

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи



**Федоткин Александр Юрьевич**

**Исследование влияния состава распыляемой мишени и рабочего газа на  
свойства кальций-фосфатных покрытий**

Специальность 1.3.8 – Физика конденсированного состояния

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель:  
кандидат физико-математических наук,  
научный сотрудник НОЦ Б.П. Вейнберга НИ ТПУ  
Козельская А.И.

Томск – 2022

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР ПО ТЕМЕ «МАТЕРИАЛЫ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ» .....	14
1.1. Кальций-фосфатные материалы для медицинского применения .....	18
1.1.1. Гидроксиапатит.....	21
1.1.2. $\beta$ -трикальцийфосфат.....	28
1.2. Формирование кальций-фосфатных покрытий методом высокочастотного магнетронного распыления.....	30
1.2.1. Влияние ионных замещений в структуре распыляемой мишени на скорость осаждения и свойства биосовместимых кальций-фосфатных покрытий, сформированных методом ВЧМР ...	31
1.2.2. Влияние рабочего газа на скорость осаждения и свойства КФ покрытий, сформированных методом ВЧМР .....	41
1.3. Постановка задачи .....	48
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	51
2.1. Материалы исследований .....	51
2.2. Методы исследований .....	54
2.2.1. Оптическая эмиссионная спектроскопия .....	54
2.2.2. Контактная профилометрия.....	55
2.2.3. Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная спектроскопия .....	55
2.2.4. Атомно-силовая микроскопия .....	55
2.2.5. Рентгенофазовый анализ.....	56
2.2.6. Метод Брунауэра-Эммета-Теллера .....	56
2.2.7. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия .....	57
2.2.8. Смачиваемость покрытий .....	57
2.2.9. Наноиндентирование и scratch-тест .....	58
2.2.10. Атомно-эмиссионная спектроскопия .....	59
2.2.11. Статистический анализ .....	59
2.2.12. Компьютерное моделирование элементарной ячейки $\beta$ -трикальцийфосфата .....	59
2.2.13. Компьютерное моделирование коэффициента распыления .....	60
2.2.14. Выделение ММСК.....	60
2.2.15. Исследование биodeградации покрытий.....	61
2.2.16. Клеточность ММСК.....	62
2.2.17. Жизнеспособность ММСК .....	62

2.2.18. Экспрессия генов.....	63
2.2.19. Статистический анализ результатов исследования биологических свойств.....	66
3. ВЛИЯНИЕ Sr И Mg-ЗАМЕЩЕНИЙ В СОСТАВЕ ПОРОШКОВЫХ МИШЕНЕЙ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА И $\beta$ -ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА НА СКОРОСТЬ ИХ РАСПЫЛЕНИЯ И НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОКРЫТИЙ, СФОРМИРОВАННЫХ МЕТОДОМ ВЧМР.....	67
3.1. Кальций-фосфатные покрытия, сформированные ВЧ-магнетронным распылением Sr и Mg-замещенных $\beta$ -трикальцийфосфатных мишеней .....	67
3.2. Кальций-фосфатные покрытия, сформированные ВЧ-магнетронным распылением Sr и Mg-замещенных ГАП мишеней.....	84
3.3. Выводы по главе .....	88
4. ВЛИЯНИЕ РАБОЧЕГО ГАЗА НА СКОРОСТЬ ОСАЖДЕНИЯ, МОРФОЛОГИЮ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ, МЕХАНИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ ПОКРЫТИЙ, СФОРМИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ВЧМР .....	90
4.1. Закономерности ВЧ-магнетронного распыления твердотельной ГАП мишени и осаждения кальций-фосфатных покрытий в среде различных инертных рабочих газов .....	90
4.2. Морфология, физико-химические и механические свойства кальций-фосфатных покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением твердотельной мишени ГАП в среде различных инертных рабочих газов .....	97
4.3. Биологические свойства кальций-фосфатных покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением твердотельной ГАП мишени в среде различных инертных рабочих газов.....	104
4.4. Выводы по главе .....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	115
ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119
ПРИЛОЖЕНИЕ А. АКТ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ.....	145

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы травмы являются одной из основных причин смертности населения в Российской Федерации наряду с сердечно-сосудистыми, онкологическими и инфекционными заболеваниями. Дорожно-транспортный травматизм, техногенные и природные катастрофы, терроризм и военные конфликты, урбанизация способствуют неуклонному росту травматизма населения. Огромное влияние травматизм оказывает на экономические и медико-социальные проблемы общества, поскольку ведет к инвалидизации и смертности преимущественно трудоспособной части населения.

В свою очередь, операции соединения отломков костей с помощью специальных накостных и внутрикостных имплантатов связаны с риском развития осложнений вследствие нестабильной внутренней фиксации имплантата. Высокая скорость и качество консолидации костей, а в необходимых случаях и интеграция кости с внедренным в нее имплантатом являются необходимыми условиями успешного лечения и реабилитации таких больных.

Одним из наиболее серьезных возрастных заболеваний является остеопороз – заболевание скелета, при котором происходит уменьшение его плотности (массы костной ткани в единице ее объема), сопровождающееся нарушением его структуры. Слабость скелета приводит к развитию переломов даже при незначительной травме. Остеопоротические переломы обуславливают большие материальные затраты в области здравоохранения и приводят к высокому уровню нетрудоспособности, включая инвалидность и смертность. Операции, связанные с использованием имплантатов у пациентов с остеопорозом, связаны с большим риском развития осложнений вследствие ослабления связи между имплантатом и костью из-за резорбции кости на границе раздела. Поэтому во многих случаях пациентам с остеопорозом требуется повторное хирургическое вмешательство.

Успешная остеоинтеграция имплантата, высокая скорость и качество консолидации костей являются залогом реабилитации пациентов с дефектами структуры костной ткани. По статистике, сращивание переломов занимает от 4 до

10 месяцев. Согласно мировым стандартам, удлинение кости на 1 см при помощи аппарата Илизарова занимает 45-65 дней, что вызывает дополнительные осложнения и в 6-30% случаев приводит к инвалидности.

Причины того, что за последние 100 лет практически не изменились сроки сращения переломов связаны, прежде всего, с тем, что в подавляющем большинстве случаев остеосинтез осуществляется с использованием устаревших материалов и технологий, в которых отсутствуют биоактивные и остеостимулирующие компоненты. Требуемые материалы частично или полностью отсутствуют на российском рынке. В таких областях медицины, как травматология и краниофациальная хирургия, наблюдается особенно острый дефицит имплантатов, предназначенных для восстановления крупных дефектов и патологий структуры костной ткани.

Самого по себе регенеративного потенциала организма пациента недостаточно для восстановления больших костных дефектов. Перспективным методом повышения качества восстановления функций опорно-двигательного аппарата и фиксации имплантатов является модифицирование их поверхности путем нанесения биоактивных покрытий, в том числе из различных фосфатов кальция.

Все вышеизложенное обуславливает необходимость разработки новых материалов, обладающих необходимым набором заданных свойств для персонализированной медицины.

### **Степень разработанности темы исследования**

На сегодняшний день как в России, так и за рубежом активно ведутся работы по созданию медицинских имплантатов с биоактивными кальций-фосфатными покрытиями, осаждаемыми методом высокочастотного магнетронного распыления (ВЧМР). Существенный вклад в развитие данного направления внесли работы коллективов под руководством К. Озеки из университета Ибараки (Япония), проф. М. Эппле из университета Дуйсбург-Эссен (Германия), А. Владеску из Национального института оптоэлектроники (Румыния), а также проф. А.Р. Бойда

из Ольстерского университета (Великобритания). На базе Томского политехнического университета научными группами под руководством к.ф.-м.н. С.И. Твердохлебова, проф., д.ф.-м.н. В.Ф. Пичугина, д.т.н. Р.А. Сурменева, и проф., д.ф.-м.н. Ю.П. Шаркеева (ИФПМ СО РАН, ТПУ) также проводятся исследования кальций-фосфатных покрытий, осаждаемых методом высокочастотного магнетронного распыления.

Несмотря на значительное количество публикаций по теме, связанной с формированием биоактивных кальций-фосфатных покрытий методом ВЧ магнетронного распыления, в том числе с катионными или анионными замещениями, остаются несистематизированными исследования по влиянию Mg и Sr замещений в составе кальций-фосфатных мишеней на скорость осаждения и свойства формируемых покрытий. Кроме того, в литературе полностью отсутствовали работы, посвященные формированию биоактивных покрытий в атмосфере различных инертных рабочих газов методом ВЧ магнетронного распыления кальций-фосфатных мишеней.

**Целью** данной работы являлось исследование влияния состава распыляемой мишени и рабочего газа на скорость осаждения и свойства кальций-фосфатных покрытий, сформированных методом ВЧМР.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Сформировать на поверхности титановых подложек КФ покрытия методом ВЧМР порошковых Sr- и Mg-замещенных мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ и ГАП;
2. Сформировать на поверхности титановых подложек КФ покрытия методом ВЧМР твердотельной мишени из ГАП в среде различных инертных рабочих газов (Ar, Kr и Xe);
3. Исследовать влияние ионных замещений в структуре распыляемых порошковых мишеней на скорость осаждения КФ покрытий в процессе ВЧМР;
4. Исследовать влияние инертного рабочего газа на скорость осаждения КФ покрытий в процессе ВЧМР;

5. Исследовать морфологию, физико-химические и механические свойства покрытий, осажденных ВЧМР порошковых мишеней из  $\beta$ -ТКФ и ГАП, содержащих магний и стронций;

6. Исследовать морфологию, физико-химические, механические и биологические свойства покрытий, осажденных ВЧМР твердотельной мишени из ГАП в атмосфере различных инертных газов;

7. Провести комплексный анализ полученных экспериментальных данных.

### **Научная новизна:**

1. Установлена взаимосвязь между изменением объема элементарной ячейки распыляемого материала вследствие внедрения Mg и Sr замещений в структуру  $\beta$ -трикальцийфосфата и скоростью осаждения покрытий.

2. Впервые исследовано влияние рабочего газа на скорость распыления твердотельной мишени из ГАП. Показано, что распыление мишени из ГАП в Ar и Kr происходит с сопоставимой и более высокой скоростью по сравнению с осаждением в Хе, что обусловлено снижением коэффициента распыления по мере увеличения атомной массы рабочего газа.

3. Показано, что выбор инертного рабочего газа оказывает влияние на морфологию поверхности, физико-химические, механические и биологические свойства формируемых покрытий. По мере увеличения атомной массы инертного рабочего газа наблюдается увеличение содержания кальция и снижение содержания кислорода в осаждаемых покрытиях. Покрытия, сформированные в Хе, являются полностью аморфными и характеризуются высокой адгезией к подложке.

4. Установлено, что КФ покрытия, сформированные в Хе, способствуют полуторакратному увеличению количества жизнеспособных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток по сравнению со всеми исследуемыми группами образцов с покрытиями и титановой подложкой.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Установленные закономерности распыления порошковых Sr- и Mg-замещенных мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ и ГАП и твердотельной ГАП мишени в

среде различных инертных рабочих газов (Ar, Kr и Xe) вносят вклад в развитие физики конденсированного состояния, а именно в развитие представлений о формировании биоактивных покрытий биомедицинского применения методом ВЧМР. Полученные в работе зависимости между составом распыляемой порошковой мишени на основе ГАП и  $\beta$ -ТКФ, типом рабочего газа и морфологией, физико-химическими и биологическими свойствами формируемых покрытий позволяют не только целенаправленно задавать набор их свойств, но и оптимизировать длительность технологического процесса, что благотворно скажется на конечной себестоимости изделия. Все вышеотмеченное в совокупности позволит разработать технологию модифицирования металлических имплантатов и тем самым повысить качество и доступность современных медицинских изделий для российских граждан, что, в свою очередь, позволит значительно улучшить исходы лечения политравм, сохранять жизни и здоровье пациентам.

По результатам работы оформлен акт об использовании результатов диссертационной работы в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения РФ.

### **Методология и методы исследования**

Исследование морфологии поверхности, физико-химических и механических свойств КФ покрытий, сформированных методом ВЧ-магнетронного распыления, проводилось с использованием следующих методов: оптическая эмиссионная спектроскопия, контактная профилометрия, атомно-силовая спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия, энергодисперсионная спектроскопия, рентгенофазовый анализ, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия, наноиндентирование, скрэтч-тест, оптическая гониометрия с последующим расчетом свободной энергии поверхности методом ОВРК, атомно-эмиссионная спектроскопия растворов и компьютерное моделирование атомной структуры  $\beta$ -ТКФ методом проекционных



присоединенных волн (PAW). Исследования проводились с использованием оборудования Томского политехнического университета, Томского регионального центра коллективного пользования (ТРЦКП) Национального исследовательского Томского государственного университета, Научно-образовательного инновационного центра «Наноматериалы и нанотехнологии» Национального исследовательского Томского политехнического университета. Численные расчеты выполнены на суперкомпьютере СКИФ-Cyberia в Национальном исследовательском Томском государственном университете.

Для изучения биологических свойств КФ покрытий применяли проточную лазерную цитометрию и мультиплексный анализ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) получали из тканей человека в полном соответствии с юридическими и этическими принципами проведения медико-биологических исследований с использованием биоматериала человека, принятыми на территории РФ. Выделение ММСК и исследование биологических свойств образцов проводилось сотрудниками БФУ им. Канта.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Присутствие стронция в виде замещений кальция в количестве  $0,87 \pm 0,02$  ат.% в структуре распыляемых порошковых мишеней на основе  $\beta$ -трикальцийфосфата увеличивает скорость осаждения покрытий, формируемых методом высокочастотного магнетронного распыления, в то время как замещения кальция магнием в количестве  $1,38 \pm 0,01$  ат.% способствуют ее уменьшению.

2. Наличие магния и стронция в виде замещений в количестве  $0,93 \pm 0,13$  ат.% и  $\sim 0,47$  ат.% в составе распыляемых порошковых мишеней из гидроксиапатита не оказывает влияния на скорость осаждения покрытий, формируемых методом высокочастотного магнетронного распыления.

3. Формирование покрытий в атмосфере аргона и криптона происходит с сопоставимой и более высокой скоростью по сравнению с осаждением в ксеноне, что обусловлено снижением коэффициента распыления по мере увеличения

атомной массы рабочего газа.

4. Кальций-фосфатные покрытия, сформированные в ксеноне, являются полностью аморфными и характеризуются высокой адгезией к подложке по сравнению с покрытиями, сформированными в средах аргона и криптона.

5. Сформированные в ксеноне кальций-фосфатные покрытия способствуют полуторакратному увеличению количества жизнеспособных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток по сравнению со всеми исследуемыми группами образцов с покрытиями и титановой подложкой.

**Достоверность** полученных в работе экспериментальных результатов подтверждается использованием современных высокоточных методов исследования, уникальных научных стендов и установок, научного оборудования центров коллективного пользования, объектов зарубежной инфраструктуры сектора исследований и разработок. Объем экспериментальных данных является достаточным, хорошо проработанным и не противоречащим имеющимся литературным данным. Полученный акт внедрения свидетельствует о высоком качестве проведенных исследований.

#### **Апробация работы.**

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на конференциях: 6th International Congress on Energy Fluxes and Radiation Effects (Томск, Россия, 2018); 14-ой Международной конференции «Пленки и покрытия» (Санкт-Петербург, Россия, 2019); 27-ой Всероссийской научно-технической конференции с международным участием «Вакуумная техника и технологии (Санкт-Петербург, Россия, 2020); 7th International Congress on Energy Fluxes and Radiation Effects (Томск, Россия, 2020); XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, Россия, 2020); XXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 110-летию со дня рождения профессора А.Г. Стромберга (Томск,

Россия, 2020); 15-ой Международной конференции «Пленки и Покрытия» (Санкт-Петербург, Россия, 2021); Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, Россия, 2021); Научной конференции OpenBio в рамках площадки открытых коммуникаций «OpenBio -2021» (Новосибирск, Россия, 2021).

### **Публикации.**

Результаты диссертационной работы изложены в 14 научных публикациях, из них 5 в журналах, рекомендованных ВАК, 14 – в журналах, индексируемых в базе данных Scopus, 12 – в журналах, индексируемых в базе данных Web of Science. Опубликовано 1 научно-методическое пособие. Получен 1 акт об использовании результатов диссертационной работы в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения РФ.

### **Личный вклад автора.**

Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены при личном участии автора. Совместно с руководителем автор принимал участие в постановке цели и задач диссертационного исследования, в выборе методов их решения, планировании и проведении экспериментальных исследований, анализе и интерпретации экспериментальных данных, подготовке научных статей, апробации результатов на международных конференциях.

**Диссертационная работа** выполнена в рамках следующих проектов и договоров: ФЦП, Соглашение № 14.578.21.0031 от 05 июня 2014, "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса на 2014-2020"; ВИУ-ИЯТШ-302/2018 "Разработка остео- и иммуностимулирующих материалов для персонализированной медицины при политравме, осложненной различными патологиями"; ВИУ-ИЯТШ-204/2019 "Разработка остеостимулирующих материалов для персонализированной медицины при политравме, осложненной остеопорозом"; РНФ 21-73-20262 "Искусственные композитные полимерные скаффолды сформированные методом

многоканального электроспининга с модифицированной поверхностью для приложений сердечно-сосудистой хирургии"; ФЦП, Соглашение № 14.575.21.0140 от 26.09.2017, "Разработка остеостимулирующих имплантатов на основе гибридных технологий модифицирования их поверхности и компьютерного моделирования выхода лекарственных препаратов для персонализированной медицины при политравме и онкологии"; Контракт с Koatum Spółka Akcyjna 18.08.02-125/2020к «Разработка метода нанесения DDS CaP покрытий, содержащих NO, для биомедицинских применений»; ВИУ-НОЦ Б.П. Вейнберга-196/2020 "Разработка прототипов медицинских изделий на основе гибридных и композиционных материалов с терапевтическим эффектом для лечения различных нозологий"; Приоритет-2030-НИП/ИЗ-011-0000-2022 "Разработка метаинтерфейсов и микроустройств для имплантатов и живых систем".

#### **Структура и объем диссертационной работы.**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы, включающего 256 источников. Полный объем работы – 146 страниц, в том числе 34 рисунка и 20 таблиц.

## Благодарности

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю, к.ф.-м.н. **А.И. Козельской** – научному сотруднику Лаборатории плазменных гибридных систем НОЦ им. Б.П. Вейнберга НИ ТПУ и к.ф.-м.н. **С.И. Твердохлебову** – и.о. руководителя Лаборатории плазменных гибридных систем, НОЦ им. Б.П. Вейнберга НИ ТПУ, доценту НОЦ им. Б.П. Вейнберга НИ ТПУ, доценту Отделения естественных наук НИ ТПУ – за наставничество и неоценимую помощь в формировании научного подхода и курировании исследовательских результатов; к.х.м. **Н.М. Коротченко**, доценту кафедры неорганической химии ТГУ – за изготовление порошковых кальций-фосфатных мишеней; д.ф.-м.н. **С.Е. Кульковой** – главному научному сотруднику Лаборатории физики нелинейных сред ИФПМ СО РАН, профессору кафедры теоретической физики ТГУ и к.ф.-м.н. **А.В. Бакулину** – старшему научному сотруднику Лаборатории физики нелинейных сред ИФПМ СО РАН – за проведение компьютерного моделирования элементарной ячейки  $\beta$ -трикальцийфосфата; д.м.н. **Л.С. Литвиновой** – директору Центра иммунологии и клеточных биотехнологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации – за проведение биологических исследований *in vitro*; д.м.н., проф. **И.А. Хлусову** профессору кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ, профессору Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий – за обсуждение результатов биологических исследований; д.ф.-м.н., проф. **Г.А. Блейхер** – профессору НОЦ им. Б.П. Вейнберга и к.т.н. **Д.В. Сиделеву** – доценту НОЦ им. Б.П. Вейнберга, научному сотруднику Лаборатории перспективных материалов и обеспечения безопасности водородных энергосистем – за участие в обсуждении полученных результатов; семье и друзьям за поддержку в ходе выполнения работы.

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР ПО ТЕМЕ «МАТЕРИАЛЫ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»

Все материалы, используемые для изготовления имплантатов, можно разделить на четыре категории: металлы, керамика, полимеры и композитные материалы [1]. Выбор материала для изготовления имплантатов производится в соответствии с требованиями к конечному изделию. Не существует единого списка требований к имплантатам. Он может варьироваться в зависимости от функционального предназначения имплантата, персональных особенностей пациента и локализации травмированной ткани. Однако существует ряд требований, единых для всех видов имплантатов [2]:

- не вызывать местной воспалительной реакции;
- не оказывать токсического и аллергического воздействия на организм;
- не обладать канцерогенным действием;
- не провоцировать развитие инфекции;
- сохранять функциональные свойства в течение всего предусмотренного срока эксплуатации.

Металлы и их сплавы нашли широкое распространение в ортопедии и ортодонтии, при изготовлении искусственных органов и различных электронных устройств, имплантируемых в организм пациента (например, кардиостимулятор). Использование металлов в ортопедии обусловлено их высокой механической прочностью и пластичностью. При восстановлении крупных дефектов костной ткани имплантат может подвергаться высоким механическим нагрузкам и должен их выдерживать без остаточной деформации и разломов. Немаловажную роль играет и расположение дефекта: чем ниже он расположен, тем большую нагрузку на имплантат будет оказывать масса тела. При выборе металлов для изготовления имплантатов к ним предъявляются следующие требования: биологическая совместимость (отсутствие нежелательных реакций в организме на имплантат [2]), физические и механические свойства, длительный срок эксплуатации, устойчивость к коррозии [1].

Керамика также широко используется при изготовлении имплантатов ввиду своей высокой биологической совместимости, высокой твердости, температурной и коррозионной стойкости. К ее недостаткам следует отнести хрупкость и ломкость. Их наличие существенно ограничивает применение данного класса материалов в ортопедии, поскольку его использование в качестве конструкционного материала нежелательно при наличии ударных, динамических и знакопеременных нагрузок на имплантат. Кроме того, при использовании керамических имплантатов необходим плотный и постоянный контакт имплантата с тканями организма. Его отсутствие может привести к возникновению перемещений и, как следствие, разлому имплантата или травме костной ткани ввиду высокой твердости керамики [1].

Полимерные материалы в реконструктивной хирургии представлены широким спектром изделий. Помимо множества медицинских изделий, не используемых в имплантологии напрямую, из них изготавливается множество искусственных органов, а именно почки, кровеносные сосуды, клапаны, зубные протезы и т.п. Несмотря на все многообразие полимеров, в ортопедии они нашли лишь ограниченное применение. Одним из таких полимеров является полиэтилен. Данный материал характеризуется гидрофобностью, биоинертностью (отсутствием взаимодействия с окружающими тканями) и низким пределом текучести. В настоящее время использование полиэтилена высокого давления сильно ограничено, хотя ранее он применялся в краниофациальной хирургии достаточно часто. Полиэтилен ультравысокого молекулярного веса характеризуется высокими прочностными характеристиками. Он нашел применение в изготовлении эндопротезов суставов, некоторых костей, их частей, а также для соединения отломков. Полипропилен обладает высокой ударной вязкостью, стойкостью к изгибанию и высокой износостойкостью. Полиэтилен используется в качестве основы для изготовления эндопротезов мелких суставов верхних конечностей, а также для связывания используемых для протезирования дефектов структуры костной ткани материалов.

Среди прочих материалов медицинского назначения следует отдельно выделить композитные материалы. Как следует из вышеизложенного, металлы, керамика и полимеры обладают рядом преимуществ и недостатков. Использование композитов позволяет сочетать преимущества и компенсировать недостатки данных материалов. Композит представляет собой многокомпонентный материал, состоящий из основы (матрицы) и наполнителя. Обычно матрица отличается высокой пластичностью, а наполнитель – твердостью. Использование композитов в качестве основы для имплантата позволяет снизить его массу без ущерба для механических свойств. Композиты с керамической матрицей и углеродными или карбидкремниевыми волокнами используются в стоматологии и ортопедии и превосходят по своим механическим свойствам обычные материалы. Также в ортопедии широко используются имплантаты на основе полимерной матрицы для имитации упругих свойств кости. Однако следует отметить, что большинство композитов не способны совместить требования, предъявляемые к биологической совместимости и функциональным особенностям, несмотря на все их неоспоримые преимущества [1].

На текущий момент проблема повышения биологической совместимости поверхности имплантата сохраняет свою актуальность. В ряде развитых стран, таких как США, Япония, Германия и др., данная проблема решается в двух исследовательских направлениях. Первое из них заключается в разработке принципиально новых конструкционных материалов. Оно подразумевает проведение исследований физико-химических и механических свойств материала, токсичности и канцерогенности продуктов его деградации, его износостойкости при нахождении в телесной жидкости, проведение ряда биологических исследований. Данный подход подразумевает наличие больших финансовых и временных затрат. Второе исследовательское направление заключается в модифицировании лишь поверхности ранее допущенных к использованию материалов имплантатов для повышения их биологической активности и совместимости. Модифицирование поверхности может заключаться в ее обработке



либо формировании на ней различных покрытий. Данный подход является рациональным с точки зрения ресурсоэффективности, т.к. он подразумевает наличие меньшего количества затрат за счет экономии на ранее проведенных исследованиях объемных характеристик материала, таких как износостойкость, долговечность, механические свойства и т.д. Соответственно, требуется проведение только тех исследований, предметом которых является поверхность или покрытие.

Помимо повышения биологической совместимости поверхности имплантата, необходимость ее модифицирования обусловлена длительным пребыванием имплантата в организме и, как следствие, коррозионным воздействием на его металлическую основу. Коррозионное воздействие, в свою очередь, приводит к возникновению продуктов коррозии, которые оседают в окружающих имплантат тканях и вызывают металлоз. Следствием его возникновения является формирование фиброзной капсулы вокруг имплантата, его расшатывание и воспаление окружающих тканей. Помимо этого, высока вероятность возникновения разного рода осложнений, затрудняющих процесс остеоинтеграции и снижающих общую эффективность лечения.

Для предотвращения коррозии металлических имплантатов, придания им износостойкости и биологической совместимости на их поверхности формируются химически инертные покрытия, обладающие диэлектрическими свойствами. Примером такого рода покрытий являются оксиды. Оксидный слой на поверхности металлического имплантата, обладающий низкой химической активностью, выполняет барьерные функции, предотвращая нежелательный контакт телесных жидкостей с имплантатом. Существует множество способов формирования оксидов на металлических поверхностях: термическое оксидирование, микродуговое оксидирование, имплантация ионов кислорода и т.д. Все они давно отработаны, и их выбор обусловлен оборудованием в наличии, требованиями к изделию и техническими ограничениями.

Помимо окисления приповерхностных слоев металлического имплантата,

существует другой подход к формированию защитного слоя на его поверхности, а именно осаждение кальций-фосфатных (КФ) покрытий. Помимо барьерных функций КФ покрытия обладают лучшей биологической совместимостью и активностью по сравнению с металлами и их оксидами, что обуславливает лучшую интеграцию имплантата с костной тканью.

### **1.1. Кальций-фосфатные материалы для медицинского применения**

Использование КФ материалов в качестве покрытий имплантатов для восстановления дефектов костной ткани нашло широкое распространение ввиду схожести их элементного и фазового состава с составом минеральной части кости [3]. Однако используемые в медицинском материаловедении КФ материалы являются слишком хрупкими и ломкими для изготовления из них основы имплантатов для замещения костных дефектов, подвергающихся высокой механической нагрузке. По этой причине КФ материалы используются в качестве покрытий на более прочных и пластичных металлических имплантатах, что позволяет сочетать механические свойства металлов и биологическую совместимость и активность кальций-фосфатов. С их помощью достигается повышение биологической совместимости и активности поверхности имплантата, его остеоинтеграция без границы раздела с волокнистой соединительной тканью.

