

Формирование и свойства биоактивных покрытий на титане

С. В. Гнеденков, Ю. П. Шаркеев, С. Л. Синебрюхов, О. А. Хрисанфова,
Е. В. Легостаева, А. Г. Завидная, А. В. Пузь, И. А. Хлусов

Рассмотрены условия формирования на титане биоактивных кальцийфосфатных поверхностных слоев, содержащих гидроксиапатит, методом плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) в электролитах различного химического состава. Изучены их состав, морфология, антикоррозионные и механические характеристики. По результатам исследования предложены оптимальные режимы получения. Поверхностные слои, формируемые на титановых имплантатах, были изучены в условиях *in vitro* и *in vivo*. Показано, что биологическая активность покрытий определяется суперпозицией специфических параметров: химическим составом, в частности, значениями концентраций кальция и фосфора, их отношением и морфологией (шероховатостью) поверхности.

Ключевые слова: титан, гидроксиапатит, имплантат, плазменное электролитическое оксидирование, антикоррозионные свойства, упруго-пластические свойства, остеогенез.

The formation conditions on the titanium of the bioactive calciumphosphate surface layers helpful for implant surgery and containing hydroxyapatite obtained by plasma electrolytic oxidation in the different electrolytes solutions were considered. As a result of this investigation the polarization modes and electrolyte compositions were chosen as optimal. The morphology, anticorrosion, mechanical properties and composition of these coatings were investigated as well. Bioactive surface layers formed on the titanium implants were tested *in vitro* and *in vivo* conditions. It was shown the bioactivity of layers depends on the chemical composition, specifically the calcium and phosphorous concentration, their ratio and morphology (roughness) of the surface.

Key words: titanium, hydroxyapatite, implant, plasma electrolytic oxidation, anticorrosion properties, elastoplastic properties.

Введение

Современная медицина широко использует искусственные материалы для замены поврежденных тканей и органов. В зависимости от их назначения, вводимые в организм имплантаты должны замещаться живой тканью и/или функционировать в течение длительного периода времени. Большую часть имплантатов, используемых в настоящее время в медицине, изготавливают из титана и титановых сплавов. Титановые сплавы как материалы с приемлемыми (но небезупречными) для этих целей коррозионными и механическими свойствами широко применяют в имплантационной хирургии.

В целом, материалы, претендующие на роль имплантатов, должны удовлетворять ряду требо-

ваний, а именно: не подвергаться коррозии; иметь характеристики, близкие к механическим характеристикам костной ткани; не вызывать реакций иммунной системы; интегрироваться с костной тканью и стимулировать процесс остеогенеза.

Биоактивная керамика на основе гидроксиапатита и фосфатов кальция является перспективной вследствие ее биосовместимости и близости по составу к костной ткани [1]. Физические и химические свойства гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ обеспечивают идеальную биосовместимость, активно стимулируя остеогенез и восстановление костной ткани. Изделия из гидроксиапатита в настоящее время уже применяют в травматологии, стоматологии, ортопедии и косметологии как биосовместимый, биоактивный материал, используемый для регенерации

костной ткани и идентичный по химическому составу её минеральной компоненте.

В силу сходства химического состава материалы на основе фосфатов кальция также находят широкое применение в медицине при операциях по восстановлению целостности поврежденной кости. Иногда для повышения биосовместимости с костной тканью применяют гидроксиапатит нестехиометрического состава $(Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x})$, где $0 < x < 1$, разбавляя более растворимыми фосфатами кальция, например, трехзамещенным ортофосфатом [2]. Вместе с тем, установлено, что не только химический состав, но и морфология поверхности имплантата является важной характеристикой, определяющей отклик организма на чужеродный материал [3]. С целью повышения адгезионной прочности покрытий к титановой основе в ряде случаев перед их нанесением необходимо проводить обработку поверхности для создания определенной шероховатости. Это может быть пескоструйная обработка или химическое травление, что позволяет сформировать многоуровневую (многомодальную) поверхность с высокопористой структурой, которая обеспечивает повышение адгезионной прочности кальцийфосфатного покрытия к титановой основе [4].

К настоящему времени разработаны некоторые растворные методы синтеза гидроксиапатита, позволяющие получать высокодисперсные порошки, форма частиц которых в зависимости от условий формирования варьируется в широких пределах [5]. Кроме того, создано несколько видов биокерамики для нанесения на поверхность имплантатов: корундовая инертная (Al_2O_3), поверхностно-активная (биостекла) и резорбируемая (трикальцийфосфат и гидроксиапатит) [6]. Для формирования кальцийфосфатных покрытий на титане, обладающих биосовместимостью, применяют такие методы, как плазменное напыление, электрохимическое оксидирование, золь-гель технологии. Наличие на поверхности металлического имплантата таких покрытий позволяет улучшить его биосовместимость с костной тканью и уменьшить побочные негативные явления, имеющие место при использовании имплантата без покрытия.

Наиболее технологичным и популярным современным методом модификации поверхности металлов и сплавов является метод ПЭО [7]. Иногда в научной литературе можно встретить и другое широко используемое название этого метода — микродуговое оксидирование. В настоящее время в Институте химии ДВО РАН продемонстрирована возможность формирования на поверхности титана ВТ1-0 поверхностных слоев, имеющих приемлемые

адгезионные характеристики и содержащих гидроксиапатит [8]. В процессе ПЭО происходит формирование на поверхности титана кальций-фосфатных покрытий, в том числе содержащих гидроксиапатит. Полученные данные о фазовом, элементном составе, морфологии, антикоррозионных, механических и упругопластических характеристиках исследуемых слоев позволяют предполагать возможность их практического применения в медицине. Формируемые покрытия благодаря своему составу, близкому к минеральному составу костной ткани и наличию системы пор, имеют перспективу найти применение в имплантационной хирургии.

Однако до сих пор нет четкого представления о том, какими физико-химическими свойствами (шероховатостью, пористостью, элементным и фазовым составом т.д.) должны обладать разрабатываемые покрытия.

