

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОКСИДНЫХ И ОКСИНИТРИДНЫХ ПОКРЫТИЙ ТИТАНА, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ РЕАКТИВНОГО МАГНЕТРОННОГО РАСПЫЛЕНИЯ И ОЦЕНКА ИХ ГЕМОСОВМЕСТИМЫХ СВОЙСТВ IN VITRO

А.А. Пустовалова, Н.М. Иванова, М.Е. Конищев, И.А. Хлусов,
Сунь Чжилэй, К.Е. Евдокимов, В.Ф. Пичугин

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск
E-mail: author@example.com*

Проблема биосовместимости остается ключевой в медицинском материаловедении. Одним из путей её решения является нанесение биосовместимых покрытий на медицинские имплантаты.

В связи с этим, поиск новых технологий нанесения биосовместимых покрытий на медицинские имплантаты является актуальной научно-практической задачей. В этом плане наиболее совместимым с организмом и биоинертным материалом считается чистый титан, который образует на своей поверхности пленку оксида титана. Оксидная пленка является стабильной во времени, диэлектриком и практически не вступает в химические реакции с биологическими жидкостями и структурами [1]. Известно, что клеточный рост увеличивается пропорционально содержанию кислорода в искусственной поверхности [2], что может провоцировать избыточное размножение гладкомышечных клеток и снижению биосовместимости изделия.

Тонкие пленки оксида титана имеют хорошую перспективу быть использованными в медицине. На практике используется покрытие из нитрид-оксида титана (TiON), в котором кислород технологически замещается на атомы азота. Наиболее известным представителем подобного рода покрытий является TITANOX и его варианты (фирма Hexacath, Франция). Тем не менее, проблема их гемосовместимости полностью не решена. В связи с этим целью настоящей работы является оценка гемосовместимости покрытий оксидов и оксинитридов титана в связи с их структурными особенностями и характеристиками.

Материалы и методы

В качестве подложки использовалась медицинская сталь 12X18H10T (сторона квадрата 10 мм, толщина 1 мм), несущие односторонние покрытия на основе TiO₂ или Ti-O-N.

Гладкие поверхности ($R_a < 0,1$ мкм) на стальной подложке формировали посредством реактивного магнетронного распыления [3–6] электрода-мишени, выполненного из титана, в атмосфере кислород-аргон или смеси кислород-азот. Пленки были получены на экспериментальной установке среднечастотного магнетронного напыления «УВН-200МИ» [7]. В работе использовался следующий режим напыления: мишень Ti, давление кислорода 10^{-1} Па, напряжение разряда 335 В, ток 2,3 А. Время напыления составило 90 мин. Полученные покрытия имеют высокие механические свойства: коэффициент трения составляет 0,19–0,22, упругое восстановление 75 %, износостойкость – до $9,5 \text{ мм}^3/\text{Н}\cdot\text{м}$ [8].

Шероховатость поверхности покрытий оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью измерительной системы Talysurf 5-120 (Taylor-Hobson, UK) с разрешающей способностью 10 нм. Определяли R_a как среднее

арифметическое отклонение профиля в пределах базовой длины 1,5 мм согласно ГОСТ 2789–73.

Для исследования электрических параметров биопокровов использовался малогабаритный прибор с цифровым индикатором и автономным питанием (Томский политехнический университет). Прибор обеспечивает измерение потенциала поля на поверхностях слабо заряженных тел в условиях электростатических воздействий окружающей среды, многократно превышающих уровень измеряемых потенциалов, в частности, потенциалов биоэлектрического поля в биологически активных точках кожного покрова человека, сопоставимых с диапазоном потенциалов электрического поля на поверхности покрытий. В основу прибора заложен усовершенствованный метод Егучи (метод подъёмного электрода) [9].

Смачиваемость (гидрофильность/гидрофобность) поверхностей выявляли посредством измерения эффективного краевого угла θ капли деионизированной воды, используя установку EasyDrop DSA 20E (Германия). Исследования выполнялись при температуре 26 ± 1 °С и влажности 45 ± 5 %.