Фазовый состав минеральной части костной ткани содержит множество различных фаз КФ материалов. Гидроксиапатит (ГАП,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) и  $\beta$ -трикальцийфосфат ( $\beta$ -ТКФ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) с различными ионными замещениями являются основой минеральной части человеческой кости. Помимо этого, в кости содержится значительное количество КФ, содержащих ионы  $\text{HPO}_4^{2-}$  и  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , таких как аморфный фосфат кальция (АКФ,  $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ,  $n = 3-4,5$ ), дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) и октакальцийфосфат (ОКФ,  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Все перечисленные материалы нашли свое применение в качестве биоактивных покрытий для реконструктивной хирургии [4]. Состав костной ткани без учета металлических ионных замещений, количество которых может колебаться в зависимости от ее локализации, характеризуется

приблизительной формулой:  $\text{Ca}_{8,3}(\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_{1,7}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3, \text{OH})_{0,3}$  [5].

В кристаллической структуре костная ткань также присутствуют различные ионные замещения. Они обеспечивают стабильность кости, а их недостаток может привести к деградации костной структуры и способствовать развитию таких заболеваний, как остеопороз. Наличие ионных замещений в составе КФ покрытия позволяет производить реконструкцию костной ткани, осложненной остеопорозом, и способствовать ее росту путем ингибирования остеокластов и стимулирования остеобластов [6,7].

Локализация дефекта структуры костной ткани также определяет требования к медицинскому изделию. Примером такого влияния является механическая прочность изделия. Общеизвестно, что чем ниже расположен дефект опорно-двигательной системы, тем большей механической нагрузке он подвержен. Это объясняется тем, что, в положении стоя, на дефект оказывает давление масса только той части тела, которая расположена выше места расположения травмы. Разнообразие требований к имплантатам обуславливает потребность реконструктивной хирургии и ортопедии в материалах с широким спектром свойств. Однако, несмотря на тот факт, что последние несколько десятилетий медицинское материаловедение активно развивалось, на данный момент не существует искусственного материала, который по своим свойствам мог бы конкурировать с естественными тканями организма.

Окончательный набор свойств покрытий зависит не только от выбора КФ материалов, используемых в качестве покрытий, но и от метода и условий их осаждения, наличия ионных замещений в составе покрытий [8]. При осаждении КФ покрытий следует учитывать такие их основные характеристики, как соотношение Са/Р, кристалличность, фазовый состав, растворимость, наличие ионных замещений и т.п. Чрезмерно быстрое растворение покрытия может привести к оголению металлической основы имплантата и тем самым способствовать развитию металлоза. В то же время выход ионов кальция и фосфат-ионов способствует осаждению карбонат-апатита на поверхности имплантата.

Образующийся слой может включать в себя эндогенные белки и является матриксом для адгезии и размножения клеток, образующих костную ткань. Осевшие клетки формируют внеклеточный матрикс и способствуют интеграции имплантата в костную ткань. Все вышеперечисленные процессы приводят к формированию новой костной ткани вокруг имплантата [9–11].

В качестве материала для формирования покрытий наиболее широкое распространение получили ГАП и  $\beta$ -ТКФ. ГАП характеризуется высокой биологической активностью и относительно низкой скоростью резорбции в телесных жидкостях, в то время как  $\beta$ -ТКФ, напротив, обладает высокой скоростью резорбции [12,13]. Помимо  $\beta$ -фазы трикальцийфосфата, в медицинском материаловедении применяется и  $\alpha$ -фаза [14], однако применимость  $\alpha$ -трикальцийфосфата ( $\alpha$ -ТКФ) в качестве покрытий ограничена его высокой растворимостью.

Дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД) является промежуточным продуктом как в процессе минерализации, так и при эрозии минеральной части кости, в частности зубов. ДКФД часто образуется при процессах патологических кальцификаций (зубные камни, кристаллурия, хондрокальциноз, мочевые камни и т.д.). В медицине ДКФД получил наибольшее распространение в качестве самоотверждающегося КФ материала, используемого для реминерализации зубов. Также он используется в качестве биоактивного покрытия на поверхности металлических имплантатов для повышения их коррозионной стойкости [15–17]. Однако при использовании данного материала в качестве биоактивного покрытия следует учитывать, что он является одним из наиболее растворимых материалов, используемых для этих целей [4].

Октакальций фосфат (ОКФ) также имеет большое биологическое значение. Данное соединение образуется на начальной фазе процесса минерализации костной ткани [18]. Исследования *in vivo* выявили его значительную роль в образовании апатитовых минералов [19]. В медицине данный материал тоже нашел применение в качестве КФ покрытий медицинских имплантатов [20–22]. ОКФ

ускоряет преобразование и регенерацию естественной кости, более интенсивно обеспечивая клетки остеобластов полезными элементами, такими как Са и Р [20]. Он сочетает в себе высокую биосовместимость и остеокондуктивность [21].

В настоящее время продолжается разработка новых КФ материалов для реконструктивной медицины. Примером таких материалов является дикальцийфосфат моногидрат (ДКФМ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Предполагается, что его слоистая природа и наличие воды в его структуре будут благоприятно воздействовать на остеоинтеграцию имплантата. Кроме того, он может играть важную роль в качестве промежуточного звена в процессе биоминерализации [23]. Однако для проверки этой гипотезы необходимо проведение биологических исследований.

Для осаждения покрытий, обладающих промежуточными свойствами различных КФ материалов, используются бифазные КФ (БКФ) материалы, представляющие собой смесь двух различных по составу и/или фазе кальций-фосфатов. Наиболее распространенными сочетаниями КФ материалов в составе бифазных кальций-фосфатов являются ГАП+ $\beta$ -ТКФ [24–26], ГАП+ $\alpha$ -ТКФ [27–29] и  $\alpha$ -ТКФ+ $\beta$ -ТКФ [30–32]. Экспериментальные результаты показали, что БКФ обладает более высокой способностью адсорбировать фибриноген, инсулин или коллаген I типа, чем чистый ГАП [33].

### 1.1.1. Гидроксиапатит

ГАП является наиболее распространенным КФ материалом, используемым в реконструктивной хирургии для восстановления дефектов структуры костной ткани. Его широкое использование обусловлено тем фактом, что ГАП отличается наименьшей растворимостью и наибольшей стабильностью в водной среде при сохранении высокой биологической активности по сравнению с другими КФ материалами [34]. К примеру, его растворимость в 30 раз ниже по сравнению с  $\alpha$ -ТКФ.

ГАП широко используется для лечения дефектов костей и пародонта [34,35], альвеолярного гребня [34,36] и используется при изготовлении стоматологических

материалов [34,37], имплантатов среднего уха [34,38], систем тканевой инженерии [34,39] и биоактивных покрытий на металлических костных имплантатах [34,40] ввиду его удовлетворительных механических свойств и состава, аналогичному минералам костей и зубов [34,41].

По химическому составу он представляет собой ортофосфат кальция с общей формулой  $A_{10}X_6Y_2$  [42], где А, Х и Y – это  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$  и  $OH^-$ , соответственно. Однако ГАП, являющийся основой минеральной части кости, содержит множество замещений. На месте Са могут находиться 1-3 валентные ионы металлов ( $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и др.), на месте  $PO_4^{3-}$  – 1-3 валентные анионы ( $CO_3^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $SiO_4^{4-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $VO_4^{3-}$ ), на месте  $OH^-$  – 1-2 валентные группы ( $F^-$ ,  $O^{2-}$ ,  $Cl^-$ ,  $CO_3^{2-}$ ). По своей кристаллической структуре ГАП может быть представлен моноклинной и гексагональной сингонией. ГАП, характеризующийся моноклинной сингонией ( $P2_1/b$ ), может быть получен только в лабораторных условиях и не встречается в составе человеческой кости, поскольку даже небольшая примесь ионов способна его дестабилизировать [43]. В минеральной части кости ГАП представлен гексагональной сингонией ( $P6_3/m$ ) и содержит замещения и примеси. Гексагональная кристаллическая решетка ГАП имеет следующие параметры:  $a, b = 9,424(4) \text{ \AA}$ ,  $c = 6.879(4) \text{ \AA}$  [44]. На рисунке 1.1 представлена ее структура.

В структуре элементарной ячейки атомы Са могут занимать две позиции: четыре атома Са(I) имеют тетравалентную координацию, шесть атомов Са(II) – гексавалентную. На рисунке 1.2 представлено расположение Са(I), Са(II),  $PO_4^{3-}$  и  $OH^-$  в кристаллической решетке с указанием длин связей.

Структура гексагональной кристаллической решетки ГАП позволяет производить различные катионные и анионные замещения. Широко известно, что наличие замещений в решетке ГАП оказывает существенное влияние на ее параметры, симметрию кристалла, морфологию материала, его кристалличность, растворимость, механические свойства, термическую стабильность,

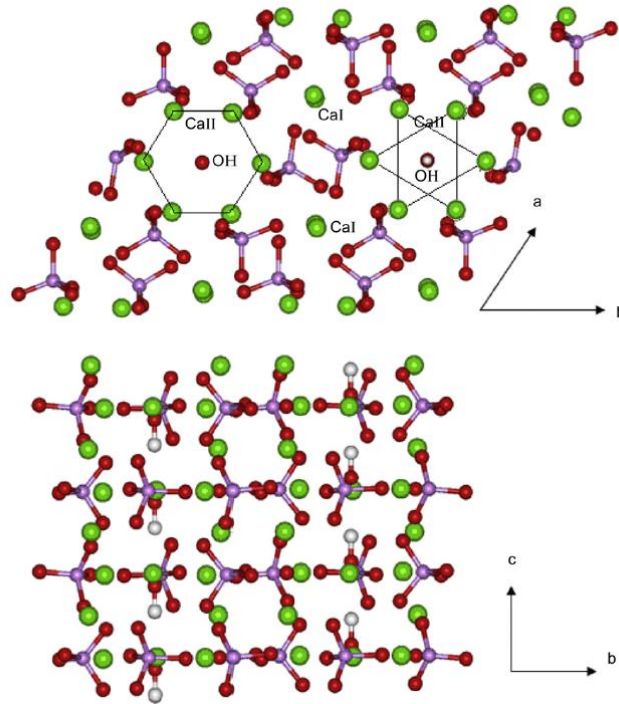


Рисунок 1.1 – Структура гексагональной кристаллической решетки гидроксиапатита, представленной перпендикулярно кристаллографическим осям  $c$  и  $a$ , с указанием групп  $\text{OH}$  (Ca – зеленый, O – красный, P – фиолетовый, H – белый) [45]

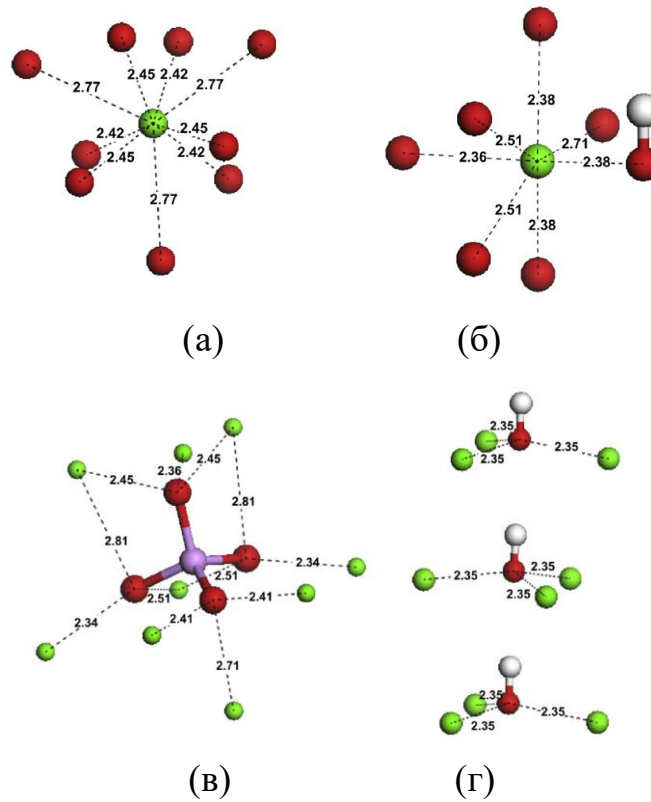


Рисунок 1.2 – Расположение (а)  $\text{Ca(I)}$ , (б)  $\text{Ca(II)}$ , (в)  $\text{PO}_4^{3-}$  и (г)  $\text{OH}$  в кристаллической решетке ГАП с указанием координатных расстояний (Å) вокруг каждого иона [46] (Ca – зеленый, O – красный, P – фиолетовый, H – белый) [45]

Биологические свойства ГАП *in vivo* и *in vitro* в немалой степени зависят от его физических характеристик. Несмотря на все разнообразие методов его получения, лишь немногие из них применяются для изготовления медицинских имплантатов. Основными ограничениями, с которыми сталкиваются производители, являются производительность и экономическая целесообразность. Помимо этого, необходимо брать во внимание материалы-предшественники, растворители или поверхностно-активные вещества, необходимые для синтеза, а также широкий гранулометрический состав, сложность и дороговизну процессов, крупную агломерацию и фазовые примеси, которые обычно встречаются в кристалле [34]. В настоящее время для получения синтетического нано- и микроразмерного ГАП используется биомиметический синтез, синтез из расплавленных солей, гидротермальная обработка и синтез ГАП с использованием матрицы. Производство синтетических керамических биоматериалов на основе ГАП можно классифицировать как:

- 1) влажный химический синтез (осаждение, гидротермический, гидролизный и золь-гель методы);
- 2) сухой химический синтез (твердофазные реакции, механохимический синтез);
- 3) высокотемпературные реакции (горение, метод распылительного пиролиза, термическое разложение);
- 4) из ресурсов биологического происхождения:
  - животные источники: крупный рогатый скот, овцы, свиньи, козы и т. д., кости и зубы;
  - Морские источники: рыба чешуя, кости, красные водоросли, кораллы, морские раковины, морские ежи и т.д.;
  - Растительные источники: листья папайи, цветы календулы, бамбук, кожура картофеля, апельсина, банана, виноград и т.д.

Размеры и форма наноструктур на основе ГАП напрямую зависят от методов их формирования, как показано в Таблице 1.1.



КФ материалы также нашли широкое применение в области контролируемой доставки лекарств. Контролируемая доставка лекарств (controlled drug delivery) подразумевает высвобождение лекарства с заданной скоростью в течение длительного периода времени в кровь или направлено в другие участки тела [59]. В отличие от традиционных пероральных и внутривенных методов доставки лекарств, где лекарство доставляется как в здоровые, так и в пораженные ткани, при контролируемой доставке лекарства его можно доставлять в высокой концентрации только в пораженные ткани. Традиционно для адресной доставки лекарств (антибиотики, вакцины, стероиды, гормоны, анальгетики и т.д.) используются полимерные системы, однако развитие технологии изготовления и обработки керамики сделали ее пригодной для эффективной доставки лекарств, решив многие сложные медицинские проблемы. При использовании КФ материалов в качестве носителя (скаффолда) возможна адресная доставка различных видов лекарств, включая антибиотики [49–51], противораковые агенты [52], факторы роста [53], белки/аминокислоты [54,55] и антимикробные пептиды [56,57]. ГАП нашел свое применение в адресной доставке лекарств в качестве скаффолда из-за своей высокой стабильности [58–60]. Подобные скаффолды обеспечивают медленное, контролируемое, локальное и продолжительное высвобождение лекарственного средства в пораженном участке. Наиболее привлекательными являются скаффолды из ГАП с высокой пористостью, контролируемым размером пор и подходящей твердостью. Использование наноструктурированного ГАП в скаффолдах обеспечивает большинство из этих преимуществ. Перспективным подходом для изготовления таких скаффолдов является использование наноструктурированного ГАП. Так, в работе [61] получены обнадеживающие результаты для инженерии костной ткани при тестировании на модели кролика скаффолда из наночастиц ГАП.

Таблица 1.1 – Наноструктуры ГАП разных размеров и форм, полученные с использованием различных методов синтеза [34]

Метод синтеза	Преимущества	Морфология и размеры
<b>Влажный химический синтез</b>		
Соосаждение	Самый простой и эффективный химический метод. Синтез при комнатной температуре. Размер частиц легко контролировать, регулируя pH и ионную силу реакционной среды. Наноструктуры широкого диапазона размеров и морфологии.	Нерегулярные, сферообразные, стержневидные, иглообразные, трубчатые, волокнистые, нитевидные, проволокообразные, усообразные, полосатые, тромбоцитовидные, цветкообразные. Диапазон размеров: от 3 нм до 1000 мкм.
Золь-гель синтез	Смешение реагентов на молекулярном уровне улучшает химическую однородность синтезированных чистых и гибридных наноструктур при низких температурах.	Нерегулярные, сферообразные, стержневидные, иглообразные, трубчатые, нитевидные, усообразные, тромбоцитовидные. Диапазон размеров: от 3 нм до 1000 мкм.
Гидротермальный синтез	Повышенная растворимость прекурсоров. Управляемая динамика роста.	Нерегулярные, сферообразные, стержневидные, иглообразные, трубчатые, волокнистые, проволокообразные, усообразные. Диапазон размеров: от 3 нм до 1000 мкм.
Микроэмульсии	Контроль размера частиц, ограниченная жесткая агломерация.	Нерегулярные, сферообразные, стержневидные, трубчатые, цветкообразные. Диапазон размеров: от 5 нм до 80 мкм.
Полиоол	Отсутствие агломераций, высокая температура кипения полиолов, используемых в качестве растворителя и восстановителя.	Нерегулярные, листообразные, хлопчатые, пластинчатые, усообразные, наностержневидные. Диапазон размеров: 5–80 мкм.
Сонохимический синтез	Могут быть получены монодисперсные наночастицы различной формы.	Нерегулярные, сферообразные, нитевидные, стержневидные, трубчатые. Диапазон размеров: 5 нм – 1000 мкм.
<b>Высокотемпературный синтез</b>		
Термическое разложение	Возможность контроля размера частиц, узкая вариация размеров и хорошая кристалличность.	Нерегулярные, плоские, пластинчатые, листообразные, бесформенные. Диапазон размеров: 5–200 мкм.
Пиролиз	Стержневидные наночастицы и однофазные с высокой кристалличностью и хорошей стехиометрией.	Наностержни микронной формы. Диапазон размеров: 10 нм – 1000 мкм.
Горение	Быстрая и одноэтапная процедура изготовления, высокая чистота порошков.	Сферообразные, овальные, шарообразные, неправильной сферической формы. Диапазон размеров: 5 нм – 200 мкм.
<b>Сухой синтез</b>		
Твердотельный	Хорошо кристаллизованная структура.	Нерегулярные, нитевидные, стержневидные, иглообразные, усообразные. Диапазон размеров: 5 нм – 1000 мкм.
Механохимический	Не требуется прокаливание.	Нерегулярные, сферообразные, стержневидные, иглообразные, усообразные. Диапазон размеров: 5–200 мкм.
<b>Синтез из биосисточников</b>		
Биологические источники (животные, растения и морские обитатели)	Экологически чистый подход к превращению биологических отходов в востребованное сырье для производства ГАП-керамики.	Можно получить разнообразную структуру. Различные формы включают шарообразные, неправильной формы, гребешковидные, пластинчатые, стержневидные, трубчатые и т.д. Диапазон размеров: от 10 нм до 2000 мкм.

Разработка материалов на основе наноструктурированного ГАП, таких как наночастицы, нано-/микроволокна, открыла возможность изготовления каркасов с контролируемым размером и объемом пор [62]. Использование биополимеров (например, поликапролактона) при изготовлении композитных ГАП каркасов также оказалось эффективным способом для контроля размера открытых пор и скорости высвобождения лекарственного средства [63]. Включение полимерной добавки в скаффолд из ГАП в виде композиционного материала или просто покрытия не только улучшает их механические свойства (прочность на сжатие и модуль упругости), но и увеличивает процент удерживания лекарственного средства, предотвращая начальное “взрывное” высвобождение в водные биологические среды. В частности, использование биodeградируемых микросфер из полилактид-ко-гликолида (PLGA) с загруженным в них дексаметазоном (DEX) с последующей их ионной иммобилизацией на поверхность скаффолда из ГАП значительно снижает скорость высвобождения DEX на начальной стадии регенерации [64]. Данный композиционный материал продемонстрировал большой объем и лучшее качество сформировавшейся костной ткани в области дефекта в тестах *in vivo*.

Отдельно следует упомянуть ГАП покрытия, наносимые на поверхность металлических покрытий. Несмотря на тот факт, что исследования в данном направлении ведутся уже достаточно давно, они по-прежнему сохраняют свою актуальность. Для нанесения ГАП на поверхность металлов в настоящее время используются следующие способы: плазменное напыление [65–67], золь-гель технологию [68–70], электрохимическое [71–73], электрофоретическое [74–76], биомиметическое [77–79] осаждение, микродуговое оксидирование [80–82], высокочастотное магнетронное распыление [83–85], а также имеют место и другие способы. Многообразие способов осаждения ГАП покрытий обеспечивает возможность формировать покрытия с широким диапазоном свойств (толщина, морфология, соотношение Са/Р, кристалличность, смачиваемость, растворимость и т.п.) на поверхности различных материалов, что полностью укладывается в

логику наметившейся в научном сообществе тенденции к развитию персонализированной медицины. Учет индивидуальных особенностей организма пациента и его травм позволяет повысить качество и сократить время реабилитации пациента, однако для этого требуются современные персонифицированные материалы биомедицинского назначения. Исследования последних лет сосредоточены на изучении ГАП покрытий, содержащих ионные замещения [86–88], лекарственные препараты [89–91]; создании композиционных покрытий комбинированием различных материалов [92–94] и методов их нанесения [95,96] для повышения биологической активности [97–99]; коррозионной стойкости [100–102]; придания антибактериальных свойств [103–105] и/или повышения стабильности покрытия [106–108] в организме пациента.

### 1.1.2. $\beta$ -трикальцийфосфат

Трикальцийфосфат, как и гидроксиапатит, является одним из основных компонентов человеческой кости. По своей структуре трикальцийфосфат делится на  $\alpha$ -трикальцийфосфат и  $\beta$ -трикальцийфосфат в зависимости от фазы.  $\alpha$ -трикальцийфосфат характеризуется моноклинной сингонией [109], в то время как  $\beta$ -трикальцийфосфат может быть описан гексагональной или ромбоэдрической элементарной ячейкой [110]. Обе фазы трикальцийфосфата отличаются высокой растворимостью в жидких средах по сравнению с ГАП [9]. В свою очередь,  $\alpha$ -трикальцийфосфат характеризуется еще большей растворимостью по сравнению с  $\beta$ -трикальцийфосфатом, что обуславливает его более редкое использование в реконструктивной хирургии [109]. Для описания  $\beta$ -трикальцийфосфата используют гексагональную решетку с 273 атомами или ромбоэдрическую с 91 атомом. Изображение ромбоэдрической решетки представлено на рисунке 1.3. Ее размеры характеризуются следующими параметрами:  $a, b = 10,435 \text{ \AA}$ ,  $c = 37,403 \text{ \AA}$ .

$\beta$ -ТКФ также, как и ГАП, нашел широкое применение в медицинском материаловедении. Постепенная резорбция имплантата из  $\beta$ -ТКФ происходит за счет вымывания материала телесными жидкостями человека и под воздействием

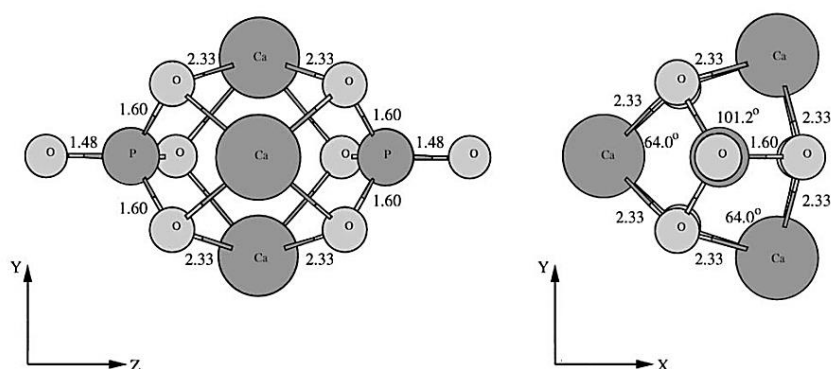


Рисунок 1.3 – Равновесные межатомные расстояния (Å) и углы связи (градусы) полностью релаксированного фрагмента  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Фрагмент представлен в двух проекциях [111]

остеокластов одновременно с образованием новой костной ткани. В литературном обзоре [112] описывается клиническая практика замещения дефектов костной ткани имплантатами из  $\beta$ -ТКФ. С 1989 по 2004 год авторы использовали имплантаты с пористостью порядка 75%, с 2005 года – с пористостью порядка 75% и 60%. Возрастной диапазон пациентов – от 2 лет до 91 года. В нескольких случаях  $\beta$ -ТКФ помещали на надкостницу после извлечения малоберцовой кости. Резорбция имплантатов начинала происходить с периферии, а затем с течением времени продолжалась в направлении центра. Полное или почти полное заживление кости в большинстве случаев достигалось в течение нескольких лет и зависело от количества имплантированного материала, возраста пациента и типа кости (кортикальная или губчатая). В частности, у молодых пациентов (2- и 3-летние мальчики) наблюдалась более сильная резорбция имплантируемого материала. У возрастных пациентов, чьи травмы были сопряжены с остеопорозом, также наблюдалась повышенная резорбция  $\beta$ -ТКФ. Скорость резорбции  $\beta$ -ТКФ и образования новой костной ткани была выше в случае дефектов губчатой кости, чем в случаях дефектов кортикальной кости. Это различие в резорбции может быть связано с различиями в кровотоке между губчатой и кортикальной костью. Таким образом, недостаточно заполнить дефекты кортикальной кости одним  $\beta$ -ТКФ. Для их восстановления необходима дополнительная стимуляция, например использование факторов роста и ультразвукового воздействия. Согласно более

раннему исследованию [113], проведенному тем же коллективом, комплекс гранул  $\beta$ -ТКФ и коллагена с добавлением 200 г фактора роста фибробластов-2 (FGF-2) способствовал регенерации кортикальной кости и устранял ее дефекты размером 5 мм в голнях кролика через 12 недель после имплантации. На основе результатов исследований авторы предложили использовать подобную методику для восстановления нестабильных межвертельных переломов у пожилых пациентов [114]. В данной работе продемонстрировано, что комплекс, представляющий собой пастообразный материал на основе гранул  $\beta$ -ТКФ, гиалуроната и FGF-2, может быть полезен также для лечения дефектов кортикальной кости, таких как переломы длинных костей со смещенными фрагментами, с минимальным хирургическим вмешательством. Гранулы  $\beta$ -ТКФ полностью замещались костной тканью, и во всех случаях наблюдалось заметное образование новой кости вокруг малого вертела.

$\beta$ -ТКФ покрытия стимулируют активную пролиферацию человеческих [115,116], мышинных [117] и крысиных [118] остеобластов, а также стромальных клеток костного мозга [119–121]. Клетки-предшественники остеобластов также демонстрируют хорошую биоминерализацию и клеточную адгезию к  $\beta$ -ТКФ покрытиям [122]. Возможно насыщение  $\beta$ -ТКФ антибиотиками для предотвращения костных инфекций [123]. *In vivo* исследования восстановления дефектов крысиного черепа [124] и костей голени коз [125,126] в присутствии  $\beta$ -ТКФ показали эффективную регенерацию костной ткани.

Как и в случае с ГАП, окончательный набор свойств  $\beta$ -ТКФ покрытия зависит от способа его нанесения, наличия ионных замещений и/или лекарственных препаратов, типа подложки и т.п.