Цель настоящей работы — изучение кальцийфосфатных слоев, содержащих гидроксиапатит, на титане ВТ1-0, исследование их фазового состава, морфологии, антикоррозионных и механических характеристик, а также количественных показателей остеогенеза *in vivo*.

Методика эксперимента

В качестве тестируемых образцов применяли квадратные пластинки с закругленными краями размером $10 \times 10 \times 1$ мм³ из титана ВТ1-0 с биоактивными кальций-фосфатными покрытиями, сформированными по методике, указанной в работе [9], методом плазменного электролитического оксидирования. Перед оксидированием образцы из титана подвергали механической обработке с целью освобождения поверхности металла от заусенец, наростов, различных дефектов, что необходимо для стандартизации поверхности образцов.

В качестве кальцийсодержащих компонентов электролита применяли водные растворы следующих соединений в различном концентрационном сочетании: $Ca_3(C_6H_5O_7) \cdot 4H_2O$ — цитрат кальция и $Ca(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ — ацетат кальция. В качестве фосфорсодержащего компонента в электролит добавляли двузамещенный фосфат натрия $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$.

Плазменное электролитическое оксидирование проводили в монополярном (анодном) и биполярном (анодно-катодном) режимах, которые реализовали с помощью автоматизированной системы управления и контроля (АСУиК), состоящей из источника тока, контрольно-измерительного блока, персонального компьютера и программного обеспечения. В качестве источника тока использовали стандартный ревер-

сивный тиристорный агрегат типа ТЕР4-100.460Н-2-2УХЛ4. АСУиК обеспечивает задание и контроль (с функцией отслеживания различного рода сбоя в работе системы) в режиме реального времени параметров технологического процесса.

Для формирования поверхностного слоя образец, изготовленный из титана ВТ1-0, погружали в водный раствор электролита и проводили плазменно-электролитическую обработку с использованием монополярного или биполярного режимов ПЭО. Обработку образца в монополярном гальваностатическом режиме проводили при эффективном значении плотности тока $0,67 \text{ А/см}^2$ и конечном напряжении формирования $350 - 380 \text{ В}$ в течение 10 мин . В биполярном режиме ПЭО при получении образцов анодная составляющая поляризующего напряжения изменялась в потенциодинамическом режиме от 0 до 280 В при скорости увеличения напряжения $0,25 \text{ В/с}$. Катодная составляющая подавалась в гальваностатическом режиме с эффективным значением плотности тока — $1,0 \text{ А/см}^2$. Продолжительность обработки в биполярном режиме составляла 5 мин . Температуру электролита во всех экспериментах поддерживали в пределах $25 - 27^\circ\text{С}$.

Электрохимические свойства формируемых на титане слоев исследовали методами поляризационных характеристик и электрохимической импедансной спектроскопии на электрохимической системе 12558 WB (Solartron Analytical, Англия). Измерения проводили в $0,5 \text{ М}$ растворе хлорида натрия NaCl при комнатной температуре. В качестве противоиэлектрода использовали покрытую платиной ниобиевую сетку. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, заполненный насыщенным раствором KCl (потенциал относительно нормального водородного электрода равен $+0,201 \text{ В}$). Все потенциалы, приведенные в данной работе, представлены относительно этого электрода. Площадь рабочего электрода составляла $0,72 \text{ см}^2$. Управление экспериментом осуществляли с применением программного обеспечения CogWare/ZPlot (Scribner Associates Inc., США). Импедансный спектр записывали при значении стационарного потенциала исследуемого электрода. В качестве возмущающего сигнала при этом использовали сигнал синусоидальной формы с амплитудой 10 мВ .

Изучение механических и упруго-пластических свойств оксидных слоев (микротвердость, модуль упругости) проводили с использованием динамического ультрамикротвердомера DUN-W201 (Shimadzu, Япония) путем вдавливания алмазного индентора (пирамиды Берковича с углом при вершине 100°) в исследуемое покрытие. Толщину покрытий измеряли на поперечном шлифе образца

с помощью оптической системы динамического ультрамикротвердомера.

Рентгенофазовый анализ покрытий был выполнен на автоматическом рентгеновском дифрактометре D8 ADVANCE (BRUKER, Германия) с использованием CuK_α -излучения.

Топологию поверхности в плоскости полученных покрытий изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) S5500 (HITACHI, Япония). На этом же приборе определяли содержание элементов на поверхности покрытия методом энергодисперсионной спектроскопии (ЭДС).

При изучении имплантатов *in vivo* использовали 15 мышей-самцов линии BALB/c из коллекционного фонда НИИ фармакологии Томского Научного Центра СО РАМН (г. Томск). Животным под эфирным наркозом подкожно вводили по 2 имплантата с нанесенным в асептических условиях столбиком сингенного костного мозга (средняя площадь мозга $7,5 \text{ мм}^2$), взятого из бедренной кости мышей. Костный мозг служил источником мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и ростовых факторов. Для адгезии клеток органную культуру костного мозга на дисках предварительно культивировали в течение 45 мин в культуральной среде, содержащей 95% среды RPMI – 1640 (ICN) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ICN). При раздельном подкожном введении мышам подложки и фрагментов костного мозга образования тканевых пластинок не наблюдали. Имплантаты, введенные мышам, извлекали через 45 суток , фотографировали в отраженном свете с фиксированными параметрами. Для проведения гистологического анализа применяли стандартные методы световой микроскопии тонких срезов. После декальцинации тканевых пластинок, выросших на имплантатах, осуществляли обычную окраску гематоксилином-эозином серийных тонких (10 мкм) парафиновых срезов, выполненных перпендикулярно поверхности дисков.

Шероховатость поверхности оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью измерительной системы Talysurf 5-120 (разрешающая способность 1 нм). Параметр шероховатости поверхности R_a определяли согласно ГОСТ 2789-73 как среднеарифметическое отклонение профиля в пределах нескольких участков измерений.