В биологической части экспериментов *in vitro* выделяли плазму крови здорового добровольца, обогащенную тромбоцитами, посредством центрифугирования при 250 g в течение 5 мин. По 1 мл плазмы добавляли в пробирки с тестируемыми изделиями и инкубировали 1 ч при 37 °С согласно ISO 10993-5. В качестве негативного контроля активации тромбоцитов применяли пробы без имплантатов, в качестве позитивного контроля – пробы со стальными изделиями без покрытия. Через 1 час определяли структурно-функциональные показатели первичного (тромбоцитарного) гемостаза.

Агрегационную активность тромбоцитов исследовали в пробах методом оптической плотности на четырехканальном анализаторе агрегации тромбоцитов AggRam Helena (Великобритания). В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали аденозиндифосфат (АДФ) в двух концентрациях (25 и 50 мкМоль/мл) или коллаген (10 мкг/мл). Для оценки функциональной активности тромбоцитов использовали следующие показатели: величину максимальной степени агрегации в процентах и площадь под кривой агрегации тромбоцитов. Погрешность метода измерения не превышала 5 %.

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программ Statistica (версия 6.0). Полученные результаты выражали как среднее арифметическое (X) и статистическую девиацию (SD). Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова-Смирнова). В основном, в выборках наблюдалось распределение показателей, отличное от нормального. В связи с этим, для оценки статистической значимости различий выборок применяли непараметрический статистический анализ. Для нивелирования разницы во времени определения проб использовали Т-критерий Вилкоксона для зависимых (по времени определения) выборок. С целью выявления связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ по Спирмену и регрессионный анализ. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение физико-химических свойств поверхности изделий показало следующие результаты. Коэффициент шероховатости R_a варьировал в пределах 0,33–0,54 мкм и статистически не зависел от типа подложки (с покрытием или без такового). Все поверхности оказались слабо гидрофильными: контактный угол смачивания (проба с во-

дой) составлял в среднем 84,8–86,6° без статистических различий между группами. Таким образом, данные показатели не могли влиять на контактную реакцию тромбоцитов к тестируемым искусственным поверхностям. При этом гидрофильность поверхности считается позитивным фактором гемосовместимости медицинских изделий [2].

В то же время, измерение электростатического потенциала покрытий относительно заземленной стальной подложки позволило выявить отрицательный знак заряда покрытий. При этом увеличение содержания кислорода (уменьшение уровня азота) в тонкой пленке оксида титана на стальной подложке сопровождалось ростом средней амплитуды потенциала с –170 до –570 мВ. Известно, что отрицательно заряженная поверхность предпочтительна для контакта с кровью [2].

Основные результаты измерений характеристик покрытий представлены в табл. 1.

Таблица 1. Основные характеристики TiO_2 и $Ti-O-N$ покрытий.

L – толщина покрытия, $\langle H \rangle$ – нанотвердость. $\langle E \rangle$ – модуль Юнга,

R_a – шероховатость, Θ – контактный угол смачивания, σ – поверхностная энергия

Образец	12X18H10T	Заземленная подложка (ЗП)			Режим смещения (-100 В)		
		TiO_2	$Ti-O-N$ 1\1	$Ti-O-N$ 1\3	TiO_2	$Ti-O-N$ 1\1	$Ti-O-N$ 1\3
L , нм	нет	149 ± 5	270 ± 6	290 ± 7	188 ± 8	190 ± 7	213 ± 8
R_a , нм	32	40 ± 2	35 ± 2	36 ± 2	54 ± 3	25 ± 1	38 ± 2
$\langle H \rangle$, GPa	2	7,3 ± 0,4	4,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2	4,1 ± 0,2	3,5 ± 0,2	–
$\langle E \rangle$, GPa	220	66,1 ± 1	67 ± 3	78 ± 9	145 ± 3	105 ± 3	–
$\Theta_{\text{вода}}$, °	88 ± 3	90,0 ± 3,0	105,7 ± 0,9	112,1 ± 2,0	96,8 ± 1,0	94,5 ± 0,5	95,1 ± 3,0
$\Theta_{\text{глицерол}}$, °	–	94,8 ± 2,0	98,8 ± 3,0	95,8 ± 10,0	81,5 ± 2,0	91,5 ± 2,0	91,6 ± 4,0
σ (мДж/м ²)	28 ± 1	20,5 ± 1,0	10,0 ± 0,9	20,0 ± 4,0	25,4 ± 0,8	15,6 ± 0,8	15,4 ± 2,0