## **1.2. Формирование кальций-фосфатных покрытий методом высокочастотного магнетронного распыления**

Существует множество способов формирования КФ покрытий на поверхности металлических имплантатов: плазменное напыление; золь-гель метод;

электрохимическое, электрофорезное, биомиметическое осаждение; микродуговое окисление; высокочастотное магнетронное распыление и др. [127–129].

Высокая адгезионная прочность является одним из основных требований, предъявляемых к покрытиям металлических имплантатов, используемых для реконструкции костной ткани. Метод высокочастотного магнетронного распыления (ВЧМР) позволяет формировать однородные покрытия на поверхности изделий сложной формы с высокой адгезией и равномерностью толщины и состава [130]. Контроль химического состава осажденных покрытий осуществляется варьированием химического состава распыляемой мишени, атмосферы в камере, параметров разряда [131]. Также он позволяет формировать покрытия на поверхности металлических, керамических, полимерных подложек [132–134]. Однако существенным ограничением этого метода является низкая скорость формирования покрытий, что снижает его эффективность. Решением данной проблемы является подбор оптимального состава распыляемой мишени, рабочего газа и параметров распыления.

### **1.2.1. Влияние ионных замещений в структуре распыляемой мишени на скорость осаждения и свойства биосовместимых кальций-фосфатных покрытий, сформированных методом ВЧМР**

С целью улучшения физико-химических свойств, биологической активности и совместимости покрытий, осаждаемых на поверхности медицинских имплантатов, используются мишени, содержащие различные катионные и/или анионные замещения [135,136]. Одними из наиболее распространенных замещений в структуре КФ материалов являются замена группы  $\text{OH}^-$  на группу  $\text{CO}_3^{2-}$  (замещение А-типа), группы  $\text{PO}_4^{3-}$  на  $\text{CO}_3^{2-}$  (замещение В-типа), а также группы  $\text{OH}^-$  на  $\text{Cl}^-$  или  $\text{F}^-$  [136]. Известно, что наличие кремниевых замещений в структуре ГАП увеличивает биологическую активность материала и клеточную активность [137–139]. Кроме того, широко распространена замена ионов кальция на магний, стронций, цинк или марганец [127,128,140,141]. Добавление  $\text{CO}_3^{2-}$  в структуру ГАП

увеличивает растворимость и тем самым сдерживает рост кристалла, в то время как наличие фтора оказывает обратный эффект [140]. Таким образом, подбирая тип ионных замещений и их концентрацию, можно регулировать свойства покрытия для улучшения остеоинтеграции имплантата. Известно, что наличие ионов фтора, цинка, магния, стронция, алюминия, карбонатов и др. в структуре ГАП оказывает положительное влияние на клеточную активность [142–146]. В то же время следует учитывать, что ионные замещения способны оказывать разное влияние на различные КФ материалы [136].

Использование ионов Zn, Ag и Cu для модифицирования КФ керамики медицинского назначения нашло широкое распространение ввиду их ярко выраженных антибактериальных свойств. Помимо наличия антибактериальных свойств, Zn может изменять химический состав костей и способствует усилению минерализации костей и биологической кальцификации [147]. Человеческие кости содержат приблизительно 28% всего цинка в организме [148]. Материалы, содержащие цинк, могут ускорять заживление ран за счет снижения вероятности бактериальной инфекции [149]. Благодаря легкости внедрения Zn в структуру ГАП и присущим ему антибактериальным свойствам, Zn-замещенный ГАП может использоваться не только как перспективный материал для лечения перипротезных инфекций, которые возникают после имплантации имплантатов на основе ГАП, но и как материал для имплантатов с повышенными биологическими свойствами [143,150]. Однако для обеспечения цитосовместимости имплантата выход Zn *in vivo* должен быть в безопасных пределах [151]. Согласно Национальному институту здоровья США, рекомендуемый предел потребления цинка составляет 8 мг в день и 11 мг в день для женщин и мужчин соответственно. Превышение содержания Zn в организме человека может способствовать возникновению его токсичности, поэтому выход  $Zn^{+2}$  из Zn-замещенных ГАП имплантатов должен быть ниже этого предела безопасности.

В работе [152] проведено исследование антибактериальных свойств Ag-замещенного ГАП. Было установлено, что наличие Ag в структуре ГАП не снижает



его биологическую активность. Исследования антибактериальных свойств показали, что все образцы гидроксиапатита, замещенного серебром, обладают способностью подавлять бактерии, и антибактериальная активность значительно возрастает с увеличением концентрации  $Ag^+$ . Образец из чистого ГАП имел ограниченную антибактериальную активность против бактерии *Staphylococcus aureus*, в то время как добавление  $Ag^+$  усиливало антибактериальную активность. На основании вышеуказанного исследования можно предположить, что гидроксиапатит, замещенный серебром, обладает антибактериальной активностью и является потенциально востребованным биоматериалом для инженерии костной ткани, который может ограничить риск послеоперационных инфекций, вызванных распространением бактерий.

Использование  $Cu$  в качестве ионного замещения КФ материалов обусловлено не только его антибактериальными свойствами, но и повышением активности нескольких ферментов и сшиванием поперечного коллагена и эластина костей [153]. Также он присутствует в естественной кости млекопитающих [29]. Данный элемент демонстрирует высокую антибактериальную способность за счет сохранения низкой цитотоксичности [29]. Однако при превышении определенного порога концентрации  $Cu$  в некоторой степени начинает проявлять токсичные свойства по отношению к клеткам человека [154]. В то же время известно, что совместное замещение ГАП цинком и медью может смягчить негативное воздействие  $Cu$  и повысить жизнеспособность клеток [155].

Среди прочих ионных замещений следует отдельно выделить магний. Он содержится в элементном составе человеческой эмали, дентина и костей в диапазоне концентраций 0,4-1,2 мас.% [135]. На начальной стадии остеогенеза наблюдается увеличение его концентрации, которая постепенно снижается в процессе кальцификации [135,136,140]. Его биологическая роль заключается в регулировании метаболической активности кости воздействием на остеобласты и остеокласты. Недостаток магния в организме вызывает нарушение остеогенеза и делает кость хрупкой [156].

Магний способен легко встраиваться в структуру кристаллической решетки различных КФ материалов. Доказано, что магний оказывает влияние на размер кристаллитов и степень кристалличности ГАП [156,157]. Известно, что место Ca(I) наиболее энергетически выгодное для внедрения данного элемента в структуру кристаллической решетки ГАП [158–160].

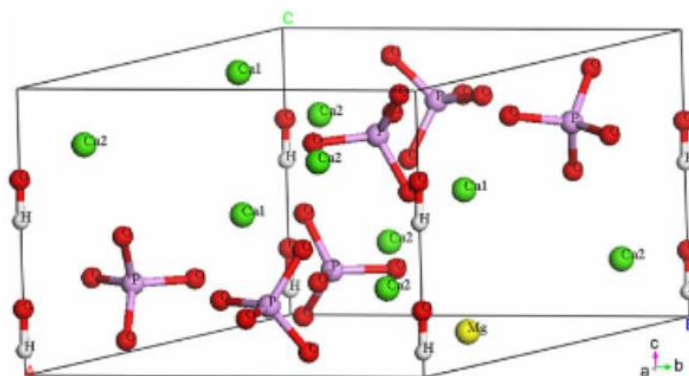


Рисунок 1.4 – Компьютерная модель структуры стабильной Mg-замещенной элементарной ячейки ГАП (Ca – зеленый, P – фиолетовый, O – красный, H – белый, Mg – желтый) [158]

Наиболее энергетически выгодное положение Mg замещений в структуре ГАП было определено с помощью компьютерного моделирования [158]. Производилось сравнение разницы энергии ( $\Delta E = E_{Mg(I)HA} - E_{Mg(II)HA}$ ) при внедрении замещений кальция магнием (Mg замещений, магниевых замещений) в места Ca(I) и Ca(II). При внедрении 5% магниевых замещений в структуру решетки ГАП  $\Delta E$  равнялось -0,012 эВ, что свидетельствует в пользу Ca(I). При внедрении 10% замещений  $\Delta E$  составляет -0,077 эВ, что делает место Ca(I) еще более энергетически выгодным [158]. Однако в работе [45] авторы задаются вопросом, занимают ли Mg замещения одну или обе кристаллографические позиции кальция. Среди основных трудностей однозначного ответа на данный вопрос авторы отмечают отсутствие спектроскопических данных с высоким разрешением в нужном диапазоне составов и потерю кристалличности ГАП при превышении содержания Mg замещений ~ 20% порога. Соответственно, расчеты Ритвельда, основанные на рентгенограммах порошков, не могут являться окончательными для Mg-ГАП. Авторы предположили, что Mg замещения могут занимать как

положение Ca(I), так и Ca(II). В ходе исследования ГАП с 10% Mg замещений методами твердотельного ядерного магнитного резонанса в сильном магнитном поле и рентгеновской абсорбционной спектроскопии было однозначно установлено, что Mg занимает место Ca(II). Возможным объяснением расхождения результатов с другими работами является разница в процедуре синтеза ГАП, которая может оказать влияние на место внедрения Mg замещений, а также возможное низкое качество рентгенограмм, используемых в расчетах Ритвельда.

Внедрение Mg в структуру ГАП оказывает существенное влияние на размер кристаллов, а также на степень кристалличности КФ покрытий [156,157]. Интересно отметить, что магний способен внедряться в структуру решетки даже при высокой его концентрации, но его распределение неравномерно. Культивация остеобластов на поверхности ГАП покрытий показала, что клетки концентрируются преимущественно в местах с высоким содержанием магния [156], что свидетельствует о повышении биологической активности покрытий при наличии этого замещения. *In vivo* исследования на кроликах показали, что внедрение магния в структуру ГАП повышает биологическую совместимость костных имплантатов [161].

Как и в случае с ГАП, магниевые замещения оказывают существенное влияние на кристаллическую решетку  $\beta$ -ТКФ. Магний встраивается в решетку, уменьшая ее параметры и объем, повышает стабильность и снижает растворимость материала [111,162–164]. Искажение кристаллической решетки при внедрении в нее от одного до трех атомов магния отражено на рисунке 1.6.

При внедрении атома магния в решетку  $\beta$ -ТКФ он сначала замещает кальций на месте Ca(5), потом на месте Ca(4) [165].

Решетка  $\beta$ -ТКФ способна вместить до 14 мол.% магниевых замещений [165]. При внедрении магния в структуру  $\beta$ -ТКФ параметр решетки  $a$  линейно снижается до достижения 14 мол.% замещений. Параметр  $c$  линейно убывает до 9 мол.%, однако с 9 до 14 мол.% наблюдается рост данного параметра.

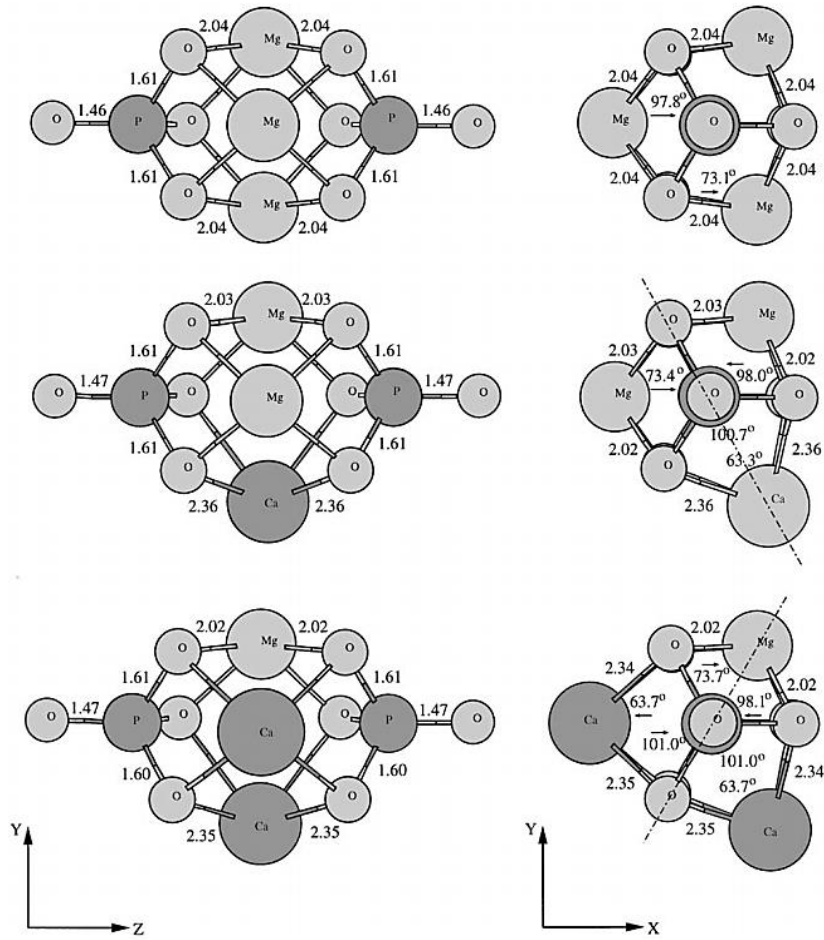


Рисунок 1.6 – Равновесные межатомные расстояния (Å) и углы связи (градусы) полностью релаксированных решеток с Mg замещениями ( $Mg_xCa_{3-x}(PO_4)_2$ ). Каждая решетка представлена в двух разных проекциях [111]

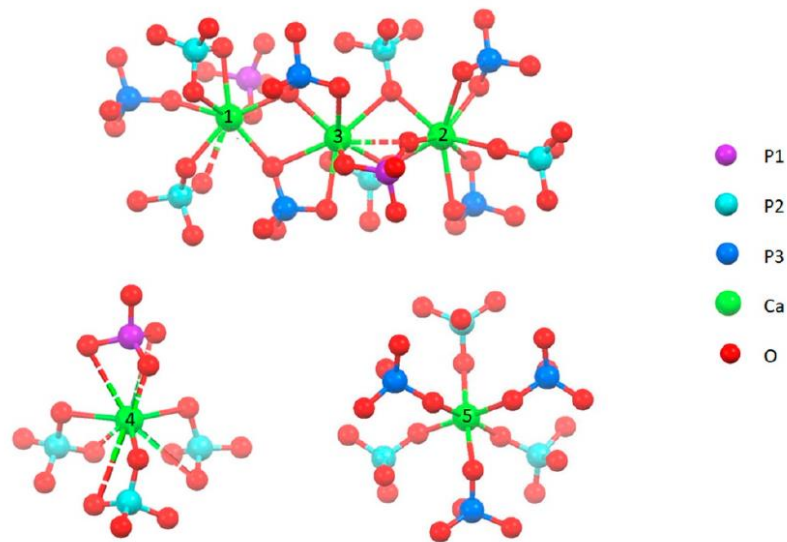


Рисунок 1.7 – Координационная геометрия пяти различных положений Ca в  $\beta$ -ТКФ решетке [166,167]. Связи длиной  $3,0 \pm 0,1$  Å – пунктирные

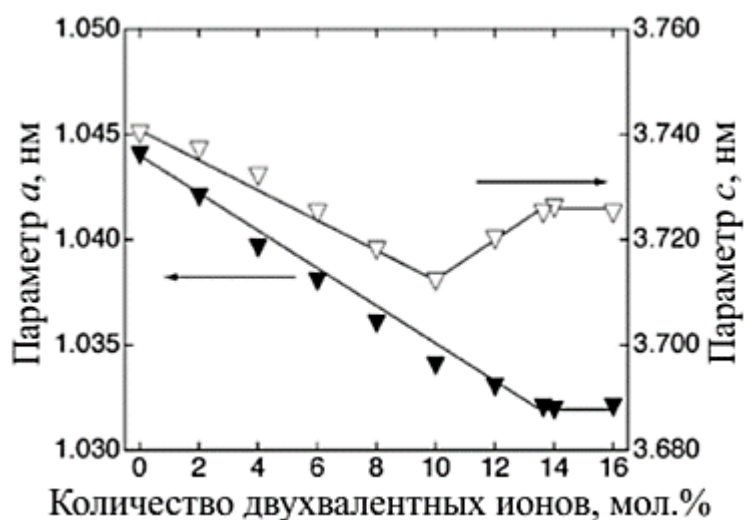


Рисунок 1.8 – Зависимость параметров  $a$  и  $c$  в кристаллической решетке  $\beta$ -ТКФ от количества магниевых замещений в ее структуре [165]

Известно, что Mg- и Si-созамещенные  $\beta$ -ТКФ покрытия способствуют клеточной адгезии и пролиферации человеческих остеобластов, образующий монослой с нормальной морфологией [168]. Выходящие из покрытия ионы нетоксичны. *In vitro* исследование влияния выходящих в телесную жидкость ионов Mg и Si показало увеличение клеточной активности.

Также среди прочих ионных замещений следует отдельно выделить стронций. В зависимости от типа рассматриваемой ткани человеческого организма, стронций может содержаться в концентрации 0,03-0,05 мас.%, и его концентрация особенно велика в областях с высоким метаболическим оборотом [169,170]. Биологическая роль стронция в организме заключается в повышении активности остеобластов и ингибировании остеокластов. Он воздействует на чувствительные к кальцию рецепторы остеобластов, тем самым увеличивая деление клеток за счет воздействия митогенными сигналами на протеиновые c/d киназы [127,128]. Лабораторные исследования показали, что наличие стронция в структуре ГАП покрытий снижает пролиферацию остеокластов [136,141]. Стронций препятствует резорбции костной ткани, стимулирует остеогенез и регенерацию кости за счет стимулирования синтеза коллагеновых и неколлагеновых протеинов [137,138]. Стронций увеличивает механическую прочность костной ткани и снижает количество переломов [171,172]. Кроме того, внедрение стронциевых замещений в

структуру КФ покрытий нашло широкое распространение в борьбе с остеопорозом [128,136,140].

Влияние стронция на кристаллическую структуру материала, а следовательно, на его свойства, зависит от концентрации. Согласно [173–175], при наличии малого количества стронциевых замещений (менее 0,5 ат.%) в структуре ГАП наблюдается снижение его кристалличности. Однако увеличение содержания стронция приводит к увеличению кристалличности и размеров кристаллитов [173]. При этом наблюдается увеличение беспорядка в решетке, сопровождаемое потерей группы ОН [176]. Дестабилизирующий эффект стронция на кристаллическую решетку подтверждается увеличением растворимости стронций-замещенного ГАП при увеличении содержания стронция [177].

Замещения кальция стронцием (Sr замещения, стронциевые замещения) в структуре ГАП занимают места Ca(I) и Ca(II) (Рисунок 1.5). При малых концентрациях Sr стремится занять место Ca(II) в решетке [173], однако при высоком его содержании он занимает место Ca(I) [178]. Этот факт приписывается оптимизации взаимодействия металл–кислород [173]: место Ca(I) позволяет внедрение более крупного катиона ввиду более длинных средних расстояний между металлом и кислородом, однако, когда количество более крупных ионов увеличивается, нарастающее отталкивание между атомами в позиции Ca(I) может вызвать расширение оси *c*, которое частично сдерживается размещением атомов Sr в позиции Ca(II).

При внедрении стронция в структуру β-ТКФ он занимает положение Ca(4) [167]. Это обусловлено тем фактом, что большие длины связей Ca(4) позволяют вместить ион большего диаметра. Стронций способен внедряться в структуру β-ТКФ до 80 мол.% без фазовых переходов, вызывая линейное увеличение параметров кристаллической решетки (Рисунок 1.9) [167].

По своему влиянию на структуру β-ТКФ стронций оказывает противоположное магнию влияние. Магний увеличивает плотность материала, стронций – уменьшает [164]. Эти замещения также оказывают противоположное

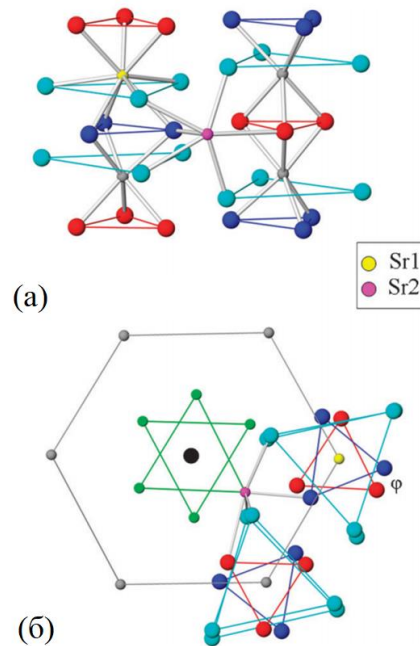


Рисунок 1.5 – Схематическое изображение решетки ГАП при наличии стронциевых замещений в Ca(I) и Ca(II) одновременно (серый – Ca(I), зеленый – Ca(II), красный – O(I), синий – O(II), бирюзовый – O(III), желтый – Sr(I), розовый – Sr(II), черный – OH, фосфор не указан): (а) вид сверху, (б) вид сбоку [176]

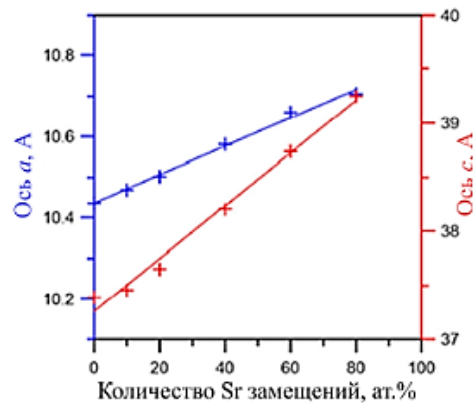


Рисунок 1.9 – Зависимость параметров решетки  $\beta$ -ТКФ от количества стронциевых замещений в ее структуре [167]

влияние на размер кристаллов: магний уменьшает их размер, стронций – увеличивает [164]. Это объясняется тем, что магний предотвращает переход  $\beta \rightarrow \alpha$ -ТКФ, стронций, напротив, способствует ему.

В работе [179] Ozeki и др. проводили распыление различных КФ материалов: тетракальцийфосфат (ТТКФ), ГАП,  $\beta$ -ТКФ,  $\beta$ -пирофосфат кальция ( $\beta$ -ПФК),  $\beta$ -метафосфат кальция ( $\beta$ -МФК). Авторы пришли к выводу, что скорость осаждения покрытий зависит от плотности материала и его растворимости.

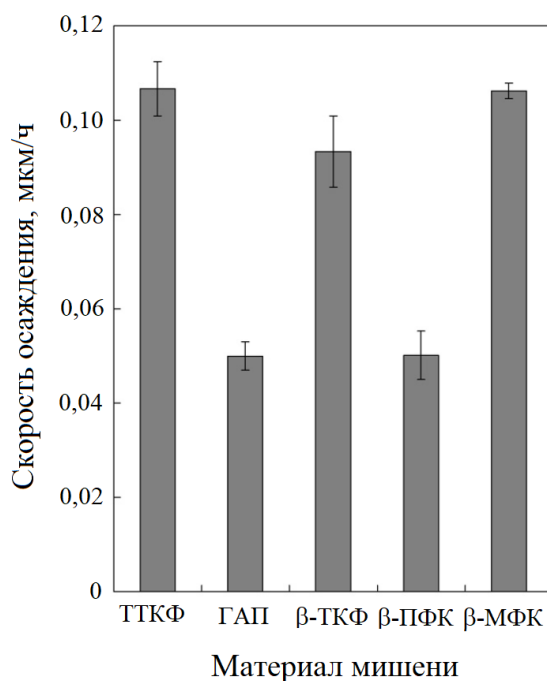


Рисунок 1.10 – Скорости формирования покрытий, полученных распылением различных КФ мишеней при одинаковых условиях [179]

Как следует из Рисунка 1.10, скорости осаждения покрытий расположились в следующем порядке: ТТКФ  $\approx$   $\beta$ -МФК >  $\beta$ -ТКФ >  $\beta$ -ПФК  $\approx$  ГАП. Растворимости данных материалов расположились в том же порядке: ТТКФ  $\approx$   $\beta$ -МФК >  $\beta$ -ТКФ >  $\beta$ -ПФК > ГАП. Авторы объясняют эту зависимость разницей в энергии связи исследуемых материалов. Согласно теории Зигмунда, коэффициент распыления  $Y$  описывается следующим уравнением [180]:

$$Y = \frac{0,042\alpha S_n}{U_0}, \quad (1.1)$$

где  $S_n$  – ядерная тормозная способность ионов в мишени,  $\alpha$  – это константа, связанная с атомной массой налетающей частицы и атомной массой распыляемой мишени,  $U_0$  – энергия связи поверхности. Из уравнения следует, что уменьшение энергии связи поверхности приведет к увеличению коэффициента распыления. Растворимость материала также имеет обратную зависимость от энергии связи его поверхности, чем и объясняется сходство закономерностей скорости осаждения покрытий и растворимости.

Наличие ионных замещений в структуре кристаллической решетки КФ мишени также оказывает влияние на скорость осаждения покрытий, воздействуя на кристалличность, растворимость и фазовый состав мишеней. В работе [127]



тремя ВЧ магнетронами проводилось сораспыление различных комбинаций мишеней из чистого ГАП и ГАП с 13 ат.% стронциевых замещений. Было установлено, что по мере увеличения количества замещенных мишеней в системе наблюдается снижение скорости распыления. Авторы объясняют данное явление тем, что Sr обладает большей атомной массой по сравнению с Ca. Масса Ca ближе к массе Ar, поэтому мишень из чистого ГАП распыляется лучше. В то же время в работе [181] утверждается, что при увеличении содержания апатита стронция в смешанной мишени из ГАП и апатита стронция наблюдается повышение скорости формирования покрытий за счет повышения растворимости материала.

Таким образом, все вышеописанное подтверждает тот факт, что ионные замещения в структуре распыляемой мишени оказывают существенное влияние на скорость осаждения покрытий при использовании метода ВЧМР.

### **1.2.2. Влияние рабочего газа на скорость осаждения и свойства КФ покрытий, сформированных методом ВЧМР**

Выбор рабочего газа оказывает существенное влияние на коэффициент распыления мишени, сечение ионизации электронным ударом, энергию ионизации рабочего газа, энергию метастабильных возбуждений, а также на имплантацию частиц и внедрение рабочего газа в осаждаемые пленки в процессе осаждения. Все вышеотмеченное влияет на свойства и скорость нанесения этих PVD-покрытий [182–185]. Из-за своей невысокой себестоимости и оптимальных физических свойств наиболее распространенным рабочим газом для осаждения КФ покрытий является аргон [186]. Помимо распыления КФ покрытий в чистом аргоне, существуют примеры использования данного газа в смеси с реактивным газом, в частности, для внедрения ионных замещений в структуру формируемых покрытий. Например, использование газовой смеси аргона и углекислого газа для высокочастотного магнетронного распыления гидроксиапатита привело к внедрению замещений  $\text{CO}_3^{2-}$  в структуру осаждаемых покрытий [187]. Исследование подтвердило внедрение карбоксильной группы на место  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Покрyтия, содержащие в своем составе замещения, характеризуются лучшими остеогенными свойствами.

В работе [188] показано, что высокочастотное магнетронное распыление ГАП в атмосфере  $\text{Ar}+\text{H}_2\text{O}$  характеризуется меньшей скоростью осаждения покрытий по сравнению с распылением в чистом  $\text{Ar}$ . Это объясняется образованием таких радикалов, как  $\text{O}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}^{2+}$ ,  $\text{O}^+$  и  $\text{OH}^+$ , при столкновении частиц воды с электронами. Взаимодействие этих частиц с поверхностью мишени приводит к ее отравлению. На ней образуется слой материала с низким коэффициентом распыления, формирование которого объясняется преимущественным распылением, ионной имплантацией и хемосорбцией. В работе [189] доказано, что ГАП активно взаимодействует с водой. Ионы  $\text{Ca}$  замещаются ионами  $\text{H}$  при контакте с водой, что приводит к снижению соотношения  $\text{Ca}/\text{P}$ . Другой причиной, снижающей скорость осаждения покрытий, является изменение импеданса плазмы. Частицы в плазме подвергаются упругим и неупругим столкновениям, которые приводят к их распаду или возбуждению. Столкновения с водой чаще бывают неупругими по сравнению с аргоном ввиду того, что вода представляет собой молекулу. Из этого следует, что при наличии паров воды в камере эффективная ионизация будет ниже по сравнению с процессом, проводимым в чистом аргоне [190]. Это явление вызывает увеличение напряжения смещения и, как следствие, снижение ионного тока, направленного в сторону мишени, и снижение скорости распыления.