Методику компьютерной морфометрии применяли для выявления количественных параметров срезов посредством измерения их оптических характеристик. Площадь объектов вычисляли при помощи программы ImageJ 1.34р, согласно статистике серых уровней в модификации.

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программ Statistica (версия 6.0) и Excel 2007. Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова-Смирнова). Так как в выборках распределение показателей отличалось от нормального, с целью выявления статистической значимости различий выборок применяли критерий Манна-Уитни (*U*-тест). Для определения связи между исследуемыми показателями проводили регрессионный анализ, а также определение коэффициентов ранговой корреляции Спирмена (*r*). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В результате проработки различных кальций-содержащих электролитических систем, а также режимов оксидирования, было установлено, что методом ПЭО на поверхности титана ВТ1-0 можно формировать различные кальций-фосфатные покрытия, в том числе содержащие гидроксиапатит (рис. 1).

Различные кальцийсодержащие соли были выбраны в качестве компонентов электролита с целью формирования ПЭО-покрытий на титане с отношением Са/Р, близким к отношению в костной ткани человека (1,67). В таблице приведены составы электролитов, условия формирования, фазовый и элементный составы и отношение Са/Р для покрытий, полученных на титане в электролитах, содержащих цитрат и ацетат кальция с добавлением двузамещенного фосфата натрия. Как следует из анализа

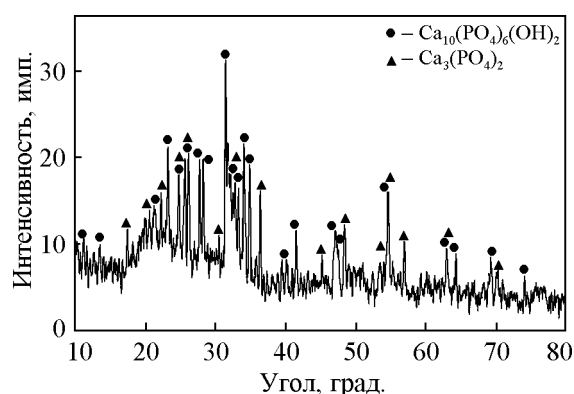


Рис. 1. Дифрактограмма образца покрытия на титане, полученного в ацетат-фосфатном электролите.

результатов эксперимента (таблица), покрытия, полученные в ацетатсодержащем электролите, включают в свой состав гидроксиапатит. Покрытия, сформированные в цитратсодержащем электролите, хотя и содержат в составе кристаллической фазы только диоксид титана, но, судя по величине отношения Са/Р, в их состав входят кальций-фосфатные соединения, присутствующие в виде рентгеноаморфной фазы.

Важным фактором, определяющим синтез гидроксиапатита в поверхностном слое, является характер поляризации при ПЭО. Только в биполярном режиме ПЭО в ацетатсодержащем электролите был получен гидроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, а в цитратсодержащем электролите были достигнуты большие концентрации Са и Р в составе покрытия (таблица) при невысоких концентрациях электролита. Вероятно, при биполярном режиме обработки титана переполяризация электрода приводит к последователь-

Таблица

Некоторые параметры исследуемых в условиях *in vivo* поверхностных кальций-фосфатных слоев

№ образца	Состав электролита, г/л; режим поляризации	Количество срезов	R_a , мкм	Фазовый состав покрытий	S кости, мм ²	S костного мозга, мм ²	Содержание химических элементов, ат. %			Отношение Са/Р
							Ti	Ca	P	
1	$\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30; монополярный	17	2,15	TiO_2 + рентгено-аморфная фаза	0,4483	0,4318	11,32	3,18	3,69	0,86
2	$\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20; монополярный	17	2,86	TiO_2 + рентгено-аморфная фаза	0,4749	0,8140	11,49	3,11	3,28	0,95
3	$\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 40; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 40; монополярный	11	9,13	TiO_2 + рентгено-аморфная фаза	0,3346	0,2950	6,29	9,28	5,24	1,77
4	$\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20; биполярный	9	1,97	TiO_2 + рентгено-аморфная фаза	0,7635	0,3670	19,07	11,73	7,21	1,63
5	$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50; Na_2HPO_4 , 25; биполярный	17	1,79	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0,7453	0,5450	2,57	17,22	8,85	1,94

ному насыщению приэлектродного пространства ионами кальция и фосфата (при катодной поляризации приповерхностные слои электролита насыщаются ионами Ca^{2+} , при анодной поляризации — ионами $(\text{HPO}_4)^{2-}$, которые, взаимодействуя, образуют молекулы кальций-фосфатных соединений: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Кроме того, в биполярном режиме плазменно-электролитической обработки в состав плазмы вовлекается большее количество элементов электролита, что обеспечивает на поверхности имплантата более интенсивный электрохимический синтез кальций-фосфатных соединений из соответствующих элементов, чем в монополярном режиме. Биполярный режим плазменного электролитического формирования покрытий имеет некоторые преимущества перед монополярным режимом. В интервале катодной поляризации происходит переформирование двойного электрического слоя (Гельмгольца или Гуи-Чепмена), который снижает ионный транспорт и вероятность проникновения окисляющих реагентов к обрабатываемому электроду. Кроме того, наряду с разупорядочиванием двойного электрического слоя электролита в катодный период происходит также переформирование слоя, увеличивающего сопротивление переносу заряда (область пространственного заряда) в материале самого покрытия. В силу этих причин при последующем положительном смещении на аноде реализуются более мощные плазменные разряды. В состав плазмы при этом попадает большее количество элементов электролита. Выделяемая при термической деструкции цитрат-содержащих и ацетат-содержащих анионных комплексов теплота обеспечивает большую длительность теплового воздействия на формируемый материал оксидного слоя (по сравнению с длительностью, обеспечиваемой разрушением легких анионов), что способствует, в свою очередь, переходу метастабильного состояния соединений, входящих в материал покрытия, в стабильные. Это влияет на морфологию поверхностных слоев, изменяет антикоррозионные характеристики покрытий. Исследование элементного состава покрытий показало, что во всех образцах присутствуют кальций и фосфор (таблица), в то время как рентгенофазовый анализ не подтвердил наличия кальцийфосфатных соединений в некоторых покрытиях. Это означает, что такие соединения присутствуют либо в концентрации менее 10 % (предел обнаружения рентгенофазового анализа), либо находятся в составе аморфной фазы.