Согласно данным, представленным в табл. 1, покрытия имеют высокие механические характеристики и хорошие упругие свойства. Электрическое смещение приводит к росту модуля упругости. $Ti-O-N$ пленки, осажденные в режиме ЗП более гидрофобны, чем пленки, осажденные в режиме смещения.

Результаты *in vitro* позволило установить, что показатели плазмы крови не менялись в течение 1-часового инкубирования при 37 °С, что позволило исключить влияние стенок пробирок на реакцию тромбоцитов крови человека, в условиях стимуляции процессов их агрегации, вызванной добавлением АДФ или коллагена. В то же время, контакт клеток со стальной подложкой приводил к увеличению практически всех показателей функциональной активности тромбоцитов по сравнению с негативным контролем (табл. 2).

Напротив, нанесение покрытий на стальную подложку приводило к статистически значимому, практически однотипному снижению функциональной активности тромбоцитов по сравнению со стальной подложкой. Так, замедлялось образование агрегатов тромбоцитов (увеличивался лаг-период) при стимуляции процесса как АДФ, так и коллагеном. При этом в жидкой части увеличивалась концентрация клеток и, соответственно, гематокрит (отношение объема клеточной массы к объему плазмы крови) (табл. 2). Этот процесс мог быть обусловлен несколькими причинами:

1) уменьшением числа тромбоцитов, образующих агрегаты, находящиеся непосредственно в жидкой фазе. Однако, площадь под кривой после стимуляции АДФ или коллагеном не отличалась в сравниваемых группах (табл. 2). Это можно объяснить тем фактом, что большее число тромбоцитов могло вносить свою погрешность в оптическую плотность, по которой вычисляют число агрегатов тромбоцитов;

Таблица 2. Клеточно-гуморальные показатели плазмы крови *in vitro* после контакта с подложками с односторонним покрытием, $\bar{X} \pm SD$

Группа, n=3	Реакция плазмы, обогащенной тромбоцитами, на тестируемые подложки									
	АДФ, максимальный уровень агрегации тромбоцитов, %	Лag-период АДФ, сек	Площадь под кривой, АДФ за 10 мин, %	Коллаген, максимальный уровень агрегации тромбоцитов, %	Лag-период коллаген, сек	Площадь под кривой, коллаген за 10 мин, %	Число тромбоцитов в плазме, Г/л	Средний объем тромбоцита, мкм ³	Тромбоцит, %	
Контроль негативный (плазма без подложек)	76,3	3,1	70,1	80,3	0	70,8	361	7,1	0,258	
Контроль позитивный (стальная подложка)	82,13±3,88	4,2	74,79±4,51	83,67±0,87	0	71,58±0,17	488,67±14,47	6,9±0,2	0,334±0,006	
сталь+TiO ₂ покрытие	84,73±1,39	5,0±0,61* <0,02	77,19±1,32	83,57±5,15	16,23±23,52	72,13±4,15	518,00±13,11* <0,05	6,9	0,356±0,010* <0,05	
сталь+TiON покрытие: N=4,5; Ag=0,3	83,10±2,61	5,1±0,35* <0,01	73,89±1,83# <0,05	83,67±1,44	15,27±20,82* <0,05	72,31±1,46	512,33±7,37* <0,05	6,77±0,06	0,346±0,003* <0,05	

Примечание: указаны различия *) – по сравнению со стальной подложкой; #) – с TiO₂ покрытием согласно T-критерию Вилкоксона.

2) снижением адгезии тромбоцитов из жидкой фазы к искусственным поверхностям, несущим оксидные покрытия титана на стальной подложке.

