobial Activity and Their Application in Antimicrobial Coatings. *J. Mater.Chem.* 2010, 20, 6789–6798.
- 191 Macdonald, T.J.; Wu, K.; Sehmi, S.K.; Noimark, S.; Peveler, W.J.; du Toit, H.; Voelcker, N.H.; Allan, E.; MacRobert, A.J.; Gavriilidis, A.; Parkin, I.P. Thiol-Capped Gold Nanoparticles Swell-Encapsulated into Polyurethane as Powerful Antibacterial Surfaces under Dark and Light Conditions. *Sci. Rep.* 2016, 6, 39272.
- 192 Hameed, A.S.H.; Karthikeyan, C.; Ahamed, A.P.; Thajuddin, N.; Alharbi, N.S.; Alharbi, S.A.; Ravi, G. In Vitro Antibacterial Activity of ZnO and Nd Doped ZnO Nanoparticles against ESBL Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae. *Sci. Rep.* 2016, 6, 24312.
- 193 Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-93
- 194 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

- 195 Vaidya, M.Y.; McBain, A.J.; Butler, J.A.; Banks, C.E.; Whitehead, K.A. Antimicrobial efficacy and synergy of metal ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in planktonic and biofilm phenotypes. *Sci. Rep.* 2017, 7, 5911
- 196 Sukhorukova, I.V.; Sheveyko, A.N.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Denisenko, E.A.; Filipovich, S.Yu.; Ignatov, S.G.; Shtansky, D.V. Toward bioactive yet antibacterial surfaces. *Colloid Surfaces B* 2015, 135, 158-165.
- 197 Mukha, I.P.; Eremenko, A.M.; Smirnova, N.P.; Mikhienkova, A.I.; Korchak, G.I.; Gorchev, V.F.; Chunikhin, A.Yu. Antimicrobial Activity of Stable Silver Nanoparticles of a Certain Size. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013, 49, 199–206.
- 198 Krishnan, B.; Mahalingam, S. Ag/TiO₂/Bentonite Nanocomposite for Biological Applications: Synthesis, Characterization, Antibacterial and Cytotoxic Investigations. *Adv. Powder Technol.* 2017, 28, 2265-2280.
- 199 Cowan, M.M.; Abshire, K.Z.; Houk, S.L.; Evans, S.M. Antimicrobial Efficacy of a Silver-Zeolite Matrix Coating on Stainless Steel. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 30, 102-106.
- 200 Heidenau, F.; Mittelmeier, W.; Detsch, R.; Haenle, M.; Stenzel, F.; Ziegler, G.; Gollwitzer H. A Novel Antibacterial Titania Coating: Metal Ion Toxicity and in Vitro Surface Colonization. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2005, 16, 883-888
- 201 Chen, M.; Yang, L.; Zhang, L.; Han, Y.; Lu, Z.; Qin, G.; Zhang, E. Effect of Nano/Micro-Ag Compound Particles on the Bio-Corrosion, Antibacterial Properties and Cell Biocompatibility of Ti-Ag alloys. *Mater. Sci. Eng. C.* 2017, 75, 906-917.
- 202 Calamak, S.; Aksoy, E.A.; Ertas, N.; Erdogan, C.; Sagiroglu, M.; Ulubayram, K. Ag/Silk Fibroin Nanofibers: Effect of Fibroin Morphology on Ag⁺ Release and Antibacterial Activity. *Eur. Polym. J.* 2015, 67, 99-112.
- 203 Zheng, Y.F.; Zhang, B.B.; Wang, B.L.; Wang, Y.B.; Li, L.; Yang, Q.B.; Cui, L.S. Introduction of Antibacterial Function into Biomedical TiNi Shape Memory Alloy by the Addition of Element Ag. *Acta Biomater.* 2011, 7, 2758–2767.
- 204 Ilić, V.; Šaponjić, Z.; Vodnik, V.; Potkonjak, B.; Jovančić, P.; Nedeljković, J.; Radetić, M. The Influence of Silver Content on Antimicrobial Activity and Color

of Cotton Fabrics Functionalized with Ag Nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 2009, 78, 564–569.

205 D.T. Allimuthu Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria *J. Med. Chem.*, 60 (2017), pp. 1-68

206 C. Liao, Y. Li, S.C. Tjong Visible-light active titanium dioxide nanomaterials with bactericidal properties *Nanomaterials*, 10 (2020), pp. 124-180

207 Chen X., Mao S. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications // *Chemical Reviews*. — 2007. — Т.107. №7. — с. 2891-2959.