Данные ЭДС позволяют вычислить отношение кальция к фосфору, которое показывает степень соответствия состава покрытия, полученного

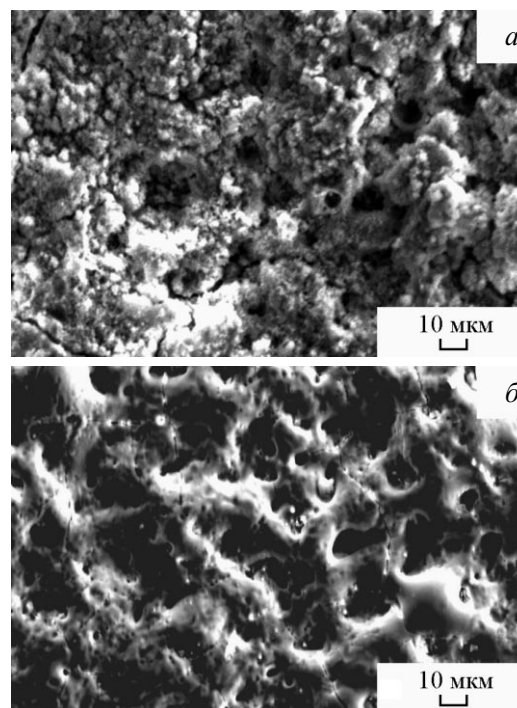


Рис. 2. СЭМ-изображения поверхности образцов с ПЭО-покрытиями сформированными: *a* — в цитрат-фосфатном электролите, *б* — в ацетат-фосфатном электролите.

методом ПЭО, составу минеральной составляющей костной ткани.

При исследовании методом электронной сканирующей микроскопии морфологии покрытий, полученных в цитрат-фосфатном и ацетат-фосфатном электролитах, было установлено, что поверхность развитая, имеет поры, наличие которых благоприятно для врастания в них костной ткани и формирования более прочного соединения имплантата с костью (рис. 2*a, б*). Одно из преимуществ пористых покрытий — перспектива их использования для создания композиционных гетероструктур. Поры и неровности в поверхности покрытий могут быть заполнены различными лекарственными веществами, например, антибиотиками, чтобы дополнительно снизить вероятность возникновения воспалительных процессов при использовании имплантатов. Поверхность полученного покрытия может быть обработана порошком ультрадисперсного политетрафторэтилена, который наносится на поверхность трибоэлектрическим способом и после отжига в муфельной печи в течение 1 часа при температуре 100°C , частично запечатывает поры, благодаря чему полимер препятствует одномоментному вымыванию лекарства, увеличивая продолжительность терапевтического действия [10].

Развитая пористая поверхность полученного покрытия и его состав, близкий к минеральному составу костной ткани, предполагают быстрое вживление имплантата за счет того, что костная ткань прорастает в поры его поверхности (рис. 2).

Проведены исследования коррозионных и механических свойств кальций-фосфатных покрытий, которые были получены методом ПЭО. Для оценки электрохимических свойств сформированные в указанных условиях на титане VT1-0 покрытия исследовали методом электрохимической импедансной спектроскопии. Импедансные спектры исследуемых гетерооксидных структур на поверхности титана представлены на рис. 3.

Как следует из рис. 3, спектр образца с естественной оксидной пленкой (кривая 1) имеет четко выраженный максимум на кривой зависимости фазового угла от частоты, что характеризует оксидную пленку как однородный беспористый слой. Наличие на поверхности металла слоев, сформированных при оксидировании, приводит к изменению вида кривых и возникновению дополнительного перегиба, что свидетельствует о появлении дополнительной (высокочастотной) временной константы, связанной с морфологическими изменениями (шероховатостью, пористостью) поверхностного слоя. Это подтверждается экспериментальными данными, полученными методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 2а, б). Из анализа рис. 3 также следует, что сопротивление пленки на образцах с полученными покрытиями соизмеримо с сопротивлением образца без покрытия, содержащего только естественный оксид титана. Это объясняется значительной сквозной пористостью формируемых оксидных слоев и высокой степенью развитости их поверхности (реальная площадь контакта ПЭО-слоев с электролитом во время измерений намного больше по сравнению с видимой).

На рис. 4 приведены поляризационные кривые, полученные в физиологическом растворе для покрытий, сформированных в цитрат-содержащем электролите.

Из анализа рис. 4 следует, что покрытия на титане в данном случае несколько облагораживают стационарный потенциал, в то же время ток коррозии мало меняется и остается в пределах 20–60 нА/см² как для образца с естественной оксидной пленкой, так и для образцов с ПЭО-покрытием.

Одним из самых важных условий для заместителей кости в особенности для тех, которые используются в качестве нагруженных деталей, является близость их механических характеристик свойствам естественной костной ткани. Изделия из нанотитана