При этом корреляционный анализ по Спирмену показал сильную отрицательную связь амплитуды поверхностного электростатического потенциала изделий с числом тромбоцитов (PLT) в жидкой фазе (коэффициент корреляции рангов $r = -0,82$; $<0,007$; $n=9$) и тромбокритом ($r = -0,79$; $<0,011$; $n=9$).

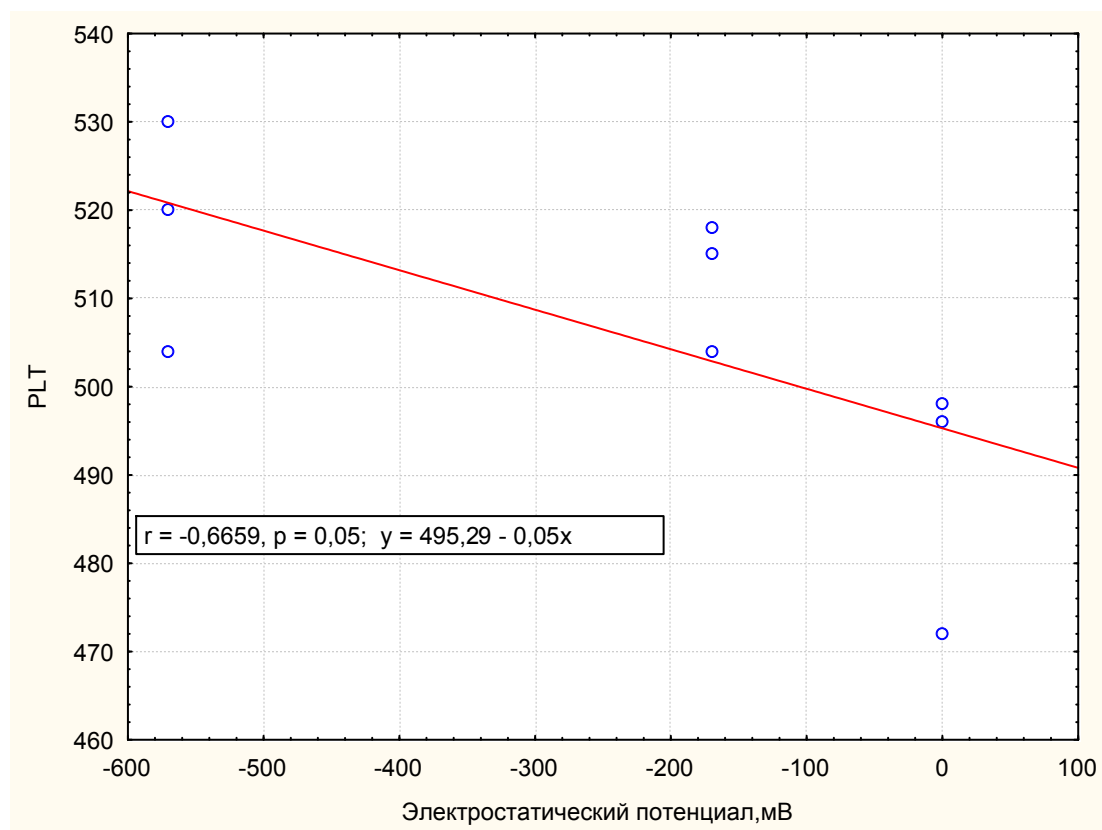


Рис. 1. Зависимость числа тромбоцитов в жидкой фазе (плазме) от амплитуды отрицательного поверхностного потенциала оксидных покрытий на стали.
 PLT – число тромбоцитов в жидкой фазе (плазме), $10^9/л$

Графическая интерпретация корреляционных зависимостей (регрессионный анализ) показывает (рис. 1), что рост амплитуды отрицательного по знаку дзета-потенциала имплантатов сопровождается накоплением тромбоцитов в жидкой фазе. Известен отрицательный дзета-потенциал поверхности тромбоцитов, препятствующий их агрегации в русле крови [2].

Таким образом, сформированные на стали покрытия на основе оксидов титана, за счет своих электроотрицательных свойств, препятствуют прилипанию тромбоцитов к твердой искусственной поверхности и, следовательно, образованию тромбов.