208 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

209 V.S. Viteri, R. Bayón, A. Igartua, G. Barandika, J.E. Moreno, C.P.-J. Peremarch, M.M. Pérez, Structure, tribocorrosion and biocide characterization of Ca, P and I containing TiO₂ coatings developed by plasma electrolytic oxidation, *Appl. Surf. Sci.* 367 (2016) 1-10.

210 K. Anselme, M. Bigerelle, Role of materials surface topography on mammalian cell response, *Int. Mater. Rev.* 56 (2011) 243-266.

211 Rtimi, S.; Nadtochenko, V.; Khmel, I.; Bensimon, M.; Kiwi, J. First Unambiguous Evidence for Distinct Ionic and Surface-Contact Effects during Photocatalytic Bacterial Inactivation on Cu-Ag Films: Kinetics, Mechanism and Energetics. *Mater. Today Chem.* 2017, 6, 62–74.

212 Li, J.; Zhou, H.; Qian, S.; Liu, Z.; Feng, J.; Jin, P.; Liu, X. Plasmonic Gold Nanoparticles Modified Titania Nanotubes for Antibacterial Application. *Appl. Phys. Lett.* 2014, 104, 261110.

213 Prakash, J.; Kumar, P.; Harris, R. A.; Swart, C.; Neethling, J. H.; Van Vuuren, A. J.; Swart, H. C. Synthesis, characterization and multifunctional properties of plasmonic Ag-TiO₂nanocomposites. *Nanotechnology* 2016, 27, 355707.

214 Wang, G.; Feng, H.; Gao, A.; Hao, Q.; Jin, W.; Peng, X.; Li, W.; Wu, G.; Chu, P. K. Extracellular Electron Transfer from Aerobic Bacteria to Au Loaded TiO₂

Semiconductor without Light: a New Bacteria Killing Mechanism other than Localized Surface Plasmon Resonance or Microbial Fuel Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 24509–24516.

215 Urbański, N. K.; Beresewicz, A. Generation of •OH Initiated by Interaction of Fe²⁺ and Cu⁺ with Dioxygen; Comparison with the Fenton Chemistry. *Acta Biochim. Pol.* 2000, 47, 951–962.

216 Wu, H.; Yin, J.-J.; Wamer, W. G.; Zeng, M.; Lo, Y. M. Reactive Oxygen Species-Related Activities of Nano-Iron Metal and Nano-Iron Oxides. *J. Food Drug Anal.* 2014, 22, 86–94.

217 Wang, B.; Yin, J.-J.; Zhou, X.; Kurash, I.; Chai, Z.; Zhao, Y.; Feng, W. Physicochemical Origin for Free Radical Generation of Iron Oxide Nanoparticles in Biomicroenvironment: Catalytic Activities Mediated by Surface Chemical States. *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 383–392.

218 Rtimi, S.; Pulgarin, C.; Sanjines, R.; Kiwi, J. Novel FeOx– Polyethylene Transparent Films: Synthesis and Mechanism of Surface Regeneration. *RSC Adv.* 2015, 5, 80203–80211.

219 Rtimi, S.; Kiwi, J. Bactericide Effects of Transparent Polyethylene Photocatalytic Films Coated by Oxides Under Visible Light. *Appl. Catal., B* 2017, 213, 62–73.

220 Kim, J.; Gilbert, L.J. Cytotoxic Effect of Galvanically Coupled Magnesium–Titanium Particles. *Acta Biomater.* 2016, 30, 368–377

221 Zaatreh, S.; Haffner, D.; Strauss, M.; Wegner, K.; Warkentin, M.; Lurtz, C.; Zamponi, C.; Mittelmeier, W.; Kreikemeyer, B.; Willumeit-Römer, R.; Quandt, E.; Bader R. Fast Corroding, Thin Magnesium Coating Displays Antibacterial Effects and Low Cytotoxicity. *Biofouling* 2017, 33, 294–305.