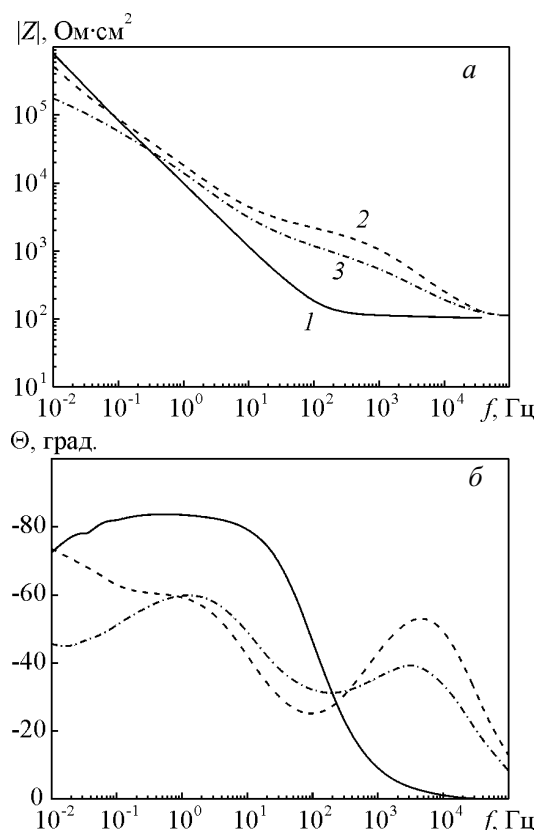


Рис. 3. Диаграмма Бодэ (зависимость модуля импеданса — а и фазового угла — б от частоты) для покрытий, полученных при различных условиях на титане VT1-0: 1 — естественный оксид; 2 — монополярный потенциостатический режим (цитрат-фосфатный электролит); 3 — биполярный режим (цитрат-фосфатный электролит).

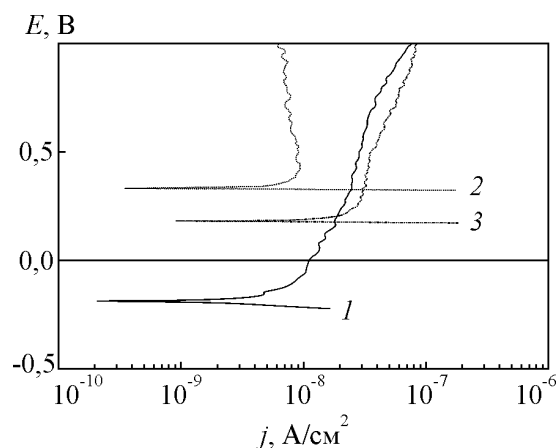


Рис. 4. Поляризационные кривые для поверхностных слоев, полученных при различных условиях: 1 — естественный оксид, полученный в результате окисления титана на воздухе; 2 — ПЭО-покрытие, сформированное в монополярном потенциостатическом режиме (цитрат-фосфатный электролит); 3 — ПЭО-покрытие, сформированное в биполярном режиме (цитрат-фосфатный электролит).

имеют модуль упругости $E = 80$ ГПа (при микротвердости $H = 2,7 - 3,2$ ГПа), что значительно больше по сравнению с естественной костью, для которой $E = 20$ ГПа (при $H = 0,6 - 0,8$ ГПа) [11]. Несоответствие этих параметров является причиной возникновения краевых напряжений в месте соединения имплантата с окружающей костью. При определенных величинах деформаций, возникающих при нагрузках, иногда случается отслоение кости от имплантата, приводящее к некрозу. Поэтому в данной работе были изучены механические и упруго-пластические характеристики кальций-фосфатных поверхностных слоев на титане. Согласно проведенным измерениям, микротвердость поверхностного ПЭО-слоя составила 2,2 ГПа, что несколько меньше микротвердости титана VT1-0 (2,7 ГПа). В то же время модуль Юнга для покрытия ($E = 30$ ГПа) почти в 2,5 раза меньше по сравнению с подложкой ($E = 80$ ГПа). Таким образом, сформированное на поверхности титана кальцийфосфатное покрытие имеет более близкие к естественной костной ткани механические характеристики по сравнению с подложкой, что также является важным достоинством получаемых методом ПЭО оксидных гетерогенных слоёв. Кальций-фосфатное покрытие, в этой ситуации, может выполнять функции демпфера, минимизируя вероятность отслоения кости от имплантата при деформациях.

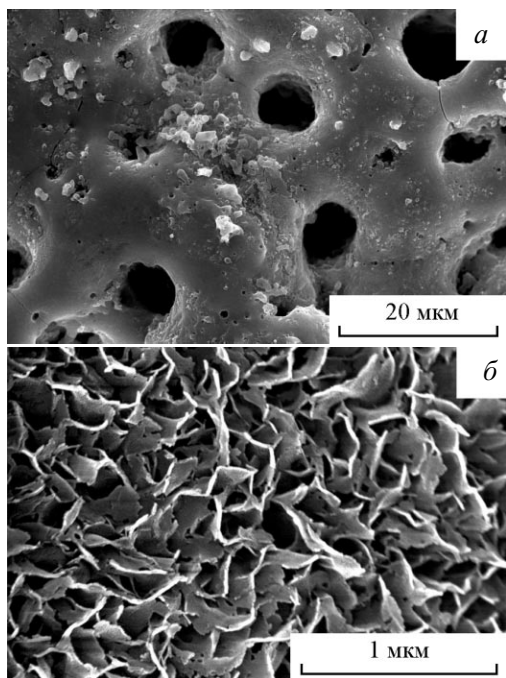


Рис. 5. СЭМ-изображение поверхности образца титана VT1-0 с покрытием, полученным в ацетатно-фосфатном электролите: *a* — до и *б* — после выдержки в SBF-растворе в течение 30 суток.

Основополагающим фактором успешного применения любого материала в медицине является предварительное тестирование в условиях *in vitro* и *in vivo*. Испытания *in vivo* продолжаются длительный период времени, как правило, до нескольких месяцев. Поэтому проводят предварительное тестирование *in vitro*, которое позволяет разделить материалы по степени.

Для оценки биологической активности образцов с кальций-фосфатными покрытиями использовали выдержку исследуемых образцов в модельной среде, имитирующей плазму крови человека (Simulated Body Fluid – SBF). Образцы помещали в модельную среду при постоянной температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. При этом раствор меняли каждые двое суток в течение месяца. Состав SBF-раствора [12] включает следующие исходные компоненты: NaCl, NaHCO_3 , KCl, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , Na_2SO_4 , деионизированная дистиллированная вода. $\text{pH} = 7,4$ достигали добавлением трис-гидроксиметил-аминометана ($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$) и раствора 1 М HCl. Исследовали образцы с покрытиями на титане VT1-0, полученные в цитрат- и ацетат-фосфатном электролите в режиме плазменного электролитического оксидирования. В состав поверхностных слоёв, согласно данным рентгенофазового анализа (таблица), входят кальций-фосфатные соединения.