Заключение

Формирование оксидных покрытий титана на стали улучшает гемосовместимость изделий *in vitro* и снижает тромбогенный потенциал искусственных поверхностей. В основе полученного эффекта лежит отрицательный знак заряда их поверхностного потенциала.

Список литературы

1. Thull R. Titan in der Zahnheilkunde-Grundlagen // Z. Mitteilungen. – 1992. – V. 82. – P. 39–45.
2. Сосудистое и внутриорганное стентирование: руководство / под ред. Л.С. Кокова и др. – М.: Издательский дом «ГРААЛЬ», 2003. – 384 с.
3. Пичугин В.Ф., Кузьмин О.С., Морозова Н.С., и др. Синтез нанокристаллических пленок оксидов и оксинитридов титана методом реактивного магнетронного распыления // Труды 10 Международной конференции «Пленки и покрытия–2011», 31 мая – 3 июня 2011 г. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 236–239.
4. Pichugin V.F., Eshenko E.V., Surmenev R.A. et al. Application of High-Frequency Magnetron Sputtering to Deposit Thin Calcium-Phosphate Biocompatible Coatings on a Titanium Surface // Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2007. – Vol. 1. – No. 6. – P. 679–682.
5. Kudryavtseva E.N., Pichugin V.F., Nikitenkov N.N., Sypchenko V.S., Glukhova N.S., Shulepov I.A., Dushkin I.V. Study of Coatings Based on Titanium Oxides and Oxynitrides Using a Set of Methods // Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2012. – Vol. 6 – №. 4. – P. 688–692 [9250–2012].
6. Nikitenkov N.N., Kiseleva E.S., Konishchev M.E., Sypchenko V.S., Nikitenkov A.N., Pichugin V.F., Shulepov I.A., Epple M. Investigation of the Structure, Elemental and Phase Composition of Coatings on the Basis of Oxynitride Titanium Deposited by Reactive Magnetron Sputtering // Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2014. – Vol. 8. – №. 6. – P. 1230–1234 [1275112–2014].
7. Konishchev M.E., Kuzmin O.S., Pustovalova A.A., Glukhova N.S., Evdokimov K.E., Surmenev R.A., Pichugin V.F., Epple M.K. Structure and Properties of Ti–O–N Coatings Produced by Reactive Magnetron Sputtering // Russian Physics Journal. – 2014. – Vol. 56. – №. 10. – P. 1144–1149 [264302–2014].
8. Pichugin V.F., Pustovalova A.A., Konishchev M.E., Khlusov I.A., Ivanova N.M., Sun Z., Gutor S.S. In-Vitro Dissolution and Structural and Electrokinetic Characteristics of Titanium-Oxynitride Coatings Formed via Reactive Magnetron Sputtering // Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2016. – Vol. 10. – № 2. – P. 282–291.
9. Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Гостищев Э.А., Шаркеев Ю.П., Сурменев Р.А., Сурменова М.А., Легостаева Е.В., Чайкина М.В., Дворниченко М.В., Морозова Н.С. Влияние физических, химических и биологических манипуляций на поверхностный потенциал кальций-фосфатных покрытий на металлических подложках // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 3. – С. 72–81.

МЕТАЛЛОКЕРАМИЧЕСКИЕ ЗУБНЫЕ ПРОТЕЗЫ НА СПЛАВЕ «ТИТАНИД»

**С.И. Старосветский¹, В.А. Ефремов¹, А.П. Васильева¹,
Т.А. Хабас², В.В. Климова², М.А. Звигинцев¹**

¹ Медицинский лечебно-профилактический центр по проблеме сахарного диабета
E-mail: zvmikhail@yandex.ru

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск
E-mail: viktoriya_v.klimova@mail.ru

Качество металлокерамических зубных протезов, во многом, определяется свойствами применяемых сплавов и прочностью их сцепления с керамическим покрытием [2]. Актуальным представляется решение проблемы керамического покрытия каркасов зубных протезов на основе сплава из никелида титана [3]. В связи с тем, что титановый