222 Zaatreh, S.; Haffner, D.; Strauss, M.; Dauben, T.; Zamponi, C.; Mittelmeier, W.; Quandt, E.; Kreikemeyer, B.; Bader R. Thin Magnesium Layer Confirmed as an Antibacterial and Biocompatible Implant Coating in a co Culture Model. *Mol. Med. Rep.* 2017, 15, 1624–1630,

- 223 Cao, H.; Qiao, Y.; Liu, X.; Lu, T.; Cui, T.; Meng, F.; Chu P.K. Electron Storage Mediated Dark Antibacterial Action of Bound Silver Nanoparticles: Smaller is not Always Better. *Acta Biomater.* 2013, 9, 5100–5110
- 224 Cao, H.; Liu, X.; Meng, F.; Chu, P.K. Biological Actions of Silver Nanoparticles Embedded in Titanium Controlled by Micro-Galvanic Effects. *Biomaterials* 2011, 32, 693-705.
- 225 Jin, G.; Qin, H.; Cao, H.; Qiao, Y.; Zhao, Y.; Peng, X.; Zhang, X.; Liu, X.; Chu P. K. Zn/Ag Micro-Galvanic Couples Formed on Titanium and Osseointegration Effects in the Presence of *S. aureus*. *Biomaterials* 2015, 65, 22-31
- 226 Jin, G.; Qin, H.; Cao, H.; Qian, S.; Zhao, Y.; Peng, X.; Zhang, X.; Liu, X.; Chu P.K. Synergistic Effects of Dual Zn/Ag Ion Implantation in Osteogenic Activity and Antibacterial Ability of Titanium. *Biomaterials* 2014, 35, 7699-7713.
- 227 Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. A Review of the Biomaterials Technologies for Infection-Resistant Surfaces. *Biomaterials* 2013, 34, 8533–8554.
- 228 Rtimi, S.; Dionysiou, D. D.; Pillai, S. C.; Kiwi, J. Advances in Catalytic/Photocatalytic Bacterial Inactivation by Nano Ag and Cu Coated Surfaces and Medical Devices. *Appl. Catal., B* 2019, 240, 291– 318
- 229 Wardman, P. Fluorescent and Luminescent Probes for Measurement of Oxidative and Nitrosative Species in Cells and Tissues: Progress, Pitfalls, and Prospects. *Free Radicals Biol. Med.* 2007, 43, 995–1022.
- 230 LeBel, C. P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992, 5, 227–231.
- 231 Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K. J. A.; Dennery, P. A.; Forman, H. J.; Grisham, M. B.; Mann, G. E.; Moore, K.; Roberts, L. J.; Ischiropoulos, H. Measuring Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Fluorescent Probes: Challenges and Limitations. *Free Radical Biol. Med.* 2012, 52, 1–6.

- 232 Margareth R. C. Marques, Raimar Loebenberg, and May Almukainzi Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing *Dissolution Technologies* 18(3):15-28
- 233 Kashkarov, E.B.; Nikitenkov, N.N.; Sutygina, A.N.; Obrosof, A.; Manakhov, A.; Polčák, J.; Weiß, S. Hydrogen Absorption by Ti-Implanted Zr-1Nb Alloy, *Int. J. Hydrogen Energy* 2018, 43, 2484-2491.
- 234 Manakhov, A.; Michlíček, M.; Felten, A.; Pireaux, J.-J.; Nečas, D.; Zajíčková, L. XPS Depth Profiling of Derivatized Amine and Anhydride Plasma Polymers: Evidence of Limitations of the Derivatization Approach, *Appl. Surf. Sci.* 2017, 394, 578–585.
- 235 Takahagi, T.; Ishitani, A. XPS Study on the Surface Structure of Carbon Fibers using Chemical Modification and C1s Line Shape Analysis. *Carbon* 1988, 26, 389–395.
- 236 Ferrari, A. C.; Robertson, J. Interpretation of Raman Spectra of Disordered and Amorphous Carbon. *Phys. Rev. B* 2000, 61, 14095–14107.
- 237 Weng, S.; Qiao, L.; Wang, P. Thermal Stability of Pt-Ti Bilayer Films Annealing in Vacuum and Ambient Atmosphere. *Appl. Surf. Sci.* 2018, 444, 721–728.
- 238 Лякишева Н.П. Диаграммы состояния двойных металлических систем ред. Машиностроение, 1996–2000 г.
- 239 Weng, S.; Qiao, L.; Wang, P. Thermal Stability of Pt-Ti Bilayer Films Annealing in Vacuum and Ambient Atmosphere. *Appl. Surf. Sci.* 2018, 444, 721–728.
- 240 Ehrlich, A.; Weiß, U.; Hoyer, W.; Geßner, T. Microstructural changes of Pt/Ti bilayer during annealing in different atmospheres – an XRD study. *Thin Solid Films* 1997, 300, 122–130.
- 241 Tauster, S. J.; Fung, S. C.; Garten, R. L. Strong Metal-Support Interactions. Group 8 Noble Metals Supported on Titanium Dioxide. *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100, 170–175.