На рис. 5 представлены СЭМ-изображения образцов до и после проведения испытаний в SBF-растворе. После выдержки покрытий в насыщенном по ионам Ca^{2+} и PO_4^{3-} SBF-растворе происходит минерализация и осаждение кристаллов кальций-фосфатных соединений на активных центрах поверхности покрытия. Как следует из анализа приведенных фотографий, после выдержки покрытия в растворе, имитирующем плазму человеческой крови, поверхность образца выравнивается, и происходит формирование чешуйчатой структуры гидроксиапатита, присутствие которого подтверждается методом рентгенофазового анализа.

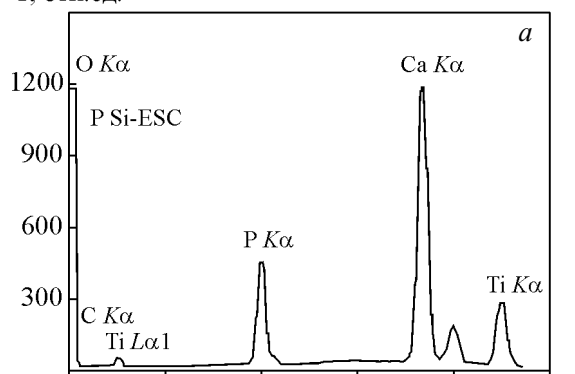
ПЭО-слои, сформированные в ацетатно-фосфатном электролите, показывают приблизительно одинаковую активность при испытании в SBF, поэтому на рис. 5 приведены изображения поверхности только для одного формирующего электролита.

Полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работах [13 – 17], в которых констатируется, что кальций-фосфатные покрытия с определенным уровнем шероховатости могут индуцировать образование кристаллического гидроксиапатита. Авторами работы [17] было показано, что при выдержке образца с покрытием в SBF-растворе на поверхности покрытия наблюдается рост гидрок-

сиапатита, образование которого в SBF-растворе является критерием биоактивности пленки. Покрытие улучшает биоактивность оксидной пленки и стимулирует биологические реакции *in vivo*, ускоряя рост кости и уменьшая время вживления имплантата. Как известно, полученные методом ПЭО покрытия на титане во многих случаях содержат помимо кальцийфосфатного покрытия еще и диоксид титана (в модификации рутил и анатаз). Изоэлектрическая точка рутила $4,6 \pm 0,4$ и анатаза $5,9 \pm 0,2$ [18]. В SBF-растворе рутил и анатаз могут заряжаться отрицательно и адсорбировать электростатически ионы Ca^{2+} на поверхности покрытия. Последние, притягивая анионы OH^- и HPO_4^{2-} , создают пересыщение фосфата кальция в приповерхностном слое покрытия. При определенных условиях фосфат кальция может минерализоваться из раствора с образованием гидроксиапатита.

Методом ЭДС (рис. 6) исследованы образцы с кальций-фосфатным покрытием до и после выдержки в физиологическом растворе в течение 30 суток. Анализ ЭДС-диаграммы показывает отсутствие сигнала Ti после выдержки образца в SBF-растворе,

I, отн.ед.



I, отн.ед.

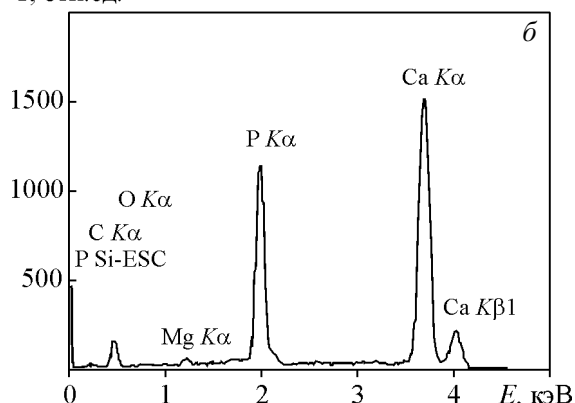


Рис. 6. Данные энергодисперсионной спектроскопии ПЭО-покрытия: *a* – до и *б* – после выдержки в SBF-растворе в течение 30 суток.

что объясняется образованием существенного по толщине слоя гидроксиапатита. Изучение данных ЭДС показывает увеличение концентрации Ca и увеличение отношения Ca/P на поверхности образца, находящегося в течение 30 суток в SBF-растворе.

Вместе с тем, установлено, что эффективность остеоинтеграции зависит от многих факторов, включая процессы, протекающие на границе раздела покрытие/костная ткань и покрытие/имплантат [19], что можно выяснить только в результате прямого эксперимента на биологическом объекте.

Для дальнейшего более глубокого исследования биоактивности полученных покрытий *in vivo* были проведены эксперименты по вживлению титановых имплантатов с покрытиями, полученными в цитрат-фосфатном и ацетат-фосфатном электролитах, непосредственно в организм лабораторных мышей. Результаты исследований показали, что подкожная имплантация дисков не вызвала побочных эффектов, связанных с воспалительными и аллергическими явлениями. Было установлено, что для возникновения остеоиндуктивных свойств в покрытии необходимо наличие соединений фосфора и кальция в определенном количественном соотношении. Однако, судя по результатам эксперимента, этот фактор является не единственным значимым параметром. Также одно из важных условий — шероховатость кальций-фосфатного слоя и абсолютная концентрация Ca и P в покрытии.

На гистологических препаратах тканевых пластинок, выросших на искусственных поверхностях с ПЭО-слоями при окраске гематоксилином-эозином, была выявлена грубоволокнистая костная ткань с полостями, заполненными костным мозгом (рис. 7).