Кроме того, снижение скорости распыления при добавлении реактивного рабочего газа можно объяснить явлением перераспыления осажденного покрытия. Известно, что значения энергии положительно заряженных ионов, участвующих в распылении твердотельной мишени, не превышают 25 эВ [188,191,192]. При этом в диапазоне энергий до 1 кэВ коэффициент распыления атомов из твердой мишени находится в линейной зависимости от энергии бомбардирующих частиц. Пороговая энергия распыления ( $E_{th}$ ) характеризует энергию, которую необходимо приложить к частице для ее распыления. Она рассчитывается по полуэмпирической

формуле, описанной в работе [193]. Если принять энергию связи Са и Р в решетке ГАП как 4 эВ, то пороговая энергия их выхода составляет 23 и 27 эВ, соответственно [188]. Следовательно, вклад положительных ионов в перераспыление мишени незначителен. Нейтральные частицы с высокой мощностью, бомбардирующие поверхность покрытия, могут возникнуть в результате распыления поверхности мишени. Однако, принимая во внимание, что масса распыленных частиц меньше или равна массе частицы рабочего газа, вероятность того, что распыленная частица приобретет высокую энергию и не потеряет ее при движении к покрытию за счет рассеивания на частицах рабочего газа, стремится к нулю. Следовательно, в процессе перераспыления принимают участие в основном отрицательно заряженные ионы. Они выбиваются с поверхности распыляемой мишени, ускоряются в темном пространстве катода и движутся в перпендикулярном мишени направлении к поверхности подложки [188,194–196]. При распылении ГАП данными ионами являются ( $O^-$ ). В случае его реактивного магнетронного распыления в смеси аргона и кислородсодержащего газа реактивный газ является дополнительным источником  $O^-$ , что приводит к увеличению явления перераспыления.

В работе [197] также утверждается, что при распылении мишеней на основе ГАП в газовой смеси  $Ag+O_2$  наблюдается снижение скорости осаждения покрытий по сравнению с распылением в чистом  $Ag$ , что подтверждает сделанные предположения о влиянии кислорода на скорость формирования покрытий в работе [188], где проводилось распыление ГАП в  $Ag+H_2O$ . Также установлено, что при увеличении содержания кислорода в газовой смеси  $Ag+O_2$  наблюдается уменьшение соотношения Са/Р в осажденных покрытиях по сравнению с теми покрытиями, которые были осаждены в чистом  $Ag$ . Данное явление объясняется тем фактом, что фосфор при осаждении ГАП покрытия лучше встраивается в его структуру в соединении  $PO_4$  [197]. В процессе распыления ГАП мишени кислород, высвобождаемый из нее, частично откачивается из камеры и, таким образом, возникает его дефицит в покрытии по сравнению с распыляемой мишенью [197].

Другим вероятным объяснением дефицита кислорода в покрытии является преимущественное перераспыление данного элемента [197].

Несмотря на очевидность влияния выбора рабочего газа на свойства и скорость осаждения КФ покрытий, анализ литературных источников не выявил наличие публикаций, посвященных исследованию влияния инертных рабочих газов помимо аргона на свойства данного рода покрытий. Однако влияние выбора инертного рабочего газа на свойства и скорость осаждения покрытий, используемых в других отраслях, в частности в микроэлектронике, подробно изучено.

В работе [198] проводилось исследование покрытий из нитрида ванадия, осажденных методом реактивного магнетронного распыления. Соотношение азота в камере осаждения варьировалось от 10 до 20%. Авторы пришли к выводу, что соотношение азота в атмосфере смеси  $N_2/Ar$  влияет на кристалличность пленки. При 20% содержании азота в камере осажденные пленки характеризуются большой толщиной, высокой плотностью структуры, гладкой поверхностью и преобладающей кристаллической плоскостью (111). Как следствие, они характеризовались улучшенными трибологическими свойствами. Авторы [199] утверждают, что магнетронное распыление в атмосфере  $He/Ar$  является эффективным, безопасным и экономичным методом, позволяющим вводить атомы  $He$  в растущие пленки  $W$ . Концентрацию гелия в покрытиях можно контролировать, регулируя соотношение  $He/Ar$ . Результаты, представленные в этой работе, помогают объяснить влияние  $He$  на микроструктуру и нанотвердость пленок  $W$ , поведение десорбции и распределение пузырьков  $He$  в пленке  $W$ . В частности, было показано, что твердость пленок  $W$  увеличивается с увеличением отношения  $He/Ar$ , что позволяет предположить, что наноразмерные пузырьки  $He$  могут упрочнять пленки  $W$ . В работе [200] пленки нитрида углерода были синтезированы с помощью ионизированной системы магнетронного распыления при различных парциальных давлениях азота в смесях с гелием, неоном, аргоном или криптоном с индукционной плазмой и без нее. Сообщается, что стабильный

разряд был получен только в смесях гелия/азота при давлении выше 8 Па. Скорость осаждения пленки увеличивалась с увеличением содержания азота в смесях неона, аргона или криптона как с индукционной плазмой, так и без нее. Авторы предположили, что доля  $sp$ - и  $sp^2$ -гибридизированного углерода, связанного с азотом, увеличивается с увеличением содержания азота в распыляемом газе. Пленки, нанесенные с помощью индукционной плазмы в среде аргон/азот, были намного более твердыми, чем пленки в неоне/азоте или криптоне/азоте.

В работе [201] проводилось распыление графита методом реактивного мощного импульсного магнетронного распыления в Ne, Ar и Kr, а также в газовой смеси перечисленных инертных газов с  $N_2$ . Реактивное распыление графитовой мишени приводит к формированию пленок из нитрида углерода ( $CN_x$ ), в то время как при распылении мишени в инертных газах без примеси формируется углеродная пленка. Реактивные разряды, горящие в атмосфере, содержащей Ne, Ar и Kr, существенно различаются. По мере уменьшения атомной массы рабочего инертного газа наблюдается увеличение ионного тока на мишени. Авторы объясняют данное явление разными потенциалами и способами ионизации, а также различными сечениями рассеяния газов. При реактивном распылении наиболее распространенными частицами в плазме являются  $C^+$ ,  $N^+$ ,  $N_2^+$ , однократно и двукратно ионизованные частицы рабочего газа, а также небольшое количество  $CN^+$ . В случае магнетронного распыления в инертных газах без реактивных примесей наблюдается увеличение энергии частиц по мере уменьшения атомного номера рабочего газа. При распылении мишени в газовой смеси  $Ne+N_2$  содержание частиц  $C^+$ ,  $N^+$  и  $Ne^+$  в плазме значительно снижается при увеличении содержания азота до 14% за счет уменьшения ионизации Пеннинга. При распылении мишени в Ar и Kr наблюдается энергия ионов в плазме по мере увеличения содержания  $N_2$ . Следует отметить, что Ne и Kr более подвержены влиянию примеси  $N_2$  из-за большей разницы в потенциале ионизации и полных сечениях ионизации данных газов относительно  $N_2$  и N, чем Ar.

Общее количество ионов в плазме увеличивается по мере уменьшения

атомной массы рабочего газа ввиду увеличения потенциала ионизации, который, в свою очередь, повышает температуру электронов соответствующей плазмы и, следовательно, улучшает ионизацию. Кроме того, энергия метастабильных состояний возрастает в той же последовательности, что делает возможным ионизацию Пеннинга и возбуждение  $N_2$  только для Ne, способствуя эффективной диссоциации азота. Данное наблюдение подтверждается увеличением количества частиц  $C_xN_y$  ( $x, y \leq 2$ ) в плазме, содержащей Ne при количестве  $N_2$ , превышающем 33%. Относительный поток ионов  $C^+$  является максимальным при распылении мишени в чистом Ar. При распылении мишени в Kr наблюдается наименьший относительный поток  $C^+$ . Распыление в Ne характеризуется промежуточным значением данного параметра. Вне зависимости от выбора рабочего инертного газа относительный поток частиц  $C^+$  уменьшается при содержании примеси  $N_2$  в диапазоне от 33 до 50% ввиду увеличения потока частиц  $N^+$  и  $N_2^+$ . Следует отметить, что с уменьшением атомного номера инертного газа увеличиваются потоки  $N^+$ , в то время как относительный поток  $N_2^+$  демонстрирует противоположную тенденцию благодаря повышенной способности Ne диссоциировать  $N_2$ .

Наибольшими скоростями осаждения покрытий характеризуются процессы, проводимые в Ar и Kr, поскольку при распылении мишени в Ne наблюдается эффект перераспыления осажденного покрытия. При добавлении 14%  $N_2$  в Ne наблюдается увеличение скорости осаждения покрытий, в то время как распыление в прочих инертных газах и соответствующих им реактивных процессах при 14%  $N_2$  характеризуется сопоставимыми скоростями формирования покрытий. Покрытия, осажденные в газовой смеси Ne+ $N_2$ , характеризуются наибольшим содержанием N ввиду высокой диссоциации и ионизации  $N_2$ , а также высокой энергией частиц азота в плазме.

В работе [202] проводилось ВЧ-магнетронное распыление серебра и исследование влияния Ne, Ar и Kr на свойства плазмы и осаждаемых покрытий. Исследование проводилось в диапазоне мощностей от 25 до 100 Вт и давлений от

0,5 до 3 Па. Было выявлено, что при распылении мишени в любом из исследуемых рабочих газов наблюдается наличие плазмы с высокой степенью ионизации в окрестности подложки. Исследование оптических спектров плазмы выявило увеличение интенсивности пиков при повышении давления в камере и мощности разряда. При давлениях 0,5 и 1 Па методом оптической спектроскопии не было выявлено наличие пиков, соответствующих  $\text{Ag}^+$ , при распылении мишени в Ar. Методом масс-спектрометрии в спектрах исследуемых разрядов были обнаружены радикалы  $\text{Ag}_2^+$ ,  $\text{AgNe}^+$ ,  $\text{AgAr}^+$  и  $\text{AgKr}^+$ . Максимум распределения энергии ионов в Ar и Kr плазме составлял 19 эВ, в то время как для Ne плазмы данный параметр составлял 28 эВ при давлении 3 Па и мощности разряда 50 Вт. Авторы связывают данное наблюдение с более высоким потенциалом плазмы в Ne разряде. Осажденные в Ne покрытия характеризуются шероховатостью 2,9 нм, в то время как покрытия, осажденные в других разрядах, имели шероховатость 3,9 нм. Это объясняется более высокой энергией частиц, падающих на подложку в Ne разряде.

На примере пленок из оксида титана ( $\text{TiO}_2$ ), осаждаемых методом ВЧМР, было доказано, что выбор инертного газа при магнетронном распылении оказывает существенное влияние на фазовый состав покрытий [203]. Установлено, что по мере увеличения атомной массы рабочего газа наблюдается снижение скорости осаждения покрытий. Данное явление объясняется увеличением рассеяния распыленных частиц на более массивных частицах рабочего газа [204]. При этом по мере увеличения атомной массы рабочего газа наблюдается увеличение импеданса плазмы, то есть увеличение напряжения разряда при уменьшении ионного тока. Магнетронный разряд поддерживается за счет столкновений вторичных электронов и атомов рабочего газа. Соответственно, импеданс плазмы зависит от сечения ионизации атомов рабочего газа и коэффициента вторичной электронной эмиссии с поверхности мишени. Увеличение импеданса разряда не может объясняться изменением сечения ионизации атомов рабочего газа, поскольку при увеличении его атомной массы наблюдается увеличение данного параметра, что, в свою очередь, уменьшает импеданс. Следовательно, рост

импеданса разряда по мере увеличения атомной массы рабочего газа объясняется уменьшением его коэффициента вторичной электронной эмиссии [205]. Помимо снижения скорости осаждения покрытий при увеличении атомной массы рабочего газа, также наблюдается изменение их свойств. По мере увеличения атомной массы рабочего газа наблюдается снижение содержания рутила и увеличение анатазы в составе  $TiO_2$  покрытия [203].

Исследование покрытий из оксида меди ( $Cu_2O$ ) показало, что размер, кристаллографическая ориентация кристаллитов и оптические свойства пленки зависят от выбора инертного рабочего газа [206]. Было установлено, что с увеличением атомной массы инертного рабочего газа наблюдается увеличение размера кристаллитов и уменьшение размеров агломератов в покрытии.

Подводя итог, можно сделать вывод о том, что выбор инертного рабочего газа оказывает существенное влияние на скорость осаждения, морфологию, элементный и фазовый состав, кристалличность и механические свойства покрытий. Требования к данным параметрам являются основными при разработке КФ покрытий для медицинских имплантатов, что и обуславливает перспективность проведения исследований в данной области.

### **1.3. Постановка задачи**

Медицинское материаловедение испытывает потребность в материалах, обладающих оптимальным набором свойств и обеспечивающих персонализированный подход к восстановлению дефектов костной ткани. Успешная остеоинтеграция имплантата, высокая скорость и качество консолидации костей являются залогом реабилитации пациентов с дефектами структуры костной ткани. Однако за прошедший век не наблюдалось значительного сокращения сроков сращивания переломов. Самого по себе регенеративного потенциала организма пациента недостаточно для восстановления больших костных дефектов. Причиной этому является использование для реконструкции структуры костной ткани устаревших материалов и технологий, не



содержащих в своем составе биоактивных или остеостимулирующих компонентов. Перспективным методом повышения качества восстановления функций опорно-двигательного аппарата и фиксации имплантатов является осаждение на их поверхности различных КФ материалов [207,208]. Поэтому поиск новых материалов с высоким регенеративным потенциалом по-прежнему остается актуальной задачей для многих научных коллективов.

На данном этапе развития тематики использования кальций-фосфатных материалов в медицинском материаловедении все большую популярность приобретают исследования, посвященные использованию разного рода ионных замещений в структуре осаждаемых биоактивных покрытий, а также придание дополнительных улучшенных свойств покрытиям посредством варьирования различных технологических параметров [6,48,209].

Анализ литературных источников показал, что варьирование составом распыляемой мишени, а также типом рабочего газа в процессе магнетронного распыления позволяет формировать покрытия с заданными свойствами. В частности, убедительно показано, что наличие ионных замещений в структуре распыляемых мишеней позволит сократить длительность технологического процесса осаждения покрытий и тем самым сократить издержки на промышленное производство изделий медицинского назначения.

Формирование покрытий в атмосфере различных инертных газов позволяет получать покрытия с новыми улучшенными характеристиками. Поэтому распыление КФ мишеней в атмосфере различных инертных газов позволит расширить диапазон возможных характеристик КФ покрытий медицинского назначения, что станет существенным шагом в развитии персонализированной медицины. При этом следует отметить тот факт, что формирование покрытий медицинского назначения, в частности кальций-фосфатных покрытий в среде различных инертных газов, ранее не проводилось. Это позволяет говорить о том, что полученные в данной работе результаты характеризуются высокой степенью научной новизны.

На основании вышеизложенного, **целью** данной работы являлось исследование влияния состава распыляемой мишени и рабочего газа на скорость осаждения и свойства кальций-фосфатных покрытий, сформированных методом ВЧМР.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1) сформировать на поверхности титановых подложек КФ покрытия методом ВЧМР порошковых Sr- и Mg-замещенных мишеней на основе  $\beta$ -трикальцийфосфата ( $\beta$ -ТКФ) и гидроксиапатита (ГАП);

2) сформировать на поверхности титановых подложек КФ покрытия методом ВЧМР твердотельной мишени из ГАП в среде различных инертных рабочих газов (Ar, Kr и Xe);

3) исследовать влияние ионных замещений в структуре распыляемых порошковых мишеней на скорость осаждения КФ покрытий в процессе ВЧМР;

4) исследовать влияние инертного рабочего газа на скорость осаждения КФ покрытий в процессе ВЧМР;

5) исследовать морфологию, физико-химические и механические свойства покрытий, осажденных ВЧМР порошковых мишеней из  $\beta$ -ТКФ и ГАП, содержащих магний и стронций;

6) исследовать морфологию, физико-химические, механические и биологические свойства покрытий, осажденных ВЧМР твердотельной мишени из ГАП в атмосфере различных инертных газов;

7) провести комплексный анализ полученных экспериментальных данных.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Материалы исследований

В качестве подложек для формирования покрытий использовали титановые диски ВТ6 диаметром 10 мм и толщиной 1 мм. Перед напылением пленок подложки механически шлифовали и полировали на установке «UNIPOL – 802» (МТИ, США). Финальная шлифовка образцов проводилась с использованием наждачной бумаги P1500 (ГОСТ 52381-2005, Россия) с размером зерна шлифовальной шкурки 7-10 мкм, в процессе полировки использовалась алмазная паста с дисперсностью частиц 60/40. Отмывка образцов от органических загрязнений проводилась в трихлорметане троекратно.

В качестве материала распыляемой мишени использовали семь различных порошков. В частности, четыре типа порошковых мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ: чистый  $\beta$ -ТКФ, Mg-замещенный  $\beta$ -ТКФ (Mg- $\beta$ -ТКФ) с концентрацией магния  $1,38 \pm 0,01$  ат.%, Sr-замещенный  $\beta$ -ТКФ (Sr- $\beta$ -ТКФ) с концентрацией стронция  $0,87 \pm 0,02$  ат.% и Mg- и Sr-замещенный  $\beta$ -ТКФ (Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ) с концентрациями магния и стронция  $1,08 \pm 0,19$  ат.% и  $0,94 \pm 0,01$  ат.%, соответственно. Порошки на основе  $\beta$ -ТКФ были синтезированы в Рижском техническом университете методом “мокрой химии” (wet chemical method) [210,211].

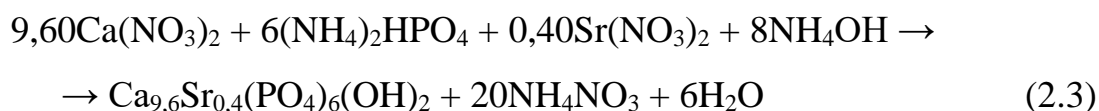
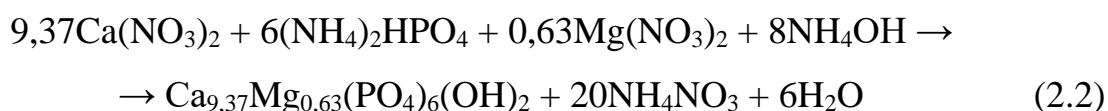
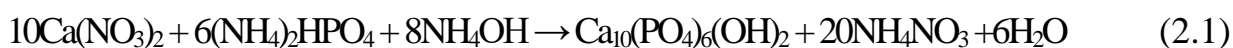
Изготовление исходных суспензий проводилось диспергированием CaO (Fluka, ЧДА) в деионизированной  $H_2O$ . В суспензии, предназначенные для получения замещенных порошков, также добавлялись MgO (Sigma-Aldrich, ЧДА) и/или SrO (полученный из  $SrCO_3$ , Sigma-Aldrich, ХЧ).

Водный 2М раствор  $H_3PO_4$  (Sigma-Aldrich, ХЧ), используемый в качестве источника ( $PO_4^{3-}$ ), добавляли к исходным суспензиям со скоростью  $\sim 5$  мл/мин, чтобы довести pH смесей для синтеза примерно до 6. Синтез проводился при температуре окружающей среды. Полученные осадки оставляли на ночь, а затем отфильтровывали. Для проведения фазового, молекулярного и химического анализов, а также измерения удельной поверхности влажные осадки сушили при температуре  $105$  °C в течение 24 часов в исходном состоянии, затем измельчали и

подвергали термической обработке при 1100 °С в течение 1 часа.

В работе также использовали три типа порошковых мишеней на основе ГАП: чистый ГАП (ГАП), Mg-замещенный ГАП (Mg-ГАП) с концентрацией магния  $0,93 \pm 0,13$  ат.% и Sr-замещенный ГАП (Sr-ГАП) с концентрацией стронция  $\sim 0,47$  ат.%, соответственно. Средние размеры частиц нанопорошков  $\beta$ -ТКФ, Mg- $\beta$ -ТКФ, Sr- $\beta$ -ТКФ и Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ составляли  $34 \pm 1,7$ ;  $27 \pm 1,4$ ;  $30 \pm 1,5$  и  $28 \pm 1,4$  нм, соответственно. Порошки на основе ГАП синтезировали методом микроволнового синтеза в Томском государственном университете.

Микроволновый синтез образцов ГАП, Mg-ГАП, Sr-ГАП проводили с соблюдением стехиометрического соотношения  $Ca/P = 1,67$  ( $(Ca+M)/P = 1,67$ ) в соответствии с уравнениями реакций (2.1–2.3), приведенными ниже [212]:



Водный раствор нитрата кальция смешивали с раствором гидрофосфата аммония, концентрации которых составляли 0,5 М и 0,3 М, соответственно. Для синтеза Mg-ГАП и Sr-ГАП необходимые навески нитратов магния или стронция, соответственно, вносили в раствор нитрата кальция. Затем pH смеси реагентов доводили до значения 10-11 водным раствором аммиака ( $\rho = 0,903$  г/мл). Реакционную смесь подвергали воздействию микроволнового излучения мощностью 110 Вт в течение 30 минут, затем отстаивали при комнатной температуре в течение 48 часов. Осадок отфильтровывали, промывали разбавленным раствором этилового спирта и высушивали до постоянной массы ( $\sim 15$  ч) при 90 °С; после чего прокаливали в течение 4 часов при температуре 900 °С. Количество ионов магния и стронция, приведенное в уравнениях, соответствует  $0,93 \pm 0,13$  ат.% и  $\sim 0,47$  ат.%, соответственно, этих металлов в гидроксиапатите.

Более подробная информация о синтезе и свойствах порошков представлена в [213].

Осаждение покрытий в атмосфере различных инертных газов (Ar, Kr и Xe) проводилось путем ВЧ-магнетронного распыления твердотельной ГАП мишени. Мишень готовилась прессованием порошка ГАП марки nanoXIM HAp® 203 (Fluidinova, Португалия) при 80 МПа с последующим отжигом на воздухе в течение 1 ч при 1100 °С.

Формирование кальций-фосфатных покрытий осуществлялось на установке магнетронного распыления «Катод 1М», оснащенной ВЧ генератором (13,56 МГц). Площадь распыляемой мишени составляла 224 см<sup>2</sup>, а высота – 0,6 см (рис. 2.1). Расстояние между мишенью и подложкой составляло 38 мм.

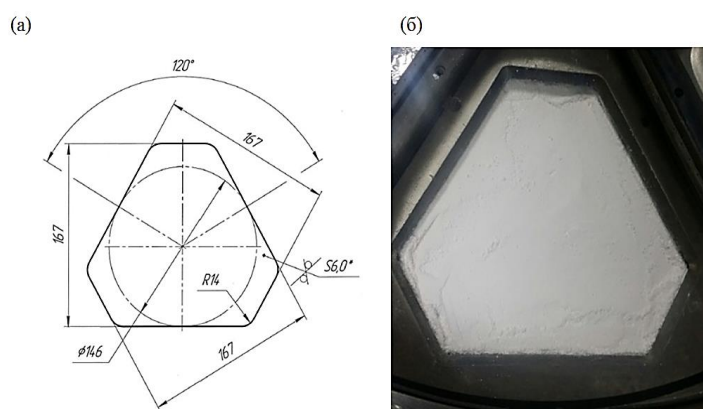


Рисунок 2.1 – Схема (а) и фотография (б) распыляемой мишени

При распылении мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ рабочие параметры процесса были следующими: предварительное давление в камере –  $5 \times 10^{-3}$  Па; рабочее давление (Ar) – 0,5 Па; плотность мощности – 4,8 Вт/см<sup>2</sup>; время осаждения покрытий – 21 час. Далее по тексту обозначения покрытий, сформированных распылением порошка  $\beta$ -ТКФ, Mg-замещенный  $\beta$ -ТКФ, Sr-замещенный  $\beta$ -ТКФ и Mg- и Sr-замещенный  $\beta$ -ТКФ, приведены как  $\beta$ -ТКФ, Mg- $\beta$ -ТКФ, Sr- $\beta$ -ТКФ и Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ, соответственно.

Распыление порошковых мишеней на основе замещенного ГАП осуществлялось при следующих параметрах: предварительное давление в камере –  $5 \times 10^{-3}$  Па; рабочее давление – 0,5 Па; удельная мощность  $\sim 5,26$  Вт/см<sup>2</sup>; время

нанесения – 7 часов.

Параметры распыления ГАП в атмосфере различных газов были следующими: плотность мощности –  $5,2 \text{ Вт/см}^2$ ; время напыления – 7 ч; предварительное давление в камере –  $5 \times 10^{-3} \text{ Па}$ ; рабочее давление составляло  $0,3 \text{ Па}$  при распылении в атмосфере Ar, Kr, Xe. Температура подложки в процессе осаждения покрытий составляла  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  при распылении в Ar и Kr и  $188 \text{ }^\circ\text{C}$  при распылении в атмосфере Xe. Температуру подложки измеряли с помощью хром-алюминиевой термопары (Эталон, Россия) через 1 ч после начала процесса. В оставшийся период напыления наблюдались некоторые отклонения температуры ( $\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Использованная в работе установка «Катод-1М» оснащена вакуумметром ВМБ-14, который относится к типу магниторазрядных вакуумметров. Данный тип вакуумметров характеризуется чувствительностью к роду газа, что при распылении мишени в разных инертных газах может привести к отсутствию единых условий напыления покрытий. Во избежание этого был установлен дополнительный вакуумметр – WRG-S. Была проведена сверка показаний вакуумметров ВМБ-14 и WRG-S в диапазоне давлений  $0,1-1,0 \text{ Па}$ . При выставлении давления по Ar, Kr и Xe на уровне  $0,3 \text{ Па}$  по ВМБ-14 значения давления в камере составляют  $0,30 \pm 0,07 \text{ Па}$ ,  $0,23 \pm 0,05 \text{ Па}$  и  $0,34 \pm 0,08 \text{ Па}$ . На основании этого можно утверждать, что при выставлении давления на вакуумметре ВМБ-14 в точке  $0,3 \text{ Па}$  по Ar, Kr и Xe он отображает давление, близкое к реальному и не имеющее достоверных статистических различий в зависимости от рода газа.

## **2.2. Методы исследований**

### **2.2.1. Оптическая эмиссионная спектроскопия**

В процессе нанесения покрытий химический состав плазмы изучался с помощью оптического спектрографа Ocean Optics HR 2000+ (Ocean Optics, США). Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программ SpectraSuite (Ocean Optics, США).

### **2.2.2. Контактная профилометрия**

Толщину КФ покрытий, сформированных распылением порошковых мишеней, исследовали с помощью контактного профилометра Talysurf-5 (Taylor & Hobson, Великобритания). С этой целью проводилось их напыление на кремниевые образцы-свидетели. Часть подложки закрывали маской для получения «ступеньки», которую затем измеряли с помощью профилометра. Talysurf-5 также использовался при исследовании средней шероховатости покрытий, осажденных распылением мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ.

### **2.2.3. Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная спектроскопия**

Морфологию покрытий и элементный состав образцов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа QUANTA 200 3D (СЭМ; Quanta 200 3D, FEI Company, США), оборудованного системой для проведения энергодисперсионного анализа (ЭДС; JSM-5900LV, JEOL Ltd., Япония). ЭДС анализ проводили в низком вакууме при ускоряющем напряжении 10 кэВ.