- 242 Pesty, F.; Steinrück, H.-P.; Madey, T. E. Thermal Stability of Pt Films on TiO₂(110): Evidence for Encapsulation. *Surf. Sci.* 1995, 339, 83–95.
- 243 Ono, L. K.; Yuan, B.; Heinrich, H.; Cuenya, B. R. Formation and Thermal Stability of Platinum Oxides on Size-Selected Platinum Nanoparticles: Support Effects. *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, 22119–22133.
- 244 Pan, J.-M.; Madey, T. E. The Encapsulation of Fe on TiO₂(110) Catal. *Lett.* 1993, 20, 269–274.
- 245 Zhou, S.; Talut, G.; Potzger, K.; Shalimov, A.; Grenzer, J.; Skorupa, W.; Helm, M.; Fassbender, J.; Čížmár, E.; Zvyagin, S. A.; Wosnitza, J. Crystallographically Oriented Fe Nanocrystals Formed in Fe-Implanted TiO₂. *J. Appl. Phys.* 2008, 103, 083907.
- 246 Kim, S.; Hwang, S.-J.; Choi, W. Visible Light Active Platinum-Ion-Doped TiO₂ Photocatalyst. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 24260–24267.
- 247 Hu, Y.; Song, X.; Jiang, S.; Wei, C. Enhanced Photocatalytic Activity of Pt-Doped TiO₂ for NO_x Oxidation both Under UV and Visible Light Irradiation: A Synergistic Effect of Lattice Pt⁴⁺ and Surface PtO. *Chem. Eng. J.* 2015, 274, 102–112.
- 248 Mukri, B. D.; Waghmare, U. V.; Hegde, M. S. Platinum Ion-Doped TiO₂: High Catalytic Activity of Pt²⁺ with Oxide Ion Vacancy in Ti^{4+1-x}Pt^{2+x}O_{2-x} Compared to Pt⁴⁺ without Oxide Ion Vacancy in Ti^{4+1-x}Pt^{4+x}O₂. *Chem. Mater.* 2013, 25, 3822–3833.
- 249 Li, Q.; Wang, K.; Zhang, S.; Zhang, M.; Yang, J.; Jin, Z. Effect of Photocatalytic Activity of CO Oxidation on Pt/TiO₂ by Strong Interaction Between Pt and TiO₂ Under Oxidizing Atmosphere. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 2006, 258, 83–88.
- 250 Paál, Z.; Wootsch, A. Catalytic Properties of the Platinum-Hydrogen-Carbon System. In *Catalysis in Application*; Jackson, S. D., Hargreaves, J. S. J., Lennon, D., Eds.; Royal Society of Chemistry, 2003, Vol. 289; pp 8–15
- 251 Kulkarni, D. D.; Rykaczewski, K.; Singamaneni, S.; Kim, S.; Fedorov, A. G.; Tsukruk, V. V. Thermally Induced Transformations of Amorphous Carbon

Nanostructures Fabricated by Electron Beam Induced Deposition. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2011, 3, 710–720.

252 Nosé, Y.; Kushida, A.; Ikeda, T.; Nakajima, H.; Tanaka, K.; Numakura, H. Re-examination of Phase Diagram of Fe-Pt System. *Mater. Trans.* 2003, 44, 2723–2731.

253 Li, Y.; Zhang, W.; Niu, J.; Chen, Y. Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* 2012, 6, 5164–5173

254 A.V. Naumkin, A. Kraut-Vass, S.W. Gaarenstroom, C.J. Powell, NIST X-ray photoelectron spectroscopy database, NIST Standard Reference Database 20 (2012).

255 M.C. Biesinger, L.W.M. Lau, A.R. Gerson, R.S.C. Smart, Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2010) 887–898.

256 T.T. Eighmy, A.E. Kinner, E.L. Shaw, J.J.D. Eusden, C.A. Francis, Whitlockite (β -Ca₃(PO₄)₂) characterization by XPS: an environmentally important mineral, *Surf. Sci. Spectra* 6 (1999) 219–227.