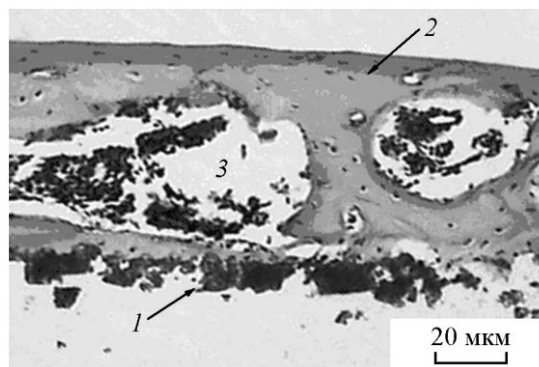


Рис. 7. Морфологическая структура тканевых пластинок, выросших на кальцийфосфатных покрытиях в тесте эктопического костеобразования у мышей. 1 – фрагменты кальцийфосфатного покрытия, 2 – костная пластинка, 3 – лакуны, заполненные красным костным мозгом.

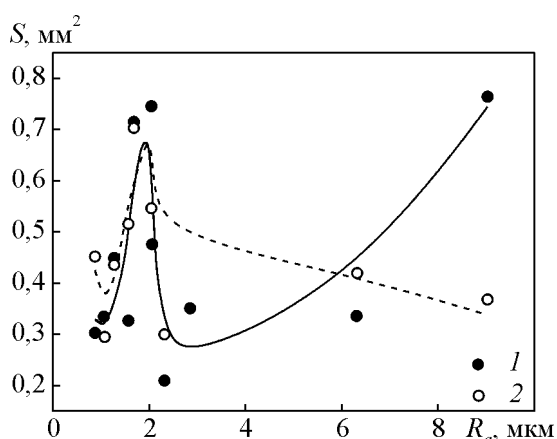


Рис. 8. График зависимости площади кости (1) и костного мозга (2) от шероховатости покрытия.

Количественные параметры гистологического состава (кость, костный мозг) тканевых пластинок, показатель шероховатости R_a , фазовый состав и отношение Ca/P покрытий приведены в таблице. Из анализа данных, представленных в таблице, следует, что в режиме ПЭО на титане, в растворах электролитов, содержащих цитрат и ацетат натрия, были получены биологически активные кальций-фосфатные покрытия. При этом данные рентгенофазового анализа, согласно которым в составе некоторых покрытий обнаружен только диоксид титана, не отрицают присутствия в них кальций-фосфатных соединений в виде рентгеноаморфной фазы. Об этом можно судить по высоким значениям отношения Ca/P в образцах, содержащих только TiO_2 . В составе образца 5 (таблица) были обнаружены гидроксиапатит кальция и фосфат кальция. Отношение Ca/P составило 1,92. Ключевым фактором оценки биоактивных свойств полученных покрытий является количество сформированной на их поверхности костной ткани.

В результате исследования влияния параметра шероховатости R_a на количественные показатели остеогенеза *in vivo* не было выявлено линейной зависимости показателей площади кости (S кости, мм²) и площади костного мозга (S костного мозга, мм²) от параметра шероховатости искусственных поверхностей R_a (рис. 8). Однако на графике обнаружены точки экстремума биоактивности при шероховатости покрытий в диапазоне 2–3 мкм.

Вместе с тем, шероховатость является важным, но не единственным критерием интенсивного образования костной ткани. Важную роль играет как абсолютное содержание в покрытии фосфора и кальция, так и их соотношение. Согласно данным,

приведенным в таблице, максимальное костеобразование наблюдалось для образцов 4 и 5. При различии их фазового состава (TiO_2 , рентгеноаморфная фаза для образца 4 и гидроксиапатита, $Ca_3(PO_4)_2$ для образца 5), отношение Ca/P высокое по сравнению с остальными образцами, приведенными в таблице. Образец 3 имеет достаточно высокое значение отношения Ca/P, но содержание Ca и P меньше по сравнению с образцами 4 и 5. К тому же параметр шероховатости R_a для образца 3 имеет максимальное значение (9,13 мкм) среди исследуемых поверхностей. С другой стороны, образцы 1 и 2 имеют оптимальную величину шероховатости R_a , равную 2,15 мкм и 2,86 мкм (рис. 8, таблица). Однако величины концентрации Ca и P, а также отношение Ca/P для этих образцов существенно ниже, по сравнению с образцами 4 и 5. В силу этих причин, вероятно всего, рост костной ткани на этих поверхностных слоях (образцы 1, 2, 3) невысокий. Таким образом, значение шероховатости поверхности является важным, но не достаточным условием костеобразования.

Это согласуется с данными ранее проведенных исследований *in vitro*, выявивших оптимум шероховатости искусственных поверхностей для проявления наилучших остеогенных свойств ММСК человека. Можно предположить, что оптимальные значения R_a для остеогенной дифференцировки ММСК человека *in vitro* и ММСК мыши в тесте эктопического костеобразования во многом аналогичны.

Выводы

1. Методом ПЭО на изделиях из титана ВТ1-0 были получены кальций-фосфатные покрытия, исследованы их фазовый и элементный составы, морфология поверхности и определено отношение Ca/P. Изучены коррозионные свойства покрытий. Установлено, что по своим механическим характеристикам кальций-фосфатные покрытия приближаются к механическим характеристикам костной ткани.

2. Проведенные испытания покрытий в искусственном SBF-растворе продемонстрировали биологическую активность изучаемых поверхностных слоев.

3. Биологическая активность поверхностных слоев в системе *in vivo* определяется суперпозицией специфических параметров: химическим составом, в частности, значениями концентраций Ca и P, а также их отношением и морфологическими особенностями (шероховатостью) кальций-фосфатного покрытия на поверхности титановых имплантатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного проекта СО и ДВО РАН (гранты № 126 и № 09-П-СО-04-001), федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы” (государственный контракт № 02.512.11.2285 от 10.03.2009), гранта РФФИ № 09-04-00287а.