Элементный состав осадков на поверхности образцов после растворения КФ покрытий, сформированных распылением твердотельной ГАП мишени в среде различных рабочих газов, в среде RPM1 1640 проводили на этом же приборе, но в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ.

Контроль толщины КФ покрытий, сформированных распылением твердотельной ГАП мишени, дополнительно осуществляли посредством анализа поперечного скола образцов-свидетелей на сканирующем электронном микроскопе JSM-6000 (JEOL, Япония) в условиях низкого вакуума и ускоряющем напряжении 15 кэВ.

### **2.2.4. Атомно-силовая микроскопия**

Морфологию поверхности на большем увеличении, а также шероховатость поверхности покрытий исследовали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на приборе Solver-NV (НТ-МДТ, Россия) в полуконтактном режиме. Анализ

изображений поверхности проводили в программе Nova SPM (НТ-МДТ, Россия).

### 2.2.5. Рентгенофазовый анализ

Рентгенофазовый анализ порошковых мишеней из Mg- и Sr-замещенного  $\beta$ -ТКФ использовался для идентификации кристаллических фаз в диапазоне  $2\theta$  от  $10^\circ$  до  $70^\circ$  на рентгеновском дифрактометре (PANalyticalX'Pert Pro) с использованием  $\text{CuK}\alpha$  излучения ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ) при 40 кВ и 30 мА с шагом  $0,06^\circ$  и временем экспозиции 200,025 с. Исследование свойств порошков на основе  $\beta$ -ТКФ проведено на базе Рижского технического университета.

Кристаллическую структуру покрытий, осажденных распылением Mg- и Sr-замещенного  $\beta$ -ТКФ, исследовали методом рентгенофазового анализа (РФА) на дифрактометре Shimadzu XRD 6000 (Shimadzu, Япония) с монохроматическим  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ) излучением при угле наклона скользящего пучка  $3^\circ$ . Диапазон углов сканирования, размер шага сканирования и время экспозиции составляли  $10$ - $80^\circ$ ,  $0,02$  и  $1$  с, соответственно.

Исследования кристаллической структуры порошковых ГАП мишеней, а также покрытий, осажденных распылением твердотельных и порошковых мишеней на основе ГАП, проводили при тех же параметрах, но использовали прямой пучок.

Для анализа рентгенограмм использовали базы данных PDF 4+ и программу полнопрофильного анализа POWDER CELL 2.4.

### 2.2.6. Метод Брунауэра-Эммета-Теллера

Метод Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ) использовался для определения удельной площади поверхности (УПП) порошковых мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ по абсорбции  $\text{N}_2$ . Для этих целей был использован анализатор удельной площади поверхности и размеров пор Quadrasorb-SI Kr (Quantachrome, США). Образцы дегазировали при  $40^\circ\text{C}$  в течение 24 часов перед анализом. Значения средних размеров частиц порошков оценивали по формуле 2.4:



$$d_{\text{BET}} = \frac{6}{(q \times S_w)}, \quad (2.4)$$

где  $d_{\text{BET}}$  – рассчитанный диаметр частицы,  $q$  – теоретическая плотность  $\beta$ -ТКФ (3,07 г/см<sup>3</sup>) (согласно ГОСТ Р ИСО 13175-3:2012 Имплантаты для хирургии. Фосфаты кальция. Часть 3. Костные заменители на основе гидроксиапатита и бета-трикальций фосфата),  $S_w$  – удельная поверхность.

### 2.2.7. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

Исследование элементного состава покрытий, осажденных распылением порошковых мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ, проводилось методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) на приборе Escalab 250Xi (Thermo Fisher Scientific Inc., Великобритания), оборудованном источником монохроматического излучения AlK $\alpha$  (энергия фотонов: 1486,6 эВ). Спектры были получены в режиме постоянной энергии прохода при 100 эВ для обзорного спектра и 50 эВ для спектра на уровне ядра элемента. Размер пятна рентгеновского луча составлял 650 мкм, а полное энергетическое разрешение составляло приблизительно 0,55 эВ. Исследования проводились при комнатной температуре в сверхвысоком вакууме (давление порядка  $1 \cdot 10^{-9}$  мбар; в системе электронно-ионной компенсации парциальное давление Ar составляло  $1 \cdot 10^{-7}$  мбар). Библиотека эталонных спектров РФЭС, включая факторы чувствительности регистрации атомов, была доступна в системе данных Advantage, предоставленной производителем прибора. Пики были деконволюционированы с помощью программного обеспечения Advantage (Thermo Fisher Scientific Inc., Великобритания), установленного на вычитание фона Ширли, с последующим подгонкой пиков к функциям Фойгта с 80%-ным гауссовым и 20%-ным лоренцевым характером. Исследование каждого образца проводилось дважды в разных точках поверхности.

### 2.2.8. Смачиваемость покрытий

Смачиваемость образцов с КФ покрытиями, осажденными распылением порошковых мишеней на основе ГАП и твердотельной мишени из ГАП в

атмосфере различных инертных газов, исследовалась методом «сидячей капли». Капли полярной и неполярных жидкостей (воды и глицерина) объемом 3 мкл наносились в различные точки образцов для измерения их краевого угла смачивания с последующим расчетом свободной энергии поверхности и ее полярной и дисперсионной компонент. Исследование проводилось на установке Easy Drop DSA 20 (Krüss; Германия). Измерение краевого угла смачивания проводилось через одну минуту после нанесения капли в пяти различных точках поверхности каждого образца.

### 2.2.9. Наноиндентирование и scratch-тест

Исследование модуля Юнга ( $E$ ) и нанотвердости ( $H$ ) покрытий, осажденных распылением порошковых мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ и твердотельных мишеней на основе ГАП, проводилось с использованием метода индентирования, предложенного Оливером и Фарром [214] на установке Nanoindenter G200 (Agilent's Electronic Measurement, США). Индентирование производилось треугольной пирамидой Берковича при нагрузке 5 мН. На каждом образце было выполнено не менее 10 отпечатков.

Адгезионная прочность покрытий, осаждаемых распылением твердотельной мишени из ГАП в атмосфере различных инертных рабочих газов, оценивалась методом scratch-теста. Одним из способов оценки адгезионной прочности покрытия является критическая нагрузка ( $L_c$ ), при которой начинается разрушение покрытия под действием царапающего его индентора. Для каждой царапины нагрузка на индентор менялась от 0 до 300 мН при постоянной скорости его прохождения 5 мкм/с. Длина царапины составляла 300 мкм. На каждый образец было нанесено по десять царапин. Оценка критической нагрузки проводилась исследованием поверхности образцов методом СЭМ. Покрытие, осажденное распылением ГАП в Хе, не разрушилось при достижении максимальной нагрузки на индентор, вследствие чего нагрузка на него была увеличена до 500 мН, при этом также разрушения покрытия не наблюдалось.

### **2.2.10. Атомно-эмиссионная спектроскопия**

Исследование ионного выхода из покрытий, осажденных распылением порошковых мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ, проводили с помощью атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно связанной плазмой iCAP-6300 Duo (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы с кальций-фосфатными покрытиями погружали в кюветы, содержащие 0,9 мас.% раствора NaCl. Объем каждого раствора составлял 20 мл. Кюветы помещали в термостат при постоянной температуре 37 °С на 7, 14 и 22 дня и ежедневно встряхивали.

Выход ионов из покрытий контролировали по Ca, P, Mg, Sr и Ti. Каждая группа образцов была проанализирована тоекратно для получения статистически достоверных данных.

### **2.2.11. Статистический анализ**

Статистический анализ вышеупомянутых данных осуществляли с использованием программного пакета Statistica 7.0 (Dell, США). Для проверки гипотезы о нормальности распределения выборок использовался тест Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения для оценки статистической значимости использовался t-критерий Стьюдента, во всех остальных случаях использовался U-критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### **2.2.12. Компьютерное моделирование элементарной ячейки $\beta$ -трикальцийфосфата**

Расчеты атомной структуры ТКФ, Mg- $\beta$ -ТКФ и Sr- $\beta$ -ТКФ проводились методом проекционных присоединенных волн (PAW) [215,216], реализованным программным комплексом Vienna Ab initio Simulation Package (VASP) [217,218]. Для обменно-корреляционного функционала использовалось обобщенное градиентное приближение в форме Пердюю, Берка и Эрнцерхофа (GGA-PBE) [219]. Максимальная энергия плоских волн из базисного набора составляла 400 эВ. Интегрирование по зоне Бриллюэна было выполнено с использованием Г-

центрированной сетки k-точек ( $3 \times 3 \times 3$ ). Полная оптимизация атомной структуры включала как релаксацию атомных позиций, так и изменение формы расчетной ячейки.

Численные расчеты выполнены при участии С.Е. Кульковой и А.В. Бакулина на суперкомпьютере СКИФ-Cyberia в Национальном исследовательском Томском государственном университете.

### **2.2.13. Компьютерное моделирование коэффициента распыления**

Компьютерное моделирование коэффициента распыления мишени из гидроксиапатита ионами Ar, Kr и Xe на диапазоне энергий 400-1000 эВ осуществлялось при помощи ПО SRIM-2013 (Stopping and Range of Ions in Matter). Каждое моделирование проводилось при 100 000 бомбардирующих ионов.

### **2.2.14. Выделение ММСК**

ММСК получали из тканей человека в постнатальном периоде (из липоаспирата жировой ткани) в полном соответствии с юридическими и этическими принципами проведения медико-биологических исследований с использованием биоматериала человека, принятыми на территории РФ, а также согласно Хельсинской декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., с полным соблюдением конфиденциальности и информированием пациентов. Выделение культуры производили по методике Zuk et al. [220]. Первоначальную ткань гомогенизировали в небольшом количестве среды, после чего ферментировали раствором коллагеназы 1 типа (ПанЭко, Россия) в течение 60 минут при 37 °С в термошейкере со скоростью вращения 600 об/мин. После ферментативной обработки фракцию несколько раз отмывали с помощью фосфатно-солевого буфера. Клеточную взвесь ресуспендировали и вливали во флакон, куда затем добавляли среду DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) в присутствии 50 мг/л гентамицина (Invitrogen, Великобритания) и 280 мг/л L-глутамин (Sigma-

Aldrich, США).

Выделение ММСК проводилось сотрудниками Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. Канта.

### **2.2.15. Исследование биодеградации покрытий**

Покрытия, осажденные распылением твердотельной мишени из ГАП в атмосфере различных инертных газов, растворялись *in vitro* в условиях, близких к асептическому воспалению, которое обычно возникает после имплантации и сопровождается скоплением биологических жидкостей в окружающих тканях. Перед иммерсионными испытаниями, описанными в [221], все образцы стерилизовали сухим жаром с помощью Binder FD53 (BinderGmbH, Туттлинген, Германия) при 453 К в течение 1 часа. Для оценки биодеградации образцы с покрытием асептически погружали в синтетическую культуральную среду RPMI 1640 с низким содержанием микронутриентов (г/л, 5,9 NaCl, 0,4 KCl, 0,8 Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 0,1 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,049 MgSO<sub>4</sub>, 4,5 D-глюкоза, аминокислоты и витамины; Sigma-Aldrich, Миссури, США) при 37 °С в течение 5 недель (использовали 2 мл среды на образец по ISO 10993-5). Растворы заменяли свежей порцией в конце каждой недели. В качестве соответствующих контролей использовали растворитель без испытуемых образцов и подложки Ti без КФ покрытия. Концентрации ионов натрия, калия, ионизированных и суммарных ионов кальция и фосфата определяли с использованием наборов от фирмы Thermo Fisher Scientific Inc. (Массачусетс, США) для ионоселективных электродных методик на биохимическом автоматическом анализаторе Konelab60i (Thermo Fisher Scientific Inc., Массачусетс, США). Через 5 недель образцы были извлечены и высушены на воздухе при 22 °С в течение 14 дней для регистрации изменений массы покрытий. Массы образцов взвешивали на аналитических весах ГР 202 с точностью первого класса по ГОСТ 24104-201 (при взвешивании среднее квадратичное отклонение составляло 0,023–0,047 мг).

### **2.2.16. Клеточность ММСК**

Подсчёт клеточности в культурах ММСК (до и после культивирования на поверхности образцов с покрытиями, осажденными распылением твердотельной мишени из ГАП в атмосфере различных инертных газов) проводили с помощью автоматического счётчика клеток Countess TM Automated Cell Counter (Invitrogen, Массачусетс, США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% (Invitrogen, Массачусетс, США)

### **2.2.17. Жизнеспособность ММСК**

Дифференциальная проницаемость для ДНК-связывающих красителей позволяет разграничивать живые и мертвые клетки в любых клеточных суспензиях. Для определения жизнеспособности ММСК, культивированных на поверхности образцов с покрытиями, осажденными распылением твердотельной мишени из ГАП в атмосфере различных инертных газов, клеточные образцы тщательно ресуспендировали и отбирали 12,5 мкл, добавляли 125 мкл ViaCount Reagent, тщательно ресуспендировали и оставляли на 5 минут в темном месте. Регистрацию жизнеспособности и подсчёт числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили с использованием программы «Guava ViaCount» (Millipore, Массачусетс, США), методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «Guava EasyCite Plus» (Millipore, Массачусетс, США) согласно протоколу производителя (рисунок 2.5).

Для определения уровней относительной экспрессии генов ALPL, BMP6, BMP2, свидетельствующих о дифференцировке ММСК в остеогенном направлении, проводился мультиплексный анализ ПЦР с использованием реагентов qPCRmixHS («Евроген», Москва, Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10пМ («Beagle», Россия). В качестве матрицы использовались 2 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген RPLPO. Исследовались клетки, культивированные на поверхности образцов с покрытиями, осажденными распылением твердотельной мишени из ГАП в атмосфере различных инертных газов.

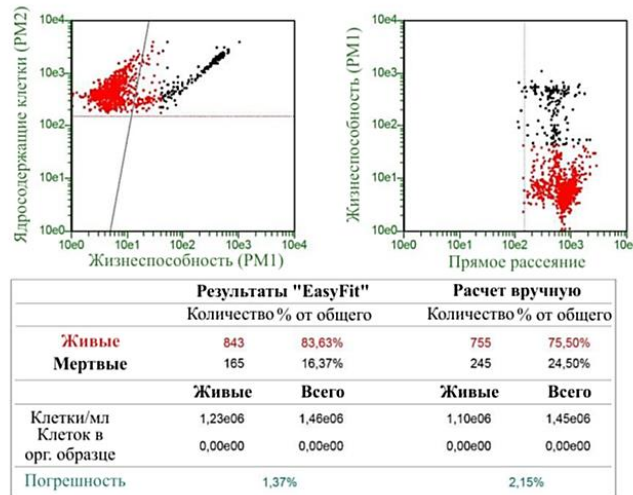


Рисунок 2.5 – Стандартный протокол с использованием реагента и программы «GuavaViacount» (Millipore, Массачусетс, США)

### 2.2.18. Экспрессия генов

Пары праймеров для определения уровня относительной экспрессии генов подбирались при помощи online инструментов сайта Integrated DNA Technologies. Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью online программы BLAST.

Принцип метода реализуется за счет добавления в реакционную смесь, флуоресцирующих зондов комплементарных внутренней последовательности амплифицируемых фрагментов. Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, несущий на 5'-конце флуорофор, и на 3'-конце так называемый «гаситель» - флуорофор, подобранный таким образом, чтобы его диапазон поглощения совпадал с диапазоном эмиссии флуорофора, связанного с 5'-концом. Подобная комбинация обеспечивает полноценное гашение флуоресценции 5'-концевого флуорофора 3'-концевым флуорофором за счет флуоресцентно-резонансного переноса энергии (FRET). Таким образом, флуоресценция 5'-концевого флуорофора при условиях целостности первичной структуры зонда оказывается близкой к нулю. Полимеразная цепная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификации) фрагмента ДНК, ограниченного участками посадки праймеров. На каждом цикле амплификации

происходит гибридизация олигонуклеотидного зонда к комплементарному участку ампликона с последующим разрушением (гидролизом) зонда ферментом – термостабильной ДНК полимеразой (благодаря ее 5'-эксонуклеазной активности). При гидролизе зонда происходит пространственное разобщение 5' и 3' концевых флуорофоров, что делает невозможным гашение флуоресценции посредством FRET взаимодействия. Регистрируемое при этом увеличение значений флуоресценции 5'-флуорофора прямо пропорционально увеличению числа синтезированных ампликонов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице. Последовательность олигонуклеотидных праймеров указана в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте

Название гена	Последовательность	Длина	ОЕ
Щелочная фосфатаза человека, печень/кость/почка ( <i>ALPL</i> )	F:5'-GGGAAATCTGTGGGCATTGT-3'	20	3
	R: 5'-GAGTACCAGTCCCGGTCAGC-3'	20	
	Probe: 5'- FAM-ACCACGAGAGTGAACCATGCCA-BHQ1-3'	22	
Костный морфогенетический белок человека-6 ( <i>BMP6</i> )	F:5'- TTACAGGAGCATCAGCACAG-3'	20	3
	R: 5'- GGAGTCACAACCCACAGATT-3'	20	
	Probe: 5'- FAM-CCTCAGAAGAAGGCTGGCTGGAAT-BHQ1 -3'	24	
Костный морфогенетический белок человека-2 ( <i>BMP2</i> )	F:5'-ACGAGGTCCTGAGCGAGTT-3'	19	3
	R: 5'-GACCTGAGTGCCTGCGATAC-3'	20	
	Probe: 5'- FAM-CTGAAACAGAGACCCACCCCCAGCA-BHQ1-3'	25	
RPLPO	F: 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3'	20	3
	R: 5'-CCATCAGCACCCACAGCCTTC-3'	20	
	Bgl635-5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'-BHQ-2	25	

Для каждой пары праймеров была подобрана оптимальная температура отжига с использованием градиентной ПЦР (Bio-Rad T-100, Bio-Rad C-1000, США). Оптимизация условий полимеразной цепной реакции проводилась при амплификации пяти последовательных 2-х кратных разведений кДНК, каждая точка была представлена в двойном повторе (рисунок 2.3).

ПЦР-реакцию проводили в трех повторах. Для проведения ПЦР использовали амплификатор Real-time CFX96 Touch («Bio-Rad», Калифорния, США). После проведения амплификации стандартное программное обеспечение



(ПО) строит график накопления ПЦР-продукта (рисунок 2.4).

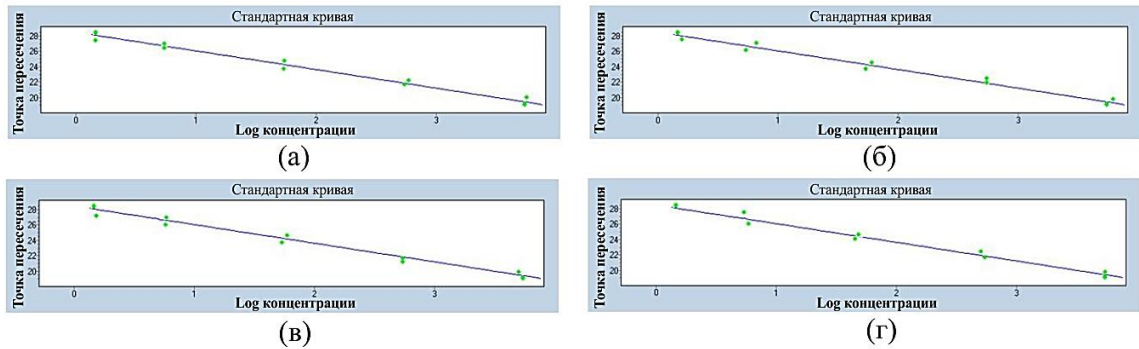


Рисунок 2.3 – Проекция значений Ct серии двукратных разведений для построения калибровочной кривой генов: а) ALPL; б) BMP6; в) BMP2; г) RPLPO

### Протокол амплификации:

первичная денатурация – 3 мин при 95 °С;

амплификационный цикл (x 50):

5) денатурация – 20 с при 95 °С;

6) отжиг праймеров – 30 с при 60 °С;

7) элонгация – 60 с при 72 °С;

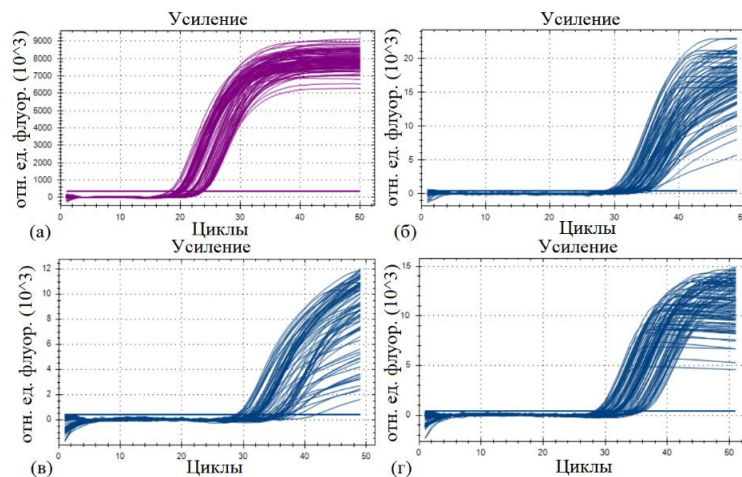


Рисунок 2.4 – Кривые накопления ПЦР-продукта: а) на канале Cy5 (RPLPO); б-г) на канале FAM (ALPL, BMP6, BMP2, соответственно)

Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффла для разных эффективностей амплификации. Полученные в ходе анализа результаты зависят от референсного гена и применяемой процедуры нормализации. Данная формула показывает наиболее удобную математическую модель, которая включает в себя коррекцию

эффективности для эффективности ПЦР в реальном времени отдельных транскриптов.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(\text{control-sample})}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(\text{control-sample})}} \quad (2.5)$$

Относительный уровень экспрессии исследуемого гена вычисляется, исходя из его эффективности ПЦР в реальном времени (E) и разности ( $\Delta$ ) точек пересечения (CP) неизвестного образца по сравнению с контрольным ( $\Delta CP = CP$  контрольного образца – CP исследуемого образца). Используемый относительный количественный анализ (Relative Quantification) основан на отношении экспрессий исследуемого к экспрессии референсного гена и является достаточным для большинства целей исследовать физиологические изменения в уровнях экспрессии генов.

### **2.2.19. Статистический анализ результатов исследования биологических свойств**

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью методов статистического описания, а также методов проверки статистических гипотез, использующихся в стандартных пакетах STATISTICA for Windows 10.0. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25%-ный (Q1) и 75%-ный (Q3) квартили. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r)) анализ. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий для независимых выборок Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Статистическая обработка данных проводилась сотрудниками Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. Канта под руководством доктора медицинских наук зав.лаб. Л.С. Литвиновой.

### **3. ВЛИЯНИЕ Sr и Mg-ЗАМЕЩЕНИЙ В СОСТАВЕ ПОРОШКОВЫХ МИШЕНЕЙ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА И $\beta$ -ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА НА СКОРОСТЬ ИХ РАСПЫЛЕНИЯ И НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОКРЫТИЙ, СФОРМИРОВАННЫХ МЕТОДОМ ВЧМР**

#### **3.1. Кальций-фосфатные покрытия, сформированные ВЧ-магнетронным распылением Sr и Mg-замещенных $\beta$ -трикальцийфосфатных мишеней**

Исследование оптических спектров плазмы в процессе формирования покрытий на основе  $\beta$ -ТКФ показало, что плазменные разряды представлены атомами и ионами рабочего газа (Ar), атомными (Ca, P и O) и молекулярными (CaO, PO, OH, H<sub>2</sub>O, CaOH) частицами распыляемых мишеней и водородом (H) (рис. 3.1). Присутствие водорода и водородсодержащих частиц в спектре можно объяснить остаточным количеством воды, сорбированной порошковыми мишенями из атмосферы. Линии, характерные для CaO и PO, являются наиболее интенсивными среди детектируемых и соответствующих частицам мишени. Составы плазмы представлены преимущественно кислородсодержащими частицами, поскольку химические связи в кислородсодержащих частицах характеризуются высокой прочностью: кислород является вторым по активности окислителем после фтора. К примеру, энергия химической связи Ca–Ca составляет 0,16 эВ, а энергия связи Ca–O – 4,9 эВ [222]. Между исследуемыми оптическими спектрами плазмы не наблюдается существенных различий, что свидетельствует о том, что используемое количество ионных замещений в структуре распыляемой мишени не влияет на их состав.

На рисунке 3.2 представлены результаты измерения средней шероховатости, толщины и скорости формирования покрытий. Покрытия, сформированные с помощью распыления мишеней, содержащих стронций, характеризуется наибольшей толщиной и, следовательно, скоростью осаждения ( $48,6 \pm 1,5$  нм/ч для Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ и  $47,1 \pm 1,4$  нм/ч для Sr- $\beta$ -ТКФ). Следует отметить, что покрытия, напротив, имеют наименьшую толщину и скорость формирования ( $26,7 \pm 0,8$  нм/ч).

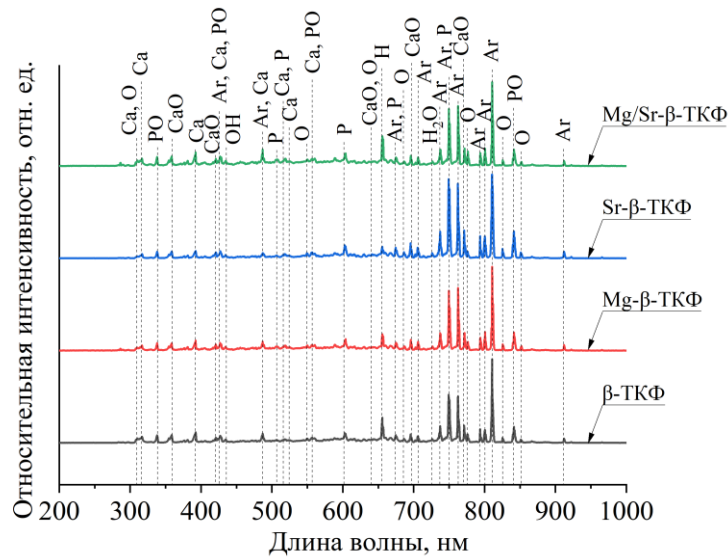


Рисунок 3.1 – Спектры оптического излучения плазменных разрядов, полученные при распылении мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ

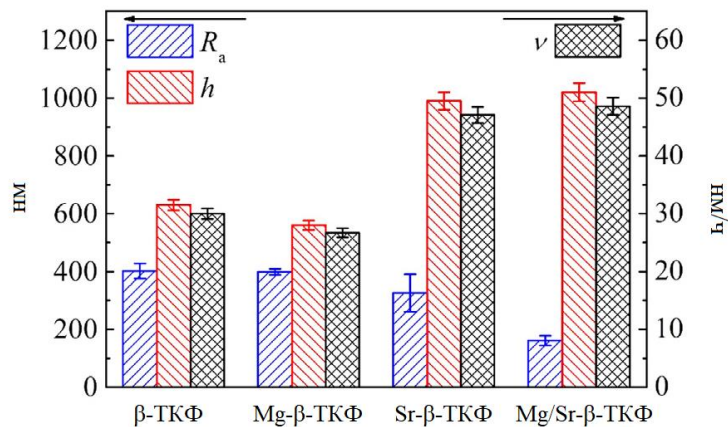


Рисунок 3.2 – Средняя шероховатость, толщина и скорость осаждения покрытий

Промежуточные значения данных показателей соответствуют покрытиям, полученным распылением мишени на основе чистого  $\beta$ -ТКФ ( $30,0 \pm 0,9$  нм/ч).

Наибольшее значение средней шероховатости имеют покрытия, сформированные с помощью распыления  $\beta$ -ТКФ, Mg- $\beta$ -ТКФ и Sr- $\beta$ -ТКФ. И, напротив, наиболее гладкая поверхность характерна для полированной титановой подложки и покрытий, полученных распылением мишени Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ. Высокая шероховатость поверхности положительно влияет на механическую стабильность имплантата как во время его установки, так и на его долгосрочную функциональность [223,224]. Поэтому предполагается, что имплантаты с

покрытиями групп  $\beta$ -ТКФ, Mg- $\beta$ -ТКФ и Sr- $\beta$ -ТКФ будут более предпочтительными для клеток, чем имплантаты без покрытия и имплантаты с покрытиями Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ.