257 B. Demri, D. Muster, XPS study of some calcium compounds, *J. Mater. Process. Technol.* 55 (1995) 311–314.

258 R. Cuscó, F. Guitián, S. de Aza, L. Artús, Differentiation between hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate by means of μ -Raman spectroscopy, *J. Eur. Ceram. Soc.* 18 (1998) 1301–1305.

259 A. El-Ghannam, P. Ducheyne, I. Shapiro, Bioactive glass templates for the synthesis of bone-like tissue in vitro, in: A.G. Mikos, R.M. Murphy, H. Bernstein, N.A. Peppas (Eds.), *Biomaterials for Cell and Drug Delivery*, Materials Research Society, Pittsburgh, 1994, pp. 257–262.

260 A.M. Ferraria, A.P. Carapeto, A.M. Botelho do Rego, X-ray photoelectron spectroscopy: silver salts revisited, *Vacuum* 86 (2012) 1988–1991.

261 K. Webb, V. Hlady, P.A. Tresco, Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization, *J. Biomed. Mater. Res.* 41 (1998) 422–430.

- 262 Xiaoyan Ma, Changrong Li, Weijing Zhang, Study on the phase diagram of the Ti–B–N system and the interfacial reaction of the Ti/BN joints / *Materials Science and Engineering*: A15 February 2005, Volume 392, Issues 1–2Pages 394–402
- 263 W.F. Zhang, Y.L. He, M.S. Zhang, Z. Yin, Q. Chen, Raman scattering study on anatase TiO₂ nanocrystals, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 33 (2000) 912–916.
- 264 I. Dreiling, D. Stiens, T. Chassé, Raman spectroscopy investigations of TiB_xCyN_z coatings deposited by low pressure chemical vapor deposition, *Surf. Coat. Tech.* 205 (2010) 1339–1344.
- 265 L.C. Gu, T. Wang, W. Zhang, G. Liang, A. Gu, L. Yuan, Low-cost and facile fabrication of titanium dioxide coated oxidized titanium diboride–epoxy resin composites with high dielectric constant and extremely low dielectric loss, *RSC Adv.* 3 (2013) 7071–7082.
- 266 S. Sahoo, S.K. Singh, Synthesis of TiB₂ by extended arc thermal plasma, *Ceram. Int.* 43 (2017) 15561–15566.
- 267 M. Toderaş, S. Filip, I. Ardelean, Structural study of the Fe₂O₃-B₂O₃-BaO glass system by FTIR spectroscopy, *J. Optoelectr. Adv. Mater.* 8 (2006) 1121–1123.
- 268 E.B. Kashkarov, N.N. Nikitenkov, A.N. Sutygina, A. Obrosov, A. Manakhov, J. Polčák, S. Weiß, Hydrogen absorption by Ti-implanted Zr-1Nb alloy, *Int. J. Hydrogen Energy* 43 (2018) 2484–2491.
- 269 K.L. Firestein, D.V. Leybo, A.E. Steinman, A.M. Kovalskii, A.T. Matveev, A.M. Manakhov, I.V. Sukhorukova, P.V. Slukin, N.K. Fursova, S.G. Ignatov, D. Golberg, D.V. Shtansky, BN/Ag hybrid nanomaterials with petal-like surfaces as catalysts and antibacterial agents, *Beilstein J. Nanotechnol.* 9 (2018) 250–261.
- 270 C. Guimon, D. Gonbeau, G. Pfister-Guillouzo, O. Dugne, A. Guette, R. Naslain, M. Lahaye, XPS study of BN thin films deposited by CVD on SiC plane substrates, *Surf. Interf. Anal.* 16 (1990) 440–445.
- 271 A. Manakhov, M. Michlíček, A. Felten, J.-J. Pireaux, D. Necas, L. Zajícková, XPS depth profiling of derivatized amine and anhydride plasma polymers: Evidence of limitations of the derivatization approach, *Appl. Surf. Sci.* 394 (2017) 578–585.