Литература

1. Han Y., Hong S.-H., Xu K. Structure and in vitro bioactivity of titania-based films by micro-arc oxidation. *Surface and Coatings Technology*, 2003, v. 168, p. 249 – 258.
2. Путляев В.И. Современные биокерамические материалы. *Соросовский образовательный журнал*. 2004, т. 8, № 1, с. 44 – 50.
3. Suchanek W., Yashima M., Kakihana M., Yoshimura M. Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives. *Biomaterials*, 1997, v. 18, p. 925 – 933.
4. Легостаева Е.В., Шаркеев Ю.П., Толкачева Т.В., Толмачев А.И., Уваркин П.В. Биоактивное покрытие на имплантате из титана и способ его получения. Патент РФ № 2385740. Оpubл. 10.04.2010. Бюл. № 10.
5. Орловский В.П., Ежова Ж.А., Родичева Г.В. и др. Изучение условий образования гидроксиапатита в системе $\text{CaCl}_2-(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4-\text{NH}_4\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (25°C). *Журн. неорган. химии*, 1992, т. 37, вып. 4, с. 881 – 883.
6. Мамаев А.И., Мамаева В.А. Сильнотокковые процессы в растворах электролитов. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2005, 255 с.
7. Гнеденков С.В., Хрисанфова О.А., Завидная А.Г. Плазменное электролитическое окислирование металлов и сплавов в тартратсодержащих растворах. *Владивосток: Дальнаука*, 2008, 143 с.
8. Гнеденков С.В., Хрисанфова О.А., Синебрюхов С.Л., Пузь А.В., Нистратова М.В. Способ нанесения кальций-фосфатного покрытия на имплантаты из титана и его сплавов. Патент РФ № 2348744. Оpubл. 10.03.2009. Бюл. № 7.
9. Гнеденков С.В., Хрисанфова О.А., Синебрюхов С.Л., Пузь А.В., Нистратова М.В. Формирование на титане поверхностных слоев, содержащих гидроксиапатит. *Коррозия: материалы, защита*, 2008, № 8, с. 24 – 30.
10. Гнеденков С.В., Хрисанфова О.А., Синебрюхов С.Л., Пузь А.В., Гнеденков А.С. Композиционные защитные покрытия на поверхности никелида титана. *Коррозия: материалы, защита*, 2007, № 2, с. 20 – 25.
11. Zysset P. K., Guo X. E., Hofler C. E., Moore K. E., Goldstein S. A. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *Journal of Biomechanics*, 1999, v. 32, p. 1005 – 1012.
12. Kokubo T., Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 2006, v. 27, p. 2907 – 2915.
13. Wei D., Zhou Y., Jia D., Wang Y. Biomimetic apatite deposited on microarc anatase-based ceramic coatings. *Ceramic International*, 2008, v. 34, p. 1139 – 1144.
14. Wei D., Zhou Y., Jia D., Wang Y. Characteristics and in vitro bioactivity of a microarc-oxidized TiO_2 -based coating after chemical treatment. *Acta Biomaterialia*, 2007, v. 3, p. 817 – 827.
15. Wei D., Zhou Y., Jia D., Wang Y. Characteristics of microarc oxidized coatings on titanium alloy formed in electrolytes containing chelate complex and nano-HA. *Applied Surface Science*, 2007, v. 253, p. 5045 – 5050.
16. Ryu H.S., Song W.-H., Hong S.-H. Biomimetic apatite induction of P-containing titania formed by microarc oxidation before and after hydrothermal treatment. *Surface and Coatings Technology*, 2008, v. 202, p. 1853 – 1858.
17. Huang P., Xu K.-W., Han Y. Preparation and apatite layer formation of plasma electrolyte oxidation film on titanium for biomedical application. *Materials Letters*, 2005, v. 59, p. 185 – 189.
18. Hanawa T., Kon M., Doi H. et al. Amount of hydroxyl radical in calcium-ion implanted titanium and point of zero charge of constituent oxide of the surface modified layers. *J. Material Sci.: Mater. Med.*, 1998, v. 9, p. 89 – 92.
19. Kim M., Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 2003, v. 24, p. 2161 – 2175.

Гнеденков Сергей Васильевич — Институт химии ДВО РАН (г. Владивосток), профессор, доктор химических наук. Специалист в области физической химии и композиционных покрытий. E-mail: svg21@hotmail.com.

Хрисанфова Ольга Алексеевна — Институт химии ДВО РАН (г. Владивосток), кандидат химических наук, старший научный сотрудник. Специалист в области электрохимии и синтеза защитных поверхностных слоев на металлах и сплавах. E-mail: getma_@rambler.ru.

Синебрюхов Сергей Леонидович — Институт химии ДВО РАН (г. Владивосток), кандидат химических наук, старший научный сотрудник. Специалист в области электрохимии и импедансной спектроскопии. E-mail: sls@ich.dvo.ru.

Завидная Александра Григорьевна — Институт химии ДВО РАН (г. Владивосток), кандидат химических наук, научный сотрудник. Специалист в области физической химии. E-mail: Zavidnaya@ich.dvo.ru.

Пузь Артем Викторович — Институт химии ДВО РАН (г. Владивосток), младший научный сотрудник. Специалист в области физической химии и физико-химических методов исследования поверхности. E-mail: smol_shaman@mail.ru.

Шаркеев Юрий Петрович — Институт физики прочности и материаловедения СО РАН (г. Томск), профессор, доктор физико-математических наук. Специалист в области физики конденсированного состояния, взаимодействия ионных потоков с металлами и сплавами и медицинского материаловедения. E-mail: sharkeev@ispms.tsc.ru.

Легостаева Елена Викторовна — Институт физики прочности и материаловедения СО РАН (г. Томск), старший научный сотрудник, кандидат физико-математических наук. Специалист в области физики конденсированного состояния и медицинского материаловедения. E-mail: lego@ispms.tsc.ru.

Хлусов Игорь Альбертович — Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск), профессор, доктор медицинских наук. Специалист в области клеточной технологии, медицинского материаловедения и биоинженерии. E-mail: khlusov63@mail.ru.