СЭМ- и АСМ-изображения поверхности исследованных образцов представлены на Рисунке 3.3. СЭМ-изображения поверхности всех исследуемых кальций-фосфатных покрытий выглядят одинаково и характеризуются волнистой поверхностью (Рисунок 3.3, левая колонка). Исходная поверхность титанового образца гладкая, с остаточными следами от полировки. АСМ-исследования выявили, что средний размер зерна титановой подложки составляет 230 нм (см. Рисунок 3.3А). В свою очередь, АСМ-анализ поверхности покрытий, сформированных распылением мишени  $\beta$ -ТКФ, не выявил наличия каких-либо структурных элементов, поверхность имеет волнистый рельеф (Рисунок 3.3, Б). Структура покрытий, сформированных распылением мишени Mg- $\beta$ -ТКФ, представлена неравноосными зернами со средним размером 140 нм (Рисунок 3.3, В). Следует отметить, что структура покрытий, образованных распылением мишеней Mg- $\beta$ -ТКФ и Sr- $\beta$ -ТКФ, различается. Размер зерен у покрытий, сформированных распылением мишени Sr- $\beta$ -ТКФ, значительно меньше, чем у покрытий, сформированных при распылении мишени на основе Mg- $\beta$ -ТКФ. Так, покрытия, сформированные распылением мишени, содержащей Sr, состоят из зерен сферической формы со средним размером 50 нм (Рисунок 3.3, Г). Сферические зерна со средним размером 70 нм характерны для покрытий, сформированных распылением Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ (Рисунок 3.3, Д).

РФЭС-спектры исследуемых покрытий представлены на Рисунке 3.4. Пики при 531,46 эВ, 347,79 эВ, 285,51 эВ и 133,93 эВ соответствуют характеристическим линиям кислорода (O1s), кальция (Ca2p), углерода (C1s) и фосфора (P2p), соответственно. Пики при 1194,09 эВ и 976,93 эВ соответствуют LMM оже-пику кальция (Ca) и KLL оже-пику кислорода (O). Явным доказательством присутствия замещений Mg и Sr в покрытиях, сформированных распылением мишеней Mg- и Sr- $\beta$ -ТКФ, являются пики при 1303,33 эВ (Mg1s) и 269,23 эВ (Sr3p). Пик,

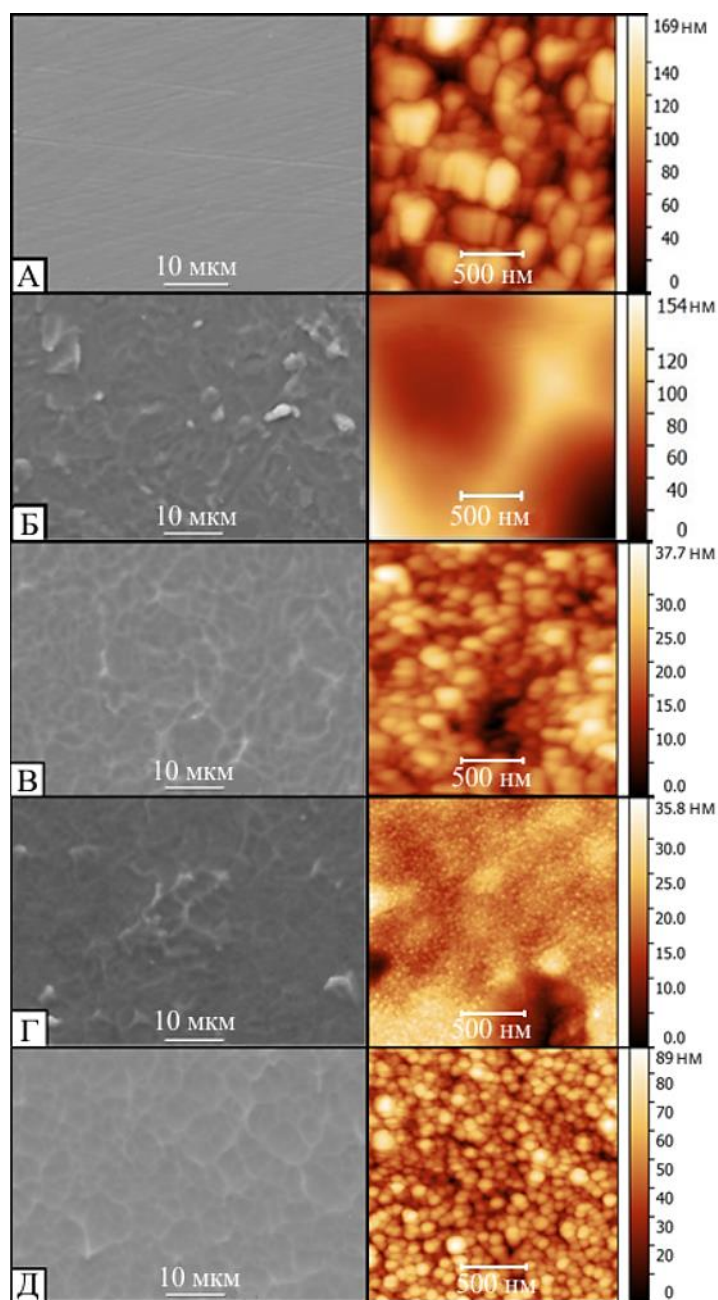


Рисунок 3.3 – СЭМ- (слева) и АСМ-изображения (справа) поверхности исследованных образцов: А – полированный титан, Б –  $\beta$ -ТКФ, В – Mg- $\beta$ -ТКФ, Г – Sr- $\beta$ -ТКФ; Д – Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ

соответствующий Sr3р, не наблюдается на РФЭС-спектре покрытий, сформированных распылением мишеней Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ. По-видимому, это обусловлено тем, что концентрация Sr ниже предела обнаружения прибора (0,1 ат.%). Присутствия других элементов в РФЭС-спектрах покрытий не обнаружено.

На фотоэлектронных спектрах высокого разрешения полученных с Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ, наблюдается небольшой сдвиг пиков Ca 2р и P 2р на 0,3 эВ в сторону более



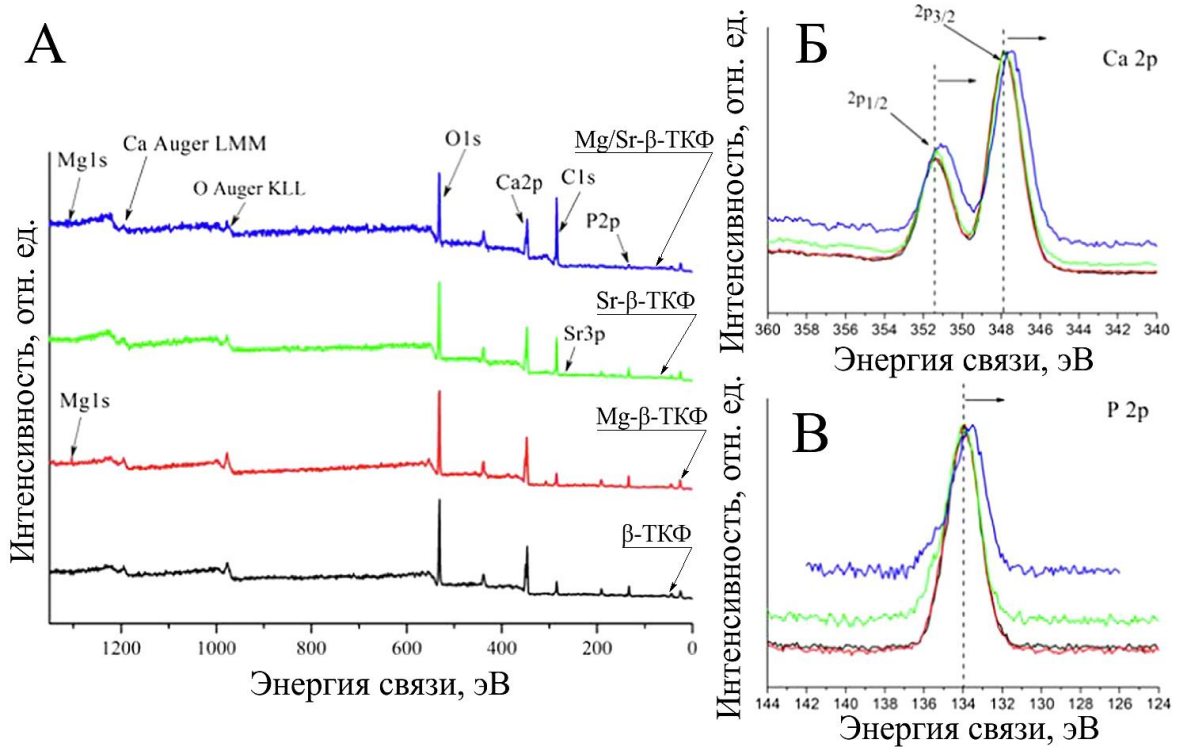


Рисунок 3.4 – Обзорный (А), Ca 2p (Б) и P 2p (В) РФЭС-спектры покрытий, сформированных распылением порошковых мишеней на основе β-ТКФ

поверхности покрытий, сформированных распылением мишени на основе низких энергий связи по сравнению с другими образцами (Рисунок 3.4б, в). Положение пика Ca 2p составляет 347,80 эВ, 347,79 эВ, 347,73 эВ и 347,50 эВ для образцов с покрытиями, сформированными распылением Mg-β-ТКФ, β-ТКФ, Sr-β-ТКФ и Mg/Sr-β-ТКФ мишеней, соответственно. Изменение энергии связи хорошо согласуется с тенденцией изменения скорости осаждения покрытий (Mg/Sr-β-ТКФ > Sr-β-ТКФ > β-ТКФ > Mg-β-ТКФ). Наибольшая скорость осаждения покрытий ( $48,6 \pm 1,5$  нм/ч для Mg/Sr-β-ТКФ) соответствует минимальной энергии связи, а самая низкая скорость осаждения покрытий ( $26,7 \pm 0,8$  нм/ч для Mg-β-ТКФ) соответствует максимальной энергии связи. Такая же, но менее выраженная тенденция, наблюдалась для значений энергий связи P 2p для различных образцов. Положение пика P 2p для образцов с покрытиями, сформированными распылением мишеней на основе Mg-β-ТКФ, β-ТКФ, Sr-β-ТКФ и Mg/Sr-β-ТКФ, составляет 133,99 эВ, 133,93 эВ, 133,99 эВ и 133,63 эВ, соответственно.

Энергия связи Ca 2p в диапазоне 347,50-347,80 эВ соответствует связи Ca–O [224–226]. В свою очередь, энергии связи P 2p в диапазоне 133,63-133,99 эВ соответствуют химической связи (–P=O) в PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> [226]. Приведенные выше данные указывают на то, что замещение атома кальция атомами магния и стронция влияет на длины связей Ca–O и P–O, что, в свою очередь, хорошо согласуется с данными компьютерного моделирования, приведенными в таблицах 3.1 и 3.2. С помощью компьютерного моделирования рассчитано изменение длин связей Ca–O и P–O и объема элементарной ячейки β-ТКФ при замещении атома кальция атомами магния и стронция, а также энергия дефектообразования. Для того чтобы сократить время расчета энергетических характеристик при моделировании, использовали ромбоэдрическую ячейку, содержащую 91 атом (рисунок 3.5). При этом атомы помещали в наиболее предпочтительные позиции для замещения, которыми для Mg являются Ca(5a) и Ca(5b), тогда как для Sr–Ca(4).

Расчет энтальпии образования идеального и с Mg и Sr замещениями в соединении β-ТКФ (в эВ в расчете на формульную единицу):

$$\Delta H = (E(\text{Ca}_{20}\text{Me}_1\text{P}_{14}\text{O}_{14}) - 20 * E(\text{Ca-bulk}) - 1 * E(\text{Me-bulk}) - 14 * E(\text{P-bulk}) - 56 * 0,5 * E(\text{O}_2)) / 7 \quad (3.1)$$

Таблица 3.1 – Среднее изменение длин связей Ca–O и P–O при замещении атома Ca атомами Mg и Sr, а также масса и объем расчетных ячеек, плотность соединения и энтальпия образования

Положение	без замещений	Mg		Sr
		Позиция примеси		
		Ca(5a)	Ca(5b)	Ca(4)
$\Delta d(\text{Ca-O}), \text{Å}$	–	–0,04	–0,05	+0,03
$\Delta d(\text{P-O}), \text{Å}$	–	–0,002	–0,001	+0,001
$m, \text{г}$	2171,24	2155,46		2218,78
$V, \text{Å}^3$	1151,06	1130,08	1140,89	1153,03
$\rho, \text{г/см}^3$	3,13	3,17	3,14	3,19
$\Delta H_f^f, \text{эВ/формула}$	-42,30	-42,14	-42,28	-42,32

Примечание: замещения помещались в наиболее предпочтительные позиции, определенные в [227].

Для создания компьютерной модели была выбрана ромбоэдрическая элементарная ячейка β-ТКФ с целью сокращения времени расчета энергетических характеристик. Атомная структура β-ТКФ хорошо описана в литературе [166,227]. Теоретические параметры решетки  $a = 13,741 \text{ Å}$  и  $\alpha = 44,32^\circ$ , что соответствует



$a = 10,366 \text{ \AA}$  и  $c = 37,108 \text{ \AA}$  для гексагональной ячейки, отличаются от экспериментальных параметров ( $a = 10,435 \text{ \AA}$  и  $c = 37,403 \text{ \AA}$  [228]) на  $<1\%$ . Расчетная энтальпия образования  $42,30 \text{ эВ}$  хорошо согласуется с экспериментальным значением  $42,71 \text{ эВ}$  [229].

Таблица 3.2 – Энергия образования дефекта

Соединение	Позиция замещения	$E_f$ , эВ	Matsunaga [227]
$\text{Ca}_{2,86}\text{Mg}_{0,14}(\text{PO}_4)_2$	Ca-5a	-0,78	-0,57
$\text{Ca}_{2,86}\text{Mg}_{0,14}(\text{PO}_4)_2$	Ca-5b	-0,87	-0,67
$\text{Ca}_{2,86}\text{Sr}_{0,14}(\text{PO}_4)_2$	Ca-4	-0,28	-0,36

Примечание: энергия образования дефекта замещения рассчитывалась по формуле [227]:

$$E_f = E(\text{defect}) - E(\text{ideal}) + \frac{1}{3}(E(\text{Ca}_{21}\text{P}_{14}\text{O}_{56})/7 - E(\text{Me}_{21}\text{P}_{14}\text{O}_{56})/7) \quad (3.2)$$

На рис. 3.5 показана ромбоэдрическая элементарная ячейка  $\beta$ -ТКФ. Один из двух эквивалентных атомов был удален из ячейки, так как занятость положения Ca(4) составляет 0,5 для стехиометрического соединения (экспериментальное значение 0,43 [166] соответствует небольшому обеднению кальцием). Положения атома кальция (Ca(1)–Ca(6)), за исключением Ca(4), делятся на две группы: положения, расположенные дальше от вакансии (обозначаются как а), и положения, расположенные ближе к вакансии (обозначается как b). В работе [227] показано, что наиболее предпочтительными положениями магниевого замещения являются Ca(5a) и Ca(5b), тогда как Ca(4) является предпочтительным положением замещения для стронция. Как показано здесь, использование более плотной сетки k-точек и другой схемы релаксации не приводит к изменению выявленных тенденций, но снижает энергию образования замещающего дефекта. Поэтому в последних расчетах основное внимание уделяется замещениям в наиболее предпочтительных позициях.

Замещение кальция атомами магния и стронция приводит к изменению объема расчетной ячейки, что существенно влияет на связи Ca–O, в то время как длины связей P–O практически не изменяются (табл. 3.1). В таблице 3.1 также показаны энтальпии образования как замещенного, так и незамещенного  $\beta$ -ТКФ. Данный параметр свидетельствует о том, что Sr-замещенный  $\beta$ -ТКФ

Таблица 3.3 – Длины связей Ca–O и замещение–O (Å) в  $\beta$ -ТКФ решетке с замещениями и без. Ближайшие к замещающему атому связи обозначены жирным шрифтом

Ca	O	незамещенный		Mg(5a)		Mg(5b)		Sr(4)	
		Ca(1a)	Ca(1b)	Ca(1a)	Ca(1b)	Ca(1a)	<b>Ca(1b)</b>	Ca(1a)	Ca(1b)
Ca(1)	O(6)	2,319	2,297	2,305	2,289	2,321	<b>2,288</b>	2,337	2,288
	O(5)	2,435	2,380	2,487	2,384	2,437	<b>2,423</b>	2,436	2,360
	O(8)	2,399	2,354	2,358	2,355	2,398	<b>2,327</b>	2,396	2,370
	O(4)	2,382	2,460	2,424	2,442	2,375	<b>2,507</b>	2,383	2,431
	O(9)	2,440	2,404	2,454	2,381	2,425	<b>2,421</b>	2,445	2,404
	O(4')	2,406	2,514	2,438	2,509	2,402	<b>2,521</b>	2,411	2,503
	O(3)	2,492	2,436	2,463	2,408	2,480	<b>2,452</b>	2,500	2,422
Ca(2)		Ca(2a)	Ca(2b)	Ca(2a)	<b>Ca(2b)</b>	Ca(2a)	Ca(2b)	Ca(2a)	Ca(2b)
	O(9)	2,373	2,348	2,347	<b>2,347</b>	2,390	2,324	2,372	2,347
	O(3)	2,290	2,341	2,299	<b>2,340</b>	2,304	2,369	2,293	2,339
	O(1)	2,545	2,349	2,523	<b>2,338</b>	2,520	2,349	2,474	2,347
	O(7)	2,376	2,400	2,359	<b>2,414</b>	2,402	2,401	2,388	2,389
	O(7')	2,399	2,412	2,400	<b>2,432</b>	2,405	2,403	2,392	2,411
	O(2)	2,356	2,456	2,358	<b>2,479</b>	2,361	2,455	2,345	2,548
O(5)	2,664	2,623	2,582	<b>2,615</b>	2,689	2,561	2,666	2,658	
Ca(3)		Ca(3a)	Ca(3b)	Ca(3a)	Ca(3b)	Ca(3a)	Ca(3b)	Ca(3a)	<b>Ca(3b)</b>
	O(3)	2,376	2,370	2,399	2,367	2,382	2,392	2,374	<b>2,370</b>
	O(5)	2,342	2,384	2,335	2,375	2,342	2,388	2,345	<b>2,384</b>
	O(6)	2,513	2,541	2,552	2,574	2,527	2,603	2,520	<b>2,518</b>
	O(8)	2,540	2,512	2,473	2,492	2,550	2,460	2,534	<b>2,501</b>
	O(10)	2,667	2,405	2,653	2,387	2,645	2,400	2,647	<b>2,387</b>
	O(2)	2,532	2,591	2,477	2,586	2,531	2,518	2,525	<b>2,649</b>
	O(8')	2,640	2,528	2,604	2,517	2,618	2,486	2,654	<b>2,524</b>
O(1)	2,512	2,634	2,502	2,574	2,485	2,696	2,538	<b>2,581</b>	
Ca(4)	O(1,1',1'')	Ca(4)		Ca(4)		Ca(4)		<b>Sr(4)</b>	
		2,372		2,380		2,330		<b>2,522</b>	
Ca(5)	O(4,4',4'')	Ca(5a)	Ca(5b)	<b>Mg(5a)</b>	Ca(5b)	Ca(5a)	<b>Mg(5b)</b>	Ca(5a)	Ca(5b)
	O(7,7',7'')	2,246	2,231	<b>2,049</b>	2,234	2,253	<b>2,057</b>	2,242	2,256
		2,270	2,264	<b>2,067</b>	2,269	2,278	<b>2,067</b>	2,273	2,276

характеризуется наибольшей термодинамической стабильностью при 0 К, Mg-замещенный же  $\beta$ -ТКФ, напротив, отличается менее стабильной структурой по сравнению с чистым  $\beta$ -ТКФ. Следует также отметить, что в реальных условиях эффект, оказываемый ионными замещениями, может отличаться ввиду отличия реальной температуры от 0 К. В то же время расчет энергии образования дефекта замещения в структуре  $\beta$ -ТКФ (табл. 3.2) показал, что внедрить Mg дефект легче, чем Sr. В совокупности с расчетами, представленными в таблицах 3.1 и 3.3, можно предположить, что внедрение Mg в структуру  $\beta$ -ТКФ приводит к уменьшению

объема элементарной ячейки, длин связей в ней и росту их сил. Sr замещения оказывают противоположный эффект. Данное предположение подтверждается результатами исследования скоростей осаждения покрытий на основе  $\beta$ -ТКФ, исходя из которых покрытия, содержащие Sr в своей структуре, характеризуются большей скоростью осаждения. Mg оказывает противоположный эффект.

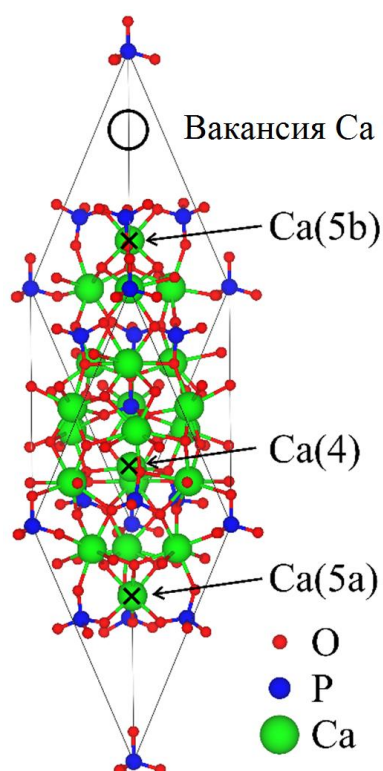


Рисунок 3.5 – Ромбоэдрическая ячейка соединения  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , содержащая 91 атом ( $\text{Ca}_{21}\text{P}_{14}\text{O}_{56}$ ) [110]

Следует отметить, что сдвиги пиков Ca 2р и P 2р, выявленные с помощью РФЭС, происходят на одинаковую величину, тогда как длины связей, оцененные с помощью компьютерного моделирования, показывают значительные изменения в связях Ca–O, а длина связей P–O остается в значительной степени неизменной (таблица 3.1). Это различие связано с тем, что данные РФЭС были получены с площади 650 мкм, а компьютерное моделирование показало изменения в ромбоэдрической структуре  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , содержащей 91 атом, с определенными допущениями. В таблице 3.3 представлены все длины связей Ca–O в расчетной ячейке как для замещенных, так и для незамещенных соединений.

В табл. 3.4 представлены элементные составы распыляемых мишеней и осаждаемых покрытий. В составе покрытий содержание кальция выше, чем в мишенях, что приводит к более высокому соотношению Ca/P в покрытиях по сравнению с осажденными покрытиями.

Таблица 3.4 – Концентрации химических элементов в мишенях и покрытиях, ат.%

Порошковые мишени						
Группа	Ca	P	O	Mg	Sr	Ca/P
β-ТКФ	16,00 ± 0,00	13,20 ± 0,03	70,26 ± 0,07	0,32 ± 0,03	0,22 ± 0,01	1,21 ± 0,01
Mg-β-ТКФ	15,15 ± 0,05	13,14 ± 0,02	70,12 ± 0,05	1,38 ± 0,00	0,21 ± 0,01	1,15 ± 0,01
Sr-β-ТКФ	16,23 ± 0,02	12,52 ± 0,03	70,27 ± 0,07	0,11 ± 0,01	0,87 ± 0,02	1,30 ± 0,01
Mg/Sr-β-ТКФ	14,97 ± 0,02	13,21 ± 0,05	69,8 ± 0,13	1,08 ± 0,19	0,94 ± 0,01	1,13 ± 0,01
Покрытия						
β-ТКФ	36,69 ± 2,15	17,36 ± 2,72	45,96 ± 4,84	–	–	2,14 ± 0,22
Mg-β-ТКФ	32,65 ± 1,77	18,35 ± 2,68	44,64 ± 4,05	4,35 ± 0,51	–	1,80 ± 0,17
Sr-β-ТКФ	35,81 ± 7,37	12,76 ± 3,10	48,91 ± 7,70	–	2,52 ± 1,67	2,94 ± 0,85
Mg/Sr-β-ТКФ	37,02 ± 0,55	19,46 ± 0,81	38,17 ± 1,24	3,69 ± 0,25	1,67 ± 0,17	1,9 ± 0,06

Приведенные выше результаты показывают, что элементный состав распыляемых мишеней значительно отличается от состава покрытий, что обусловлено различием в коэффициентах распыления элементов мишени.

Рентгенофазовый анализ (рис. 3.6) подтвердил, что термически обработанные порошки, из которых были приготовлены мишени, содержат в основном фазу β-ТКФ. В случае термически обработанных порошков β-ТКФ, Mg-β-ТКФ и Mg/Sr-β-ТКФ не было обнаружено пиков вторичных фаз, таких как ГАП, СаО, MgO или SrO, по крайней мере, в пределах чувствительности прибора (концентрация ~2 мас.%). Однако порошок Sr-β-ТКФ содержит небольшие примеси ГАП. Это может быть связано со стабилизирующим действием Sr на фазу ГАП [228,230]. Ионные радиусы Mg, Ca и Sr равны соответственно 0,72, 0,99 и 1,12 Å [231]. ГАП характеризуется большей по размеру катионной позицией по сравнению с β-ТКФ, и более крупный ион Sr<sup>2+</sup> лучше подходит для замещения Ca<sup>2+</sup> в решетке ГАП, чем в β-ТКФ [230]. При введении Mg и/или Sr в решетку β-ТКФ пики РФА смещаются относительно чистой фазы β-ТКФ, поскольку параметры

решетки изменяются. Образцы, обозначенные как Mg-β-ТКФ (рис. 3.6, б), демонстрируют значительные сдвиги пиков на  $0,19 \pm 0,03^\circ$  в сторону больших углов. Смещение дифракционных пиков в сторону большего угла  $2\theta$  с увеличением содержания Mg может свидетельствовать о том, что включение Mg в решетку β-ТКФ вызывает уменьшение размеров кристаллов [232]. В то время как для образцов Sr-β-ТКФ (рис. 3.6, г) наблюдались характерные сдвиги пиков на  $0,06 \pm 0,03^\circ$  в сторону несколько меньших углов, свидетельствующие об увеличении размеров кристаллов при внедрении Sr в структуру решетки β-ТКФ. Разница между ионными радиусами Sr и Ca (т.е.  $0,13 \text{ \AA}$ ) заметно меньше, чем разница между ионными радиусами Ca и Mg (т.е.  $0,27 \text{ \AA}$ ). Таким образом, Mg-содержащий β-ТКФ характеризуется значительно более сильными деформациями и искажениями структуры.

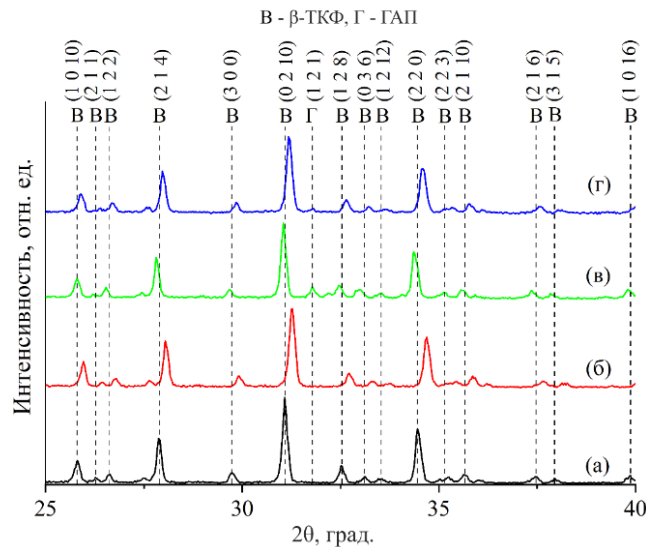


Рисунок 3.6 – Рентгенограммы чистых порошков β-ТКФ (а), порошков группы Mg-β-ТКФ (б), Mg/Sr-β-ТКФ (в) и Sr-β-ТКФ (г)

Результаты РФА были подтверждены данными, полученными методом БЭТ (Таблица 3.5). Измерения удельной площади поверхности показывают уменьшение размера частиц порошков β-ТКФ при наличии в них Mg и/или Sr замещений.

Покртия, сформированные распылением данных порошков, характеризуются аморфно-кристаллической структурой (Рисунок 3.7). На дифрактограммах присутствуют три небольших пика на углах  $2\theta=25,76^\circ$ ,  $27,78^\circ$  и

Таблица 3.5 – Результаты исследования порошков методом БЭТ: удельная площадь поверхности (УПП) и размер частиц ( $d_{\text{ВЕТ}}$ )

Группа	УПП, м <sup>2</sup> /г	$d_{\text{ВЕТ}}$ , нм
$\beta$ -ТКФ	$57,0 \pm 1,0$	34
Mg- $\beta$ -ТКФ	$72,3 \pm 0,6$	27
Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ	$65,7 \pm 1,1$	30
Sr- $\beta$ -ТКФ	$69,5 \pm 1,1$	28

$32,44^\circ$ , соответствующие отражениям от плоскостей (1 0 10), (214) и (0 2 10)  $\beta$ -ТКФ. Наиболее наглядно данные пики можно наблюдать на дифрактограмме покрытий, сформированных распылением мишени из чистого порошка  $\beta$ -ТКФ. На рентгенограммах покрытий, сформированных распылением мишеней из порошков Mg- и Sr-замещенного  $\beta$ -ТКФ, эти пики становятся либо заметно меньше, либо вообще исчезают. Уширение пика при  $2\theta = 40,17^\circ$  вызвано наложением пиков от плоскостей титана (101) и плоскостей (1 0 16)  $\beta$ -ТКФ.

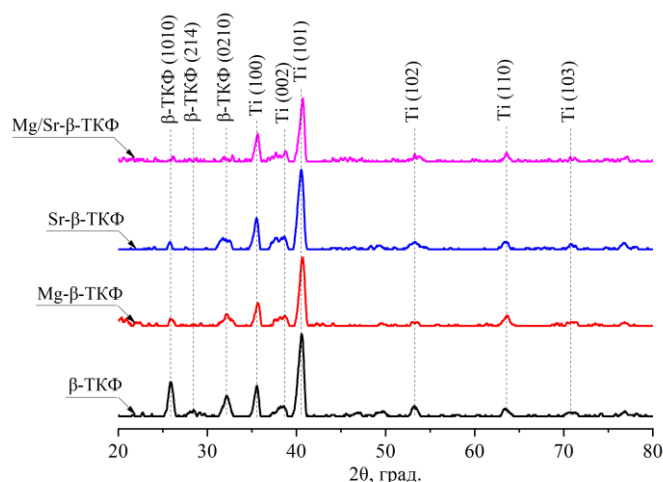


Рисунок 3.7 – Рентгеновские дифрактограммы покрытий, осажденных на титановых подложках методом ВЧМР порошковых мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ

Анализ данных, полученных методом наноиндентирования, показал, что кальций-фосфатные покрытия имеют более высокую твердость по сравнению с титановой подложкой (таблица 3.5). При этом следует отметить, что наименьшим значением величины нанотвердости среди КФ покрытий обладают покрытия, сформированные с помощью распыления Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ мишени. Значения нанотвердости образцов  $\beta$ -ТКФ, Mg- $\beta$ -ТКФ и Sr- $\beta$ -ТКФ примерно одинаковые. Все исследуемые образцы обладают примерно сопоставимыми значениями модуля

упругости за исключением покрытий, сформированных с помощью распыления Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ мишени. Модуль упругости последних несколько ниже по сравнению с другими образцами. По величине упругого восстановления отпечатка все исследуемые образцы также имеют сопоставимые значения.

Таким образом, исследуемые КФ покрытия обладают одновременно высокой твердостью и степенью упругого восстановления, что, несомненно, говорит о высоких эксплуатационных характеристиках покрытий.

Таблица 3.6 – Механические свойства исследуемых покрытий

Образцы	Нагрузка, мН	Максимальная глубина проникновения индентора, нм	Нанотвердость, ГПа	Модуль упругости, ГПа	Пластическое восстановление отпечатка, %
Подложка Ti	1	62 $\pm$ 8	4,8 $\pm$ 0,8	149 $\pm$ 26	62 $\pm$ 8
$\beta$ -ТКФ		32 $\pm$ 2	11,8 $\pm$ 1,1	145 $\pm$ 11	61 $\pm$ 4
Mg- $\beta$ -ТКФ		41 $\pm$ 6	7,2 $\pm$ 1,9	157 $\pm$ 29	66 $\pm$ 17
Sr- $\beta$ -ТКФ		38 $\pm$ 11	11,0 $\pm$ 3,2	145 $\pm$ 27	66 $\pm$ 11
Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ		49 $\pm$ 4	6,6 $\pm$ 0,9	93 $\pm$ 7	56 $\pm$ 5

Атомно-эмиссионная спектроскопия растворов покрытий выявила, что основной выход исследуемых элементов, а именно Ca, P, Mg и Sr, происходит в течение первых семи дней (Рисунок 3.8). Следует отметить, что в растворах покрытий, содержащих магний, наблюдается значительное сокращение выхода всех элементов. Напротив, в растворах покрытий, содержащих стронций, наблюдается увеличение растворимости по всем исследуемым элементам. С этим фактом связано более высокое соотношение Ca/P в растворах покрытий, содержащих стронций, и, наоборот, более низкое значение соотношения Ca/P в растворах покрытий, содержащих магний.

На основании полученных результатов можно сделать следующие предположения. Различная скорость осаждения исследуемых покрытий связана с влиянием магниевых и стронциевых замещений на кристаллическую структуру порошковых мишеней. Ozeki и др. [179] при распылении порошковых мишеней из различных кальций-фосфатных материалов наблюдал четкую корреляцию скорости осаждения покрытий и растворимости материала мишени.

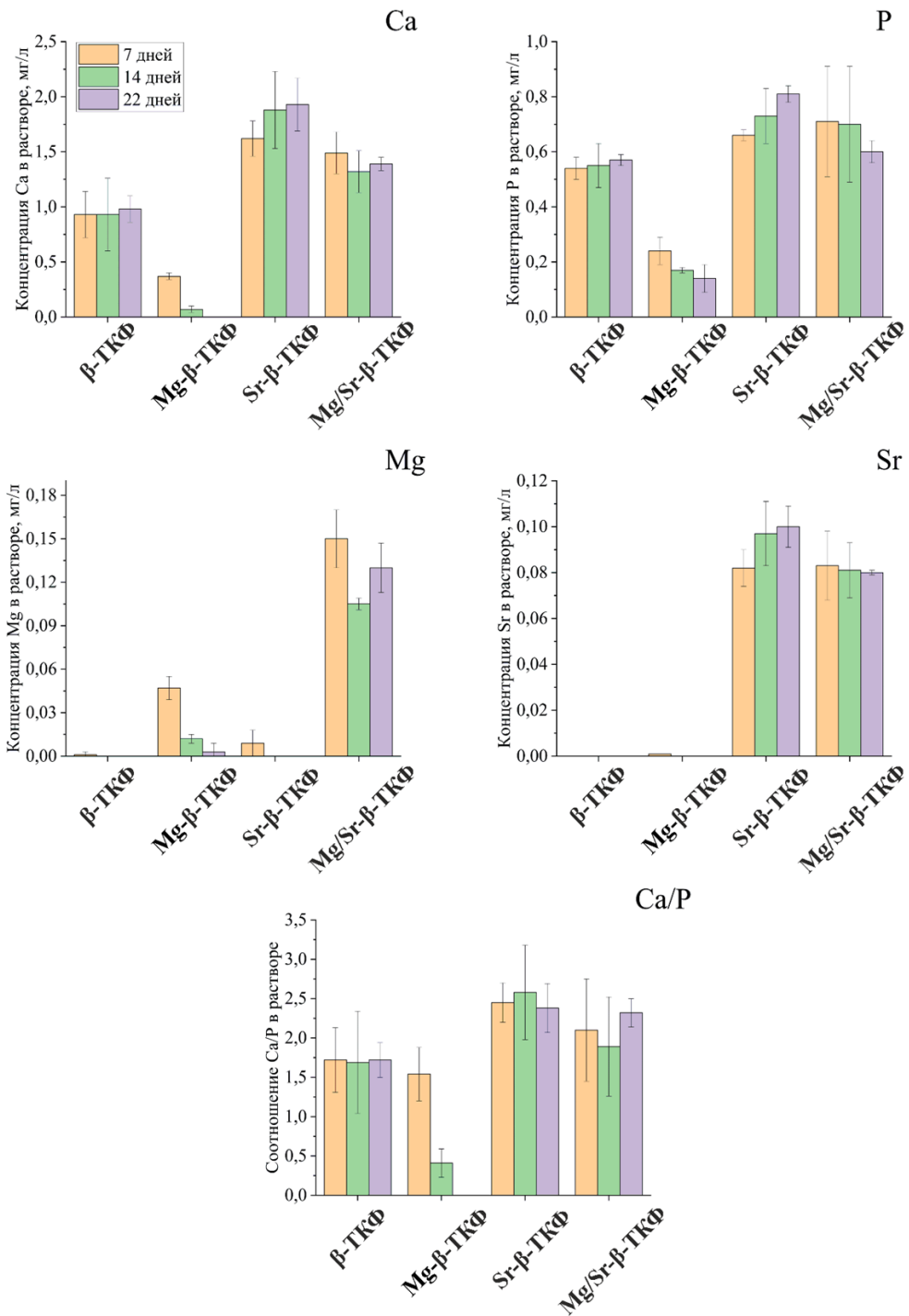


Рисунок 3.8 – Элементный анализ растворов покрытий

В работе было показано, что чем более растворимым являлся материал мишени, тем большей скоростью осаждения при распылении он характеризовался, и наоборот. Кроме того, авторы данной статьи также обнаружили, что наиболее растворимые материалы обладали наименьшей плотностью, и наоборот [179]. Это



указывает на то, что плотность материала также может влиять на скорость распыления мишени.

В данной работе при исследовании  $\beta$ -ТКФ мишеней с Mg и Sr замещениями корреляции между плотностью распыляемых порошков и скоростью осаждения покрытий не наблюдалось. Это связано с тем, что отмеченные ионные замещения влияют на плотность материала, изменяя как атомную массу, так и объем элементарной ячейки. Поэтому будет целесообразно рассматривать данные параметры по отдельности. Однако в работе прослеживается четкая взаимосвязь изменения объема элементарной ячейки со скоростью осаждения покрытий, осажденных методом ВЧМР.

Скорость осаждения покрытий увеличивается с увеличением объема элементарной ячейки распыляемого материала, и наоборот. Эти наблюдения связаны с изменением параметров элементарной ячейки  $\beta$ -ТКФ, вызванным наличием замещений.

При внедрении магния и стронция они занимают место кальция в кристаллической решетке [233]. Однако данные элементы имеют различные радиусы атомов. Поскольку атомный радиус стронция (215 пм) превышает соответствующий радиус кальция (197 пм), то при добавлении стронция в состав мишени размер элементарной ячейки  $\beta$ -ТКФ увеличивается, что видно из табл. 3.2. И напротив, радиус атома магния (160 пм) меньше, чем радиус атома кальция, что приводит к уменьшению объема элементарной ячейки  $\beta$ -ТКФ. Параметры элементарной ячейки чистого  $\beta$ -ТКФ:  $a = b = 10,435 \text{ \AA}$ ,  $c = 37,403 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = 90^\circ$  и  $\gamma = 120^\circ$  [228]. Kannan и др. [233] показали, что при концентрации магния, равной 10,5 мол.% в  $\beta$ -ТКФ, параметры решетки уменьшаются до 10,3375  $\text{\AA}$  (a) и 37,175  $\text{\AA}$  (c). Кроме того, авторы также показали, что при одновременном наличии магниевых и стронциевых замещений в структуре  $\beta$ -ТКФ в равной концентрации также происходит уменьшение параметров элементарной ячейки. Авторы объяснили это тем, что средний размер замещенных ионов  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  меньше, чем размер  $\text{Ca}^{2+}$ , который был замещен.

Следует подчеркнуть, что при внедрении замещений с большим атомным номером из таблицы Менделеева увеличивается не только объем, но и масса кристалла, тогда как замещения с меньшим атомным номером, чем замещаемый элемент, приводят к уменьшению данных характеристик. Расчеты показали (таблица 3.2), что при замещении одного атома кальция одним атомом Sr происходит увеличение массы кристалла на 2,19%, в то время как объем элементарной ячейки увеличивается на 0,17%. Таким образом, при одновременном изменении этих параметров изменение массы будет оказывать большее влияние на плотность материала. Поэтому наличие стронциевых замещений в структуре  $\beta$ -ТКФ приводит к увеличению его плотности. В случае замещения атома кальция атомом магния происходит одновременное уменьшение как массы кристалла, так и объема элементарной ячейки. При этом масса изменяется на 0,73%, а объем на 1,82 и 0,88% при нахождении замещения в 5a и 5b позициях, соответственно. Плотность Mg-замещенного  $\beta$ -ТКФ увеличивается, поскольку уменьшение объема больше, чем уменьшение массы. На плотность материала влияет масса заменяемого атома, объем элементарной ячейки и молярные концентрации ионных замещений.

Следует также отметить, что стронций может замещать ионы кальция в решетке  $\beta$ -ТКФ вплоть до 80 ат.%, в то время как магний может замещать ионы кальция только до 16 ат.% [234]. Последнее обусловлено тем, что ионы стронция способны замещать кальций в четырех позициях в кристаллической решетке, а именно (Ca(1)-Ca(4)), в то время как магний замещает кальций только в одной позиции Ca(5) [233]. Более того, согласно проведенному моделированию (Таблица 3.2), показано, что величина энергии образования дефекта замещения Sr много меньше, чем при замещении атома Ca атомом Mg.

Анализ результатов атомно-эмиссионной спектроскопии растворов порошков показал, что магниевые замещения способствуют стабилизации кристаллической структуры  $\beta$ -ТКФ, тем самым снижая его растворимость. Стронций же, напротив, оказывает дестабилизирующий эффект. При этом при одновременном присутствии как Mg, так и Sr замещений в сопоставимых

концентрациях дестабилизирующий эффект стронция превосходит стабилизирующий эффект магния. Вышеотмеченное в совокупности с тем, что при добавлении стронция значительно возрастает скорость распыления мишени, указывает на уменьшение плотности Sr- $\beta$ -ТКФ по сравнению с  $\beta$ -ТКФ.

Такое противоречие теоретических расчетов и эксперимента может иметь два объяснения: 1) добавление стронция индуцирует фазовый переход  $\beta$ -ТКФ в какую-то другую менее плотную фазу, однако этого не наблюдается в эксперименте; 2) стронций индуцирует образование атомных вакансий. Известно, что в этом случае масса изменяется сильнее, чем объем, поэтому плотность понижается. Насколько нам известно, в настоящее время отсутствуют работы, в которых теоретическими или экспериментальными методами изучалось влияние замещений на энергии образования точечных дефектов. Поэтому данный вопрос остается открытым.

Стабилизирующий эффект Mg замещений и дестабилизирующий Sr замещений можно объяснить, проанализировав изменение длин связей Ca–O и P–O в кристаллической решетке при замещении атома Ca. Результаты расчетов, полученных с помощью компьютерного моделирования, показали уменьшение длин связей при внедрении магниевых замещений. При внедрении стронциевых замещений наблюдался противоположный эффект.

Если рассматривать усредненные значения изменения длин связей Ca–O и P–O в кристаллической решетке (Таблица 3.2), то изменения кажутся незначительными. Расчеты энтальпии образования идеального и с Mg и Sr замещениями соединения  $\beta$ -ТКФ также не выявили существенных различий (Таблица 3.2). Как известно, разрушение кристаллической решетки начинается с нарушения целостности самых слабых связей. Поэтому изменения длин связей были проанализированы локально. Выявлено, что наибольшие отклонения наблюдаются в связях кислорода с атомом замещения и ближайших к замещению атомов Ca. Напомним, что при моделировании замещался лишь один из 21 атома кальция, тогда как в реальном веществе плотность дефектов замещения может быть значительно выше. Кроме того, замещения помещались в наиболее энергетически

предпочтительные позиции. Тем не менее данные расчеты позволяют выявить общую тенденцию изменения длин связей в кристаллической решетке при замещении Са атомами Mg и Sr в структуре  $\beta$ -ТКФ и подтвердить индуцированное стронцием ослабление химических связей.

### **3.2. Кальций-фосфатные покрытия, сформированные ВЧ-магнетронным распылением Sr и Mg-замещенных ГАП мишеней**

Оптические спектры плазмы, снятые в процессе распыления на основе ГАП (рис. 3.9), также представлены атомарными и молекулярными ионами, соответствующими составу распыляемой мишени и рабочего газа. Спектры, соответствующие распылению мишеней на основе ГАП, характеризуются более высокой интенсивностью пиков частиц мишени по сравнению со спектрами на основе  $\beta$ -ТКФ (рис. 3.1). Спектры ГАП, Mg-ГАП и Sr-ГАП содержат интенсивный пик, соответствующий  $H_2$ . Наличие молекулярного водорода объясняется разложением гидроксиапатита, в то время как  $\beta$ -трикальцийфосфат не содержит водорода, поэтому в спектрах, полученных при распылении  $\beta$ -ТКФ, Mg- $\beta$ -ТКФ и Sr- $\beta$ -ТКФ, этот пик отсутствует (рис. 3.1). CaO и PO являются наиболее интенсивными пиками среди пиков, соответствующих частицам мишени.

Исследование толщины КФ покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением порошковых Mg- и Sr-замещенных ГАП-мишеней, показало, что концентрации ионных замещений в структуре мишеней недостаточно для возникновения статистически достоверных отличий в скорости формирования покрытий (Таблица 3.7). В то же время аналогичные концентрации данных ионных замещений в структуре  $\beta$ -ТКФ вызывают существенные изменения данного параметра. Это явление можно объяснить различием в структуре кристаллической решетки ГАП и  $\beta$ -ТКФ.

Согласно нашим экспериментальным данным, количество Mg замещений в мишени группы Mg-ГАП было недостаточным, чтобы вызвать значительные изменения параметров решетки. Эти результаты подтверждаются работой [44], в

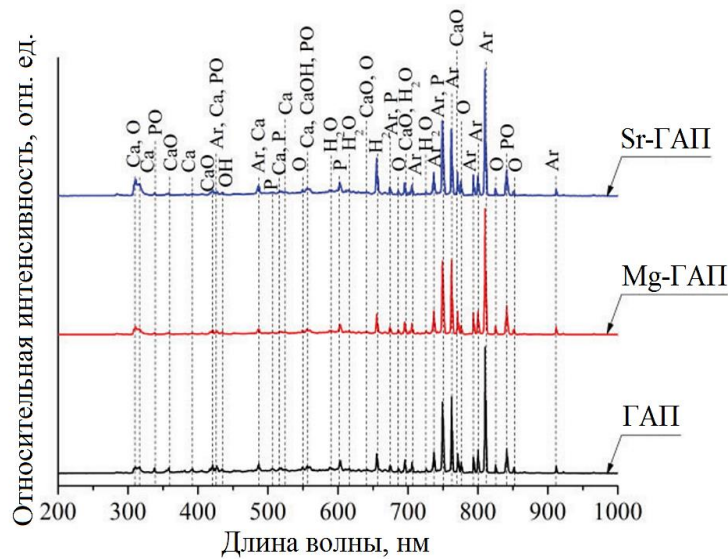


Рисунок 3.9 – Спектры оптического излучения плазменных разрядов, полученные при распылении мишеней на основе ГАП

различий в параметрах решетки чистого ГАП и Mg-замещенного ГАП при концентрации Mg, сопоставимой с используемой в нашей работе. По всей видимости, Sr замещения в структуре  $\beta$ -ТКФ вызывает большие изменения параметров решетки, чем в ГАП, потому что решетка ГАП содержит больше места под катион по сравнению с  $\beta$ -ТКФ [230]. Это предположение объясняет, почему одинаковое количество Sr в  $\beta$ -ТКФ и ГАП увеличивает скорость нанесения покрытий на основе  $\beta$ -ТКФ и не влияет на скорость нанесения покрытий на основе ГАП.

Таблица 3.7 – Толщина и скорость осаждения покрытий, образованных ВЧ-магнетронным распылением порошковых мишеней на основе чистого, а также Mg- и Sr-замещенного ГАП

Группа	Толщина, нм	Скорость осаждения, нм/ч
ГАП	1045 ± 5	149±1
Mg-ГАП	912 ± 114	130±16
Sr-ГАП	873 ± 80	125±11

Анализ морфологии поверхности с помощью атомно-силовой микроскопии выявил, что исходная титановая подложка характеризуется наличием неглубоких следов, оставшихся от ее полировки (Рисунок 3.10а). Покрытия, сформированные распылением ГАП-мишени, характеризуются сферическими зёрнами площадью 0,010 мкм<sup>2</sup> (Рисунок 3.10б). На поверхности КФ покрытий, сформированных

распылением Mg-ГАП, имеются мелкие зерна размером  $0,005 \text{ мкм}^2$  (Рисунок 3.10в). Покрытия, сформированные распылением мишени Sr-ГАП (Рисунок 3.10г), характеризуются агломератами сложной формы, состоящими из зерен, средняя площадь которых составляет  $0,018 \text{ мкм}^2$ .

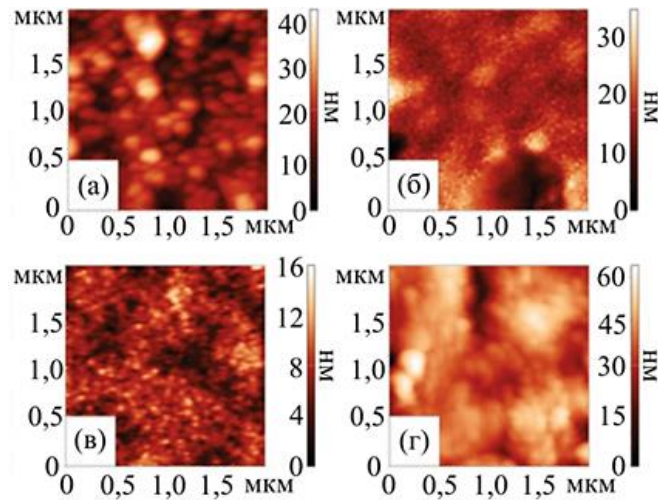


Рисунок 3.10 – АСМ-изображения исходной подложки (а); поверхности покрытия, сформированного распылением чистого ГАП (б) и Mg- и Sr-замещенного ГАП (в и г, соответственно)

Все исследуемые покрытия характеризуются более низким содержанием кислорода по сравнению с составом исходных мишеней (табл. 3.8). Последнее можно объяснить рассеянием этого элемента на пути от мишени к подложке вследствие столкновений с другими частицами. Покрытия, осажденные распылением чистого и замещенного ГАП, характеризуются более низким значением соотношения Ca/P по сравнению с соответствующими исходными порошковыми мишенями.

Рентгенофазовый анализ порошковых мишеней показал, что Mg и Sr замещения приводят к сдвигу пиков в сторону меньших углов на  $0,33 \pm 0,04^\circ$  и  $0,21 \pm 0,04^\circ$ , соответственно (рисунок 3.11, а). Дифрактограмма порошка Mg-ГАП также содержит пики, соответствующие витлокиту  $\text{Ca}_{2,59}\text{Mg}_{0,41}(\text{PO}_4)_2$ . Согласно дифрактограммам покрытий, Mg и Sr замещения уменьшают кристалличность покрытий, образованных распылением ионно-замещенных мишеней на основе ГАП. Преимущественной кристаллической ориентацией сформированных

Таблица 3.8 – Элементный состав распыляемых мишеней и осажденных покрытий, ат.%

Группа	Ca	P	O	Mg	Sr	Ti	Al	Ca/P
Ti подложка	–	–	–	–	–	90,27±0,42	9,73±0,42	–
ГАП порошок	13,80±0,24	8,65±0,49	77,54±0,70	–	–	–	–	1,60±0,07
ГАП покрытие	15,98±0,07	12,12±0,06	69,50±0,16	–	–	2,22±0,12	0,18±0,03	1,32±0,01
Mg-ГАП порошок	11,85±0,40*	9,02±0,31	78,20±0,04	0,93±0,13*	–	–	–	1,32±0,09*
Mg-ГАП покрытие	14,02±0,75†	12,18±0,68	71,30±1,75†	1,35±0,45†	–	0,80±0,05†	0,35±0,13†	1,15±0,01†
Sr-ГАП порошок	11,50±0,39*	8,64±0,12	79,38±0,47*	–	~0,47*	–	–	1,33±0,04*
Sr-ГАП покрытие	14,49±0,09†	12,41±0,08†	70,38±0,47†	–	0,46±0,02†	2,10±0,48	0,17±0,05	1,17±0,01†

\* достоверные отличия между чистыми и замещенными порошками ( $p < 0,05$ );

† достоверные отличия между чистыми и замещенными покрытиями ( $p < 0,05$ ).

покрытий является ориентация (002) (рисунок 3.11, б). Данная кристаллическая ориентация является наиболее энергетически выгодной по сравнению с другими [235].

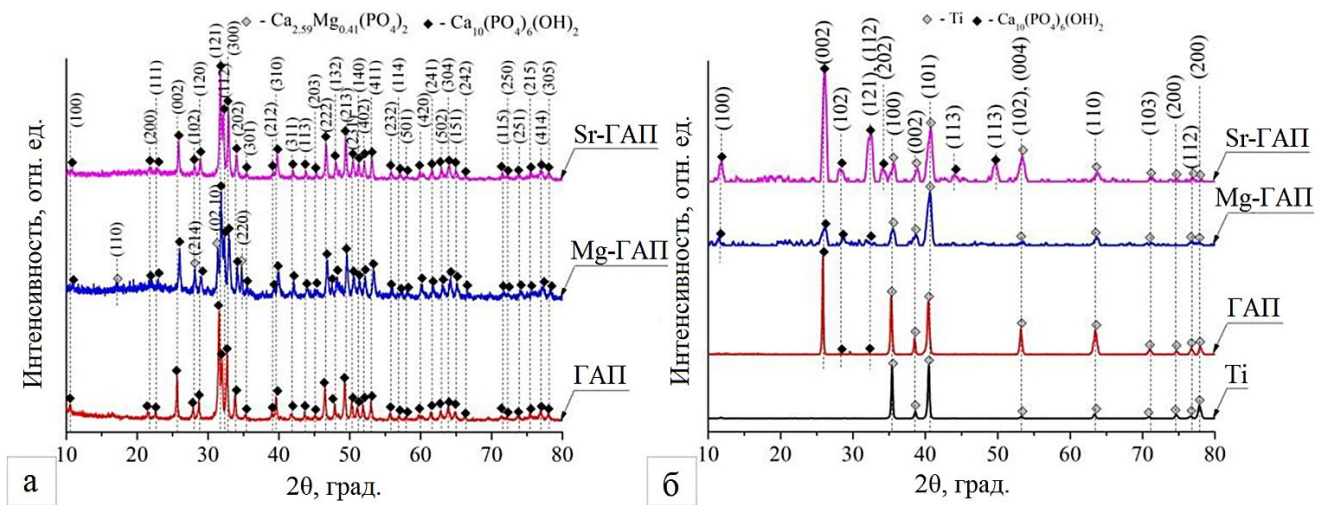


Рисунок 3.11 – Дифрактограммы порошковых ГАП-мишеней (а) и ГАП-покрытий (б)

Таблица 3.9 – Краевые углы смачивания исследуемых покрытий водой ( $\theta_w$ ), глицерином ( $\theta_g$ ) и диметилформамидом ( $\theta_d$ ), СЭП ( $\sigma$ ), дисперсионная ( $\sigma_D$ ) и полярная ( $\sigma_P$ ) составляющие СЭП

Группа	$\theta_w$ , град.	$\theta_g$ , град.	$\theta_d$ , град.	$\sigma$ , мДж/м <sup>2</sup>	$\sigma_D$ , мДж/м <sup>2</sup>	$\sigma_P$ , мДж/м <sup>2</sup>
Подложка	72,50 ± 3,88	61,10 ± 1,52	28,20 ± 0,73	34,39 ± 0,76	20,28 ± 0,33	14,12 ± 0,43
ГАП	47,90 ± 0,92	51,30 ± 2,05	43,30 ± 2,48	53,80 ± 0,79	6,09 ± 0,26	47,71 ± 0,53
Mg-ГАП	48,60 ± 1,28	49,50 ± 4,72	31,30 ± 3,64*	51,39 ± 1,32*	8,92 ± 0,52*	42,47 ± 0,80*
Sr-ГАП	44,40 ± 3,88	60,60 ± 2,10*	36,40 ± 3,83*	58,26 ± 1,67*	3,01 ± 0,31*	55,25 ± 1,36*

\* достоверное отличие от группы ГАП ( $p < 0,05$ ).

Осаждение на титановую поверхность КФ покрытий приводит к уменьшению краевого угла смачивания поверхности водой и тем самым последняя становится более гидрофильной по сравнению с исходной подложкой (Таблица 3.9). Углы смачивания исследуемых покрытий водой существенно не различаются. Для всех исследуемых покрытий преобладает полярная составляющая СЭП по сравнению с дисперсионной. Высокое значение этого компонента может способствовать лучшей пролиферации клеток и остеоинтеграции [236]. Таким образом, есть основания полагать, что наличие Sr-замещений в структуре ГАП-покрытия повышает его биоактивность.

### 3.3. Выводы по главе

1) Исследование влияния магниевых (с концентрацией  $1,38 \pm 0,01$  ат.%) и стронциевых (с концентрацией  $0,87 \pm 0,02$  ат.%) замещений в структуре  $\beta$ -ТКФ мишени на скорость осаждения покрытий показало, что наличие стронция значительно увеличивает скорость осаждения покрытий, в то время как магний, напротив, снижает этот параметр. Это объясняется изменением объема элементарной ячейки  $\beta$ -ТКФ, вызванным внедрением ионных замещений в ее структуру. Магниевые замещения уменьшают объем элементарной ячейки и, соответственно, уменьшают длину ионной связи между атомом замещения и атомом кислорода, тем самым увеличивая ее силу. Стронциевые замещения оказывают противоположное влияние. При распылении кальций-фосфатной мишени, одновременно содержащей как магниевые (с концентрацией  $1,08 \pm 0,19$  ат.%) так и стронциевые (с концентрацией  $0,94 \pm 0,01$  ат.%) замещения, скорость осаждения также увеличивается относительно распыления чистого порошка  $\beta$ -ТКФ и Mg- $\beta$ -ТКФ. Это связано с тем, что Sr оказывает больший эффект на кристаллическую решетку, поскольку способен замещать кальций в четырех ее позициях против одной позиции, которую может замещать Mg.

2) Компьютерное моделирование ромбоэдрической ячейки  $\beta$ -ТКФ без и с замещениями продемонстрировало, что наибольшие изменения длин связей



происходят между атомом кислорода и атомом замещения, а также ближайшими к замещению атомами кальция, в то время как усредненные значения изменения длин связей Ca–O и P–O по всему объему расчётной кристаллической решетки являются несущественными.

3) С помощью атомно-эмиссионной спектроскопии продемонстрировано увеличение растворимости покрытий, сформированных распылением мишеней Sr- $\beta$ -ТКФ и Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ. Это обусловлено дестабилизирующим эффектом атомов Sr на кристаллическую решетку  $\beta$ -ТКФ, связанным с изменением длин связей.

4) Никаких статистически достоверных отличий в скорости формирования покрытий, осаждаемых распылением порошковых Mg- и Sr-замещенных мишеней из ГАП с концентрацией замещающих элементов  $0,93 \pm 0,13$  ат.% и  $\sim 0,47$  ат.%, соответственно, обнаружено не было.

#### **4. ВЛИЯНИЕ РАБОЧЕГО ГАЗА НА СКОРОСТЬ ОСАЖДЕНИЯ, МОРФОЛОГИЮ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ, МЕХАНИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ ПОКРЫТИЙ, СФОРМИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ВЧМР**

##### **4.1. Закономерности ВЧ-магнетронного распыления твердотельной ГАП мишени и осаждения кальций-фосфатных покрытий в среде различных инертных рабочих газов**

Результаты исследования оптических спектров плазмы, снятые в процессе ВЧ-магнетронного распыления твердотельной мишени из ГАП в различных инертных газах, представлены на рис. 4.1. Как и при распылении Mg- и Sr-замещенных порошковых мишеней, рассмотренных в предыдущей главе (рис. 3.1 и 3.9), оптические спектры представлены пиками, характерными атомарным и молекулярным частицам распыляемой мишени и рабочих газов. По мере увеличения атомной массы рабочего газа наблюдается снижение интенсивности пиков, характерных частицам распыляемой мишени, что свидетельствует о снижении энергии бомбардирующих частиц. Это наблюдение обусловлено снижением подвижности ионов рабочего газа в электромагнитном поле по мере увеличения их массы. Энергия частицы пропорциональна массе и квадрату ее скорости, соответственно, влияние снижения ее скорости превосходит влияние увеличения массы. Таким образом, можно сделать вывод о том, что с увеличением атомной массы рабочего газа происходит снижение энергии частиц в плазме, что также приводит к снижению тепловой нагрузки на подложку. Данное утверждение хорошо согласуется с данными других авторов [202].

На процесс распыления многокомпонентной мишени в атмосфере различных газов оказывает влияние множество факторов. Согласно теории линейных каскадов парных упругих столкновений Зигмунда для диапазона энергий бомбардирующих ионов  $E < 1$  кэВ, коэффициент распыления  $Y$  описывается следующим уравнением [237]:

$$Y = \frac{3}{4\pi^2} \left( \frac{4M_1M_2}{(M_1+M_2)^2} \right) \frac{E}{U_s'} \quad (4.1)$$

где  $M_1$  – масса бомбардирующей частицы,  $M_2$  – масса распыляемой частицы,  $E$  – энергия бомбардирующей частицы,  $U_s$  – поверхностная энергия связи частиц распыляемой мишени.

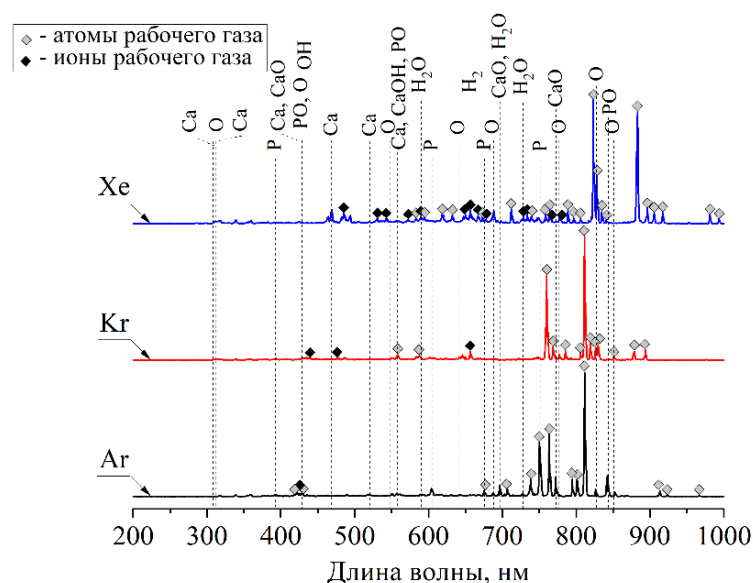


Рисунок 4.1 – Оптические спектры плазмы, снятые при распылении твердотельной ГАП-мишени в атмосфере различных инертных газов

На основании вышепредставленного уравнения можно утверждать, что при исследовании влияния инертного рабочего газа на распыление мишени из гидроксиапатита  $Y$  является функцией  $M_1$ ,  $M_2$  и  $E$ . Поскольку мы исследуем распыление одной и той же мишени,  $U_s$  можно принять как константу.

Вычленим и проанализируем из уравнения (4.1) компоненту  $\gamma = \frac{4M_1M_2}{(M_1+M_2)^2}$ . В зависимости от значений  $M_1$  и  $M_2$  она может принимать значения от 0 до 1 и для каждой пары ион рабочего газа/распыляемый атом является константой. Физическим смыслом данной компоненты является доля передаваемой энергии от бомбардирующей частицы к распыляемой при абсолютно упругом соударении. Столкновение данных частиц можно считать упругим, поскольку они не вступают в химическое взаимодействие ввиду инертности рабочего газа. Следует отметить,

что максимальные значения данная константа принимает в случае, когда  $M_1 = M_2$ . Иными словами, чем больше разница между массой бомбардирующей частицы и распыляемой, тем меньшая доля энергии передается при ударе. Более наглядно это представлено на рисунке 4.2.

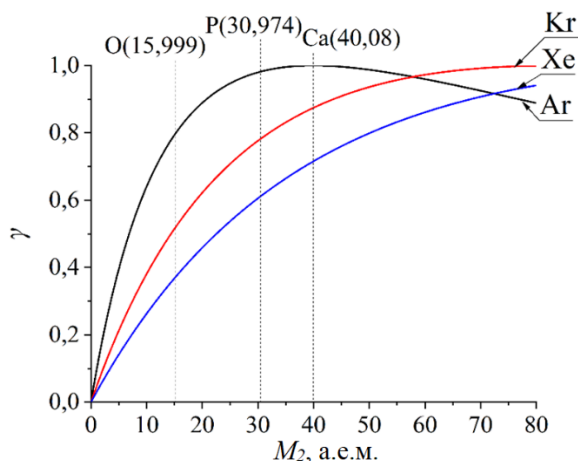


Рисунок 4.2 – Зависимость доли передаваемой энергии ( $\gamma$ ) бомбардирующей частицы к распыляемой от массы распыляемой частицы ( $M_2$ ) при абсолютно упругом соударении ( $M_I(\text{Ar}) = 39,948$  а.е.м.,  $M_I(\text{Kr}) = 83,798$  а.е.м.,  $M_I(\text{Xe}) = 131,293$  а.е.м.)

Распыляемая мишень из ГАП состоит из таких элементов, как кальций (Ca), фосфор (P), кислород (O) и водород (H). Поскольку водород трудно детектировать в покрытии, мы не будем его здесь рассматривать. Из рисунка 4.2. следует общая тенденция на уменьшение доли передаваемой энергии при увеличении атомной массы рабочего газа. В порядке убывания относительно доли передаваемой энергии рабочие газы расположились следующим образом:

- для O: Ar ( $\gamma = 0,817$ ) > Kr ( $\gamma = 0,538$ ) > Xe ( $\gamma = 0,387$ );
- для P: Ar ( $\gamma = 0,984$ ) > Kr ( $\gamma = 0,788$ ) > Xe ( $\gamma = 0,618$ );
- для Ca: Ar ( $\gamma = 1,000$ ) > Kr ( $\gamma = 0,875$ ) > Xe ( $\gamma = 0,717$ ).

Можно предположить, что по мере увеличения атомной массы инертного рабочего газа при распылении ГАП наблюдается снижение скорости осаждения КФ покрытий на основании того, что помимо вышеописанной компоненты  $\gamma$  в формуле (4.1) единственной переменной является  $E$  ( $U_s$  – не изменяется поскольку использовалась одна и та же мишень), от которой  $Y$  зависит линейно.

Кроме того, следует отметить, что существует энергетический порог распыления, который можно оценить из полуэмпирического соотношения, предложенного Seah [238] и Yamamura [193] и выведенного из скорректированной модели Зигмунда [239].

$$\frac{E_{th}}{U_s} = 1,9 + 3,8 \left( \frac{M_1}{M_2} \right) + 0,134 \left( \frac{M_2}{M_1} \right)^{1,24}, \quad (4.2)$$

где  $E_{th}$  – пороговая энергия распыления.

Поскольку  $U_s$  является константой, то, если мы домножим левую и правую части уравнения (4.2) на нее, форма кривых на рисунке 4.3, а следовательно, закономерности между  $E_{th}(M_1, M_2)$  для каждой пары «рабочий газ»/«распыляемый элемент» не изменятся.

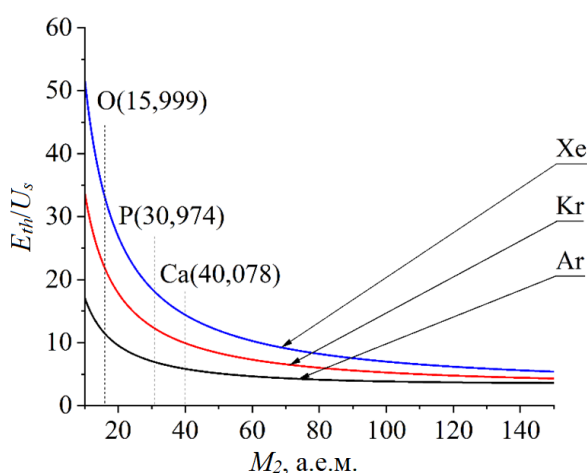


Рисунок 4.3 – Зависимость отношения пороговой энергии распыления к поверхностной энергии связи ( $E_{th}/U_s$ ) от массы распыляемой частицы  $M_2$  для каждого из исследуемых инертных рабочих газов  $M_1$  ( $M_1(\text{Ar}) = 39,948$  а.е.м.,  $M_1(\text{Kr}) = 83,798$  а.е.м.,  $M_1(\text{Xe}) = 131,293$  а.е.м.)

В порядке убывания относительно соотношения ( $E_{th}/U_s$ ) рабочие газы расположились следующим образом:

- для O: Xe ( $E_{th}/U_s = 33,092$ ) > Kr ( $E_{th}/U_s = 21,819$ ) > Ar ( $E_{th}/U_s = 11,431$ );
- для P: Xe ( $E_{th}/U_s = 18,032$ ) > Kr ( $E_{th}/U_s = 12,221$ ) > Ar ( $E_{th}/U_s = 6,899$ );
- для Ca: Xe ( $E_{th}/U_s = 14,379$ ) > Kr ( $E_{th}/U_s = 9,899$ ) > Ar ( $E_{th}/U_s = 5,822$ ).

Таким образом, по мере увеличения атомной массы инертного рабочего газа увеличивается пороговая энергия выбивания каждого из элементов, причем чем

больше разница между  $M_1$  и  $M_2$ , тем выше  $E_{th}$ , а значит, коэффициент распыления ниже, что было также убедительно показано на рис. 4.2.

Для проверки гипотезы о снижении коэффициента распыления ГАП по мере увеличения атомной массы инертного рабочего газа было проведено моделирование процесса распыления мишени в различных инертных газах на диапазоне энергий бомбардирующих частиц 400-1000 эВ при помощи ПО SRIM/TRIM-2013. Следует отметить, что данное ПО моделирует распыление мишени на основе метода Монте-Карло, который опирается на допущение о незначительности сил межатомного взаимодействия по сравнению с энергией бомбардирующих частиц. Коэффициент распыления ГАП мишени был рассчитан как сумма коэффициентов распыления его элементов (Ca, P, O, H). На рисунке 4.4 представлены результаты моделирования.

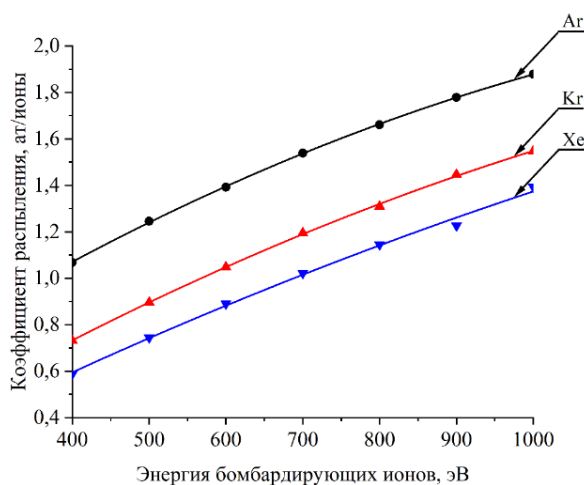


Рисунок 4.4 – Зависимость коэффициента распыления ГАП от энергии бомбардирующих частиц для различных инертных рабочих газов

На основании результатов моделирования можно утверждать, что на всем диапазоне энергий бомбардирующих ионов коэффициент распыления ГАП уменьшается по мере увеличения атомной массы рабочего газа. Зависимость коэффициента распыления мишени в каждом из газов от энергии бомбардирующих ионов близка к линейной. Поскольку оба данных наблюдения коррелируют с формулой (4.1), можно утверждать, что проведенное моделирование отражает эффективность распыления мишени в каждом из газов.

Результаты теоретических расчетов хорошо коррелируют с полученными экспериментальными данными (Таблица 4.1). Так, КФ покрытия, сформированные в среде различных инертных рабочих газов, характеризуются разной толщиной, что свидетельствует о том, что осаждение покрытий происходит с различной скоростью. Наибольшей скоростью осаждения и, следовательно, толщиной характеризуются покрытия, сформированные в Ar и Kr. Наименьшей скоростью осаждения и, следовательно, толщиной характеризуются покрытия, сформированные в Хе.

Таблица 4.1 – Результаты исследования скоростей осаждения и толщин покрытий.

Группа	Скорость осаждения, нм/ч	Толщина покрытий, нм
†Ar	$287 \pm 11$	$2010 \pm 80$
†Kr	$279 \pm 4$	$1920 \pm 30$
†Xe	$169 \pm 19$	$1180 \pm 130$

† Кальций-фосфатные покрытия на титановой подложке, сформированные в среде Ar, Kr и Хе, соответственно.

Анализ литературных источников показал, что выбор инертного рабочего газа также оказывает существенное влияние на энергию бомбардирующих ионов. В работе [202] проводилось исследование плазменного разряда в процессе распыления серебряной мишени в атмосфере Ne, Ar и Kr. Методом масс-спектропии было измерено распределение энергии бомбардирующих ионов при рабочем давлении 3 Па и мощности 50 Вт (рис. 4.5).

Согласно вышепредставленному распределению, максимумы распределения энергий для данных газов смещаются в сторону меньших значений энергий при увеличении атомной массы инертного рабочего газа. Вторичные максимумы и “хвост”, которые можно наблюдать в энергетическом распределении ионов при более низких энергиях, можно отнести к низкоэнергетическим (тепловым) ионам. Различие в положении пика энергии ионов в разрядах Ne и Ar или Kr может быть связано с более высокими значениями плазменного и плавающего потенциала, а также температуры электронов в разряде Ne по сравнению с разрядами Ar и Kr

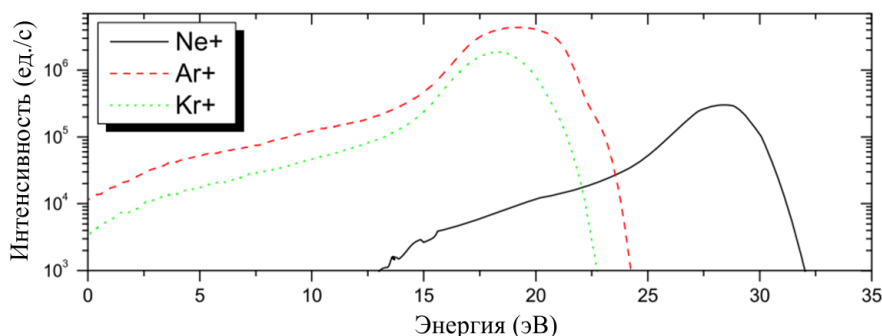


Рисунок 4.5 – Распределение энергий бомбардирующих ионов при распылении Ag мишени в Ne, Ar и Kr при рабочем давлении 3 Па и мощности 50 Вт [202]

[202,240]. В этой же работе проводилось исследование скоростей осаждения покрытий, согласно которому скорость осаждения Ag покрытия снижается по мере увеличения атомной массы рабочего газа [202]. Авторы объясняют данный результат эффектом разрежения газа из-за низкой теплопроводности Kr и столкновениями атомов и ионов Ag с газовой средой, что приводит к их рассеянию.

В работе [203] исследовалось осаждение пленок  $TiO_2$  в атмосфере Ne, Ar, Kr и Хе методом ВЧМР. Авторы также пришли к выводу, что с увеличением атомной массы инертного рабочего газа снижается скорость осаждения покрытий. Данное явление они объясняют увеличением рассеяния распыленных частиц и ростом импеданса плазмы с увеличением атомной массы газа. Рост импеданса, вызванный снижением коэффициента вторичной электронной эмиссии [205], приводит к увеличению катодного напряжения и, соответственно, снижению катодного тока, которое означает снижение количества бомбардирующих мишень частиц.

Резюмируя все вышеизложенное, можно утверждать, что процесс ВЧ-магнетронного распыления является сложным и многофакторным. Наблюдаемое снижение скорости осаждения покрытий по мере увеличения атомной массы рабочего газа может быть объяснено снижением коэффициента распыления мишени, вызванным снижением доли передаваемой энергии от бомбардирующей частицы к распыляемой (рис. 4.2) и ростом пороговой энергии распыления частиц (рис. 4.3). Кроме того, наблюдается снижение энергии бомбардирующих ионов по



мере увеличения атомной массы инертного рабочего газа [202] (рис. 4.1, 4.4). Снижение энергии бомбардирующих ионов и увеличение количества частиц распыляемой мишени, рассеявшихся на частицах газа, в свою очередь, объясняется увеличением сечения рассеяния по мере роста атомной массы рабочего газа [203]. В литературе также встречается объяснение данного эффекта ростом импеданса плазмы [203], вызванного снижением коэффициента вторичной электронной эмиссии [205], что приводит к увеличению катодного напряжения и, соответственно, снижению катодного тока, которое означает снижение количества бомбардирующих мишень частиц с увеличением атомной массы газа. Вклад каждого из этих факторов в процесс распыления мишени на разных инертных рабочих газах остается дискуссионным вопросом, однако все эти факторы направлены на снижение скорости осаждения покрытия по мере роста атомной массы частиц рабочего газа. Таким образом, полученные в данной работе результаты и закономерности хорошо согласуются с данными других авторов, исследующих распыление мишеней в среде различных инертных рабочих газов.

#### **4.2. Морфология, физико-химические и механические свойства кальций-фосфатных покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением твердотельной мишени ГАП в среде различных инертных рабочих газов**

Морфология поверхности КФ покрытий, сформированных в различных рабочих газах, значительно отличается. Так, из рисунка 4.6 а-в видно, что рельеф поверхности покрытий становится более выраженным по мере увеличения атомной массы рабочего газа в процессе их осаждения. При большем увеличении с помощью АСМ становится отчетливо различима зеренная структура исследуемых покрытий (рис.4.6 г-е). Покрытия, сформированные с помощью распыления мишени в среде Ag и Kr, имеют сферическую квазиравноосную форму зерен с примерно одинаковым средним латеральным размером, который составляет  $363,21 \pm 56,15$  нм и  $279,86 \pm 54,40$  нм, соответственно (рис.4.6 г, д). При этом стоит отметить, что зерна на поверхности покрытий, сформированных в среде Kr,

формируют агломераты в виде складок со схожей шириной, но длиной, не превышающей 1 мкм, хаотически переплетающиеся между собой. И, наконец, образования в виде зерен глобулоподобной формы со средним латеральным размером  $552,09 \pm 123,52$  нм характерны для покрытий, сформированных распылением ГАП мишени в Хе (рис.4.6е).

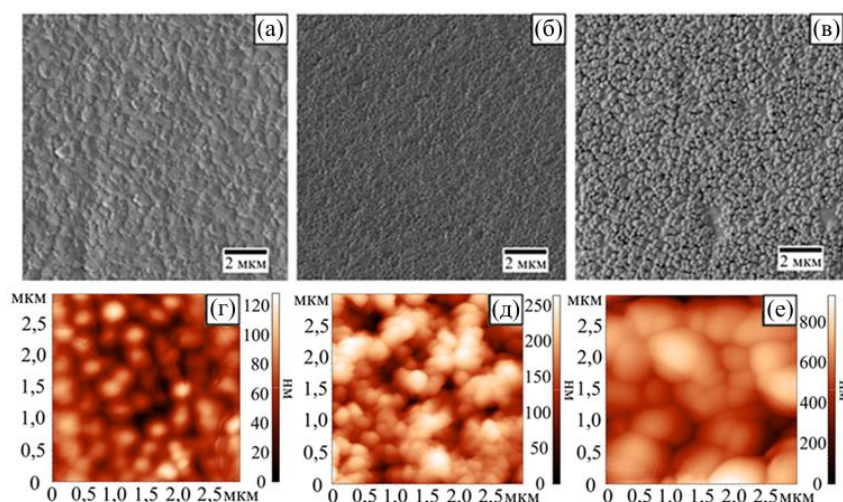


Рисунок 4.6 – СЭМ (а-в) и АСМ (г-е) изображения поверхности покрытий, осажденных распылением ГАП-мишени в среде Ar (а,г), Kr (б, д) и Хе (в,е)

Результаты исследования элементного состава покрытий (табл. 4.3) коррелируют с выводами, полученными в ходе расчёта коэффициента распыления мишени в разных газах (раздел 4.1). Если доля энергии, передаваемой от бомбардирующей частицы к распыляемой, максимальна при  $M_1 = M_2$ , то при увеличении атомной массы инертного рабочего газа коэффициент распыления тяжелых элементов в мишени возрастает, а легких, напротив, уменьшается. Кроме того, согласно рис. 4.3 наименьшая пороговая энергия распыления присуща наиболее тяжелым распыляемым элементам. В табл. 4.2 по мере увеличения атомной массы рабочего газа мы наблюдаем увеличение содержания наиболее тяжелого элемента в покрытии – кальция и уменьшение содержания наиболее легкого элемента – кислорода.

Пики кристаллической фазы ГАП были обнаружены (база данных JCPDS, карточка № 09-0432) на дифрактограммах покрытий, сформированных в Ar и Kr (Рисунок 4.7). Присутствие кристаллической фазы ГАП можно объяснить

Таблица 4.2 – Элементный состав образцов, ат.%

Образец	Ca	P	O	Ti	Al	Si	Ca/P
подложка	–	–	–	93,40±0,13	5,36±0,06	1,24±0,12	–
†Ar	41,09±0,22	23,18±0,16	34,95±0,34	0,77±0,22	–	–	1,77±0,01
†Kr	42,56±0,32*	23,95±0,25*	32,55±0,50*	0,93±0,14	–	–	1,78±0,01
†Xe	44,70±1,41*	23,17±0,34	30,09±1,13*	2,04±0,64*	–	–	1,93±0,05*

† Кальций-фосфатные покрытия на титановой подложке сформированные в среде Ar, Kr и Xe, соответственно; \* Статистически значимые отличия от контрольной группы образцов с покрытиями, осажденными в (Ar) ( $p < 0,05$ ).

относительно высокой температурой в камере в процессе осаждения покрытий. На дифрактограммах образцов титановой подложки и покрытий, сформированных в Хе, присутствуют пики только титана, что свидетельствует об