- 272 D. Garrett, Borates, Academic Press, New York, NY, 1998, p. 483.
- 273 S.S. Hakki, B.S. Bozkurt, E.E. Hakki, Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24 (2010) 243–250.
- 274 C. Wu, R. Miron, A. Sculean, S. Kaskel, T. Doert, R. Schulze, Y. Zhang, Proliferation, differentiation, and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from.
- 275 C. Larimer, E. Winder, R. Jeters, M. Prowant, I. Nettleship, R.S. Addleman, G. T. Bonheyo, A method for rapid quantitative assessment of biofilms with biomolecular staining and image analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2009) 999–1008.
- 276 Ivanova, E.P.; Hasan, J.; Webb , H.K.; Gervinskas, G.; Juodkazis, S.; Truong, V.K.; Wu, A.H.F.; Lamb, R.N.; Baulin, V.A.; Watson, G.S.; Watson, J.A.; Mainwaring, D.E.; Crawford, R.J. Bactericidal Activity of Black Silicon. *Nat. Commun.* 2013, 4, 2838.
- 277 Coughenour, C.; Stevens, V.; Stetzenbach, L.D. An Evaluation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Survival on Five Environmental Surfaces. *Microb. Drug Resist.* 2011, 17, 457-461.
- 278 Zobell, C. E. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J. Bacteriol.* 1943, 46, 39–56.
- 279 Vaidya, M. Y.; McBain, A. J.; Butler, J. A.; Banks, C. E.; Whitehead, K. A. Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ion Against *Enterococcus Faecium*, *Klebsiella Pneumoniae* and *Acinetobacter Baumannii* in Planktonic and Biofilm Phenotypes. *Sci. Rep.* 2017, 7, 5911.
- 280 R.L. Kepner, J.R. Pratt, Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples – past and present, *Microbiol. Rev.* 58 (1994) 503–615.
- 281 S. Demirer, M.I. Kara, K. Erciyas, H. Ozdemir, H. Ozer, S. Ay, Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats, *Arch. Oral Biol.* 57 (2012) 60–65.

- 282 Jiao, Q.; Li, L.; Mu, Q.; Zhang, Q. Immunomodulation of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, 426028.
- 283 W. Kang, Z.-H. Wang, L. Liu, X. Guo, Alkaline phosphatase activity in the phosphorus limited southern Chinese coastal waters, *J. Environ. Sci.* 86 (2019) 38–49.
- 284 S. An, J. Ling, Y. Gao, Y. Xiao, Effects of varied ionic calcium and phosphate on the proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal ligament cells in vitro, *J. Periodont. Res.* 47 (2012) 374–382.
- 285 B. Thomson, J. Wenley, K. Currie, C. Hepburn, G.J. Herndl, F. Baltar, Resolving the paradox: continuous cell-free alkaline phosphatase activity despite high phosphate concentrations, *Marine Chem.* 214 (2019) 103671.
- 286 C.S. Adams, K. Mansfield, R.L. Perlot, I.M. Shapiro, Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions, *J. Biol. Chem.* 8 (2001) 20316–20322.
- 287 X. Niu, Z. Liu, F. Tian, S. Chen, L. Lei, T. Jiang, Q. Feng, Y. Fan, Sustained delivery of calcium and orthophosphate ions from amorphous calcium phosphate and poly (L-lactic acid)-based electrospinning nanofibrous scaffold, *Sci. Reports* 7 (2017) 45655.
- 288 X. Niu, Shear-mediated crystallization from amorphous calcium phosphate to bone apatite, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 54 (2016) 131–140.
- 289 X. Niu, Hydrolytic conversion of amorphous calcium phosphate into apatite accompanied by sustained calcium and orthophosphate ions release, *Mater. Sci. Eng.* 70 (2017) 1120–1124.
- 290 C. Wu, R. Miron, A. Sculean, S. Kaskel, T. Doert, R. Schulze, Y. Zhang, Proliferation, differentiation, and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds, *Biomaterials* 32 (2011) 7068–7078.
- 291 Q. Huang, X. Yang, R. Zhang, X. Liu, Z. Shen, Q. Feng, Enhanced hydrophilicity, and in vitro bioactivity of porous TiO₂ film through the incorporation of boron, *Ceram. Int.* 41 (2015) 4452–4459.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А. АКТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПОКРЫТИЙ



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)**

Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболensk, г. Серпухов,
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

№ _____

На № _____ от _____

АКТ ИСПЫТАНИЙ ИМПЛАНТАТОВ С ПОКРЫТИЕМ $VO_x(TiO_x)/TiCaPCON-B$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1. Группа 5 оказала бактерицидное действие на планктонные клетки и биопленки штаммов *E. coli* K-261 и *S. aureus* ATCC25923 через 24 ч совместного инкубирования в физиологическом растворе.
2. Группа 6 оказала бактерицидное действие на планктонные клетки и биопленки штамма *S. aureus* ATCC25923 через 24 ч совместного инкубирования в физиологическом растворе, но не оказывала действие на штамм *E. coli* K-261.
3. Группы 1, 2, 3, 4, 7 не оказывали бактерицидного действия на планктонные клетки и биопленки штаммов *E. coli* K-261 и *S. aureus* ATCC25923.

Директор
ФБУН ГНЦ ПМБ

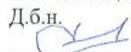


И.А. Дятлов

« _____ » 2021 г.

Зав. лаб. Нанобиотехнологии
ФБУН ГНЦ ПМБ

Д.б.н.

 С.Г. Игнатов



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)**

Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов,
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 105501113772 ИНН 5077018190 КПП 507701001

№ _____

На № _____

от _____

АКТ ИСПЫТАНИЙ ИМПЛАНТАТОВ С ПОКРЫТИЕМ TiCaPCON-(Pt,Ag,Zn)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что образцы групп 2, 4, 5, 6 оказали полное бактерицидное действие на планктонные клетки штамма *E. coli* K-261 и *S. aureus* ATCC 25923 через 24 и 8 ч совместного инкубирования в физиологическом растворе, соответственно. Образцы группы 3 показали бактерицидный эффект против образования биопленки штаммов *E. coli* K-261 и *S. aureus* ATCC 25923.

Директор
ФБУН ГНЦ ПМБ

И.А. Дятлов
« _____ » _____ 2021 г.

Зав. лаб. Нанобиотехнологии
ФБУН ГНЦ ПМБ

Д.б.н.

С.Г. Игнатов

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМЕНИ
Н.Н. БЛОХИНА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ 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

«___»_____2021 г.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что образцы групп 2-4 обладают высоким уровнем биосовместимости и биоактивности. Образцы всех групп 1-7 не проявляли цитотоксического эффекта в отношении клеток остеобластов MC3T3-E1.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по научной работе
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, директор НИИ канцерогенеза,
профессор



М.А. Красильников

«___»_____2021 г.

Зав. лаб. механизмов канцерогенеза
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, д.б.н.

Н.А. Глушанкова

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМЕНИ
Н.Н. БЛОХИНА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ 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

«__»_____2021 г.

Установлено, что для образцов групп 2-3 средние площади, форма клеток и активный цитоскелет клеток не отличаются от контроля. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии токсического эффекта и высокой биосовместимости поверхности образцов групп 2. На образцах групп 4-7 клетки хорошо распластаны, форма клеток и активный цитоскелет изменены по сравнению с контролем, на 7 день наблюдается снижение клеточной пролиферации. Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительном уровне биосовместимости поверхности образцов групп 4-7. Образцы групп 3, 4, 7 способны поддерживать высокий уровень активности ЦФ, что свидетельствует о биоактивности их поверхности.

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель директора по научной работе
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, директор НИИ канцерогенеза,
профессор

«__»_____2021 г.



М.А. Красильников

Зав. лаб. механизмов канцерогенеза
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, д.б.н.

Н.А. Глушанкова

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»
Общество с ограниченной ответственностью
«НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ «МЕТАЛЛ»

УТВЕРЖДАЮ
Проректор НИТУ «МИСиС»
по науке и инновациям

М.Р.Филонов
2021 г.



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель генерального директора
ООО «НИО «МЕТАЛЛ»

А.Е. Кудряшов
2021 г.



ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

на процесс нанесения многофункциональных наноструктурных
двухслойных покрытий в системе Ti-Ca-P-C-O-N-V/B-O.

ТИ 52-11301236-2021

Исп. № подл.	Подп. и дата	Взам. инв. №	Инв. № дубл.	Подп. и дата

ПРИЛОЖЕНИЕ В. ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2697720

**Многокомпонентный двухслойный биоактивный материал
с контролируемым антибактериальным эффектом**

Патентообладатель: *Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
"Национальный исследовательский технологический
университет "МИСиС" (RU)*

Авторы: *Пономарев Виктор Андреевич (RU), Штанский
Дмитрий Владимирович (RU), Сухорукова Ирина Викторовна
(RU), Швейко Александр Николаевич (RU)*

Заявка № 2019101926

Приоритет изобретения 24 января 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 19 августа 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 24 января 2039 г.



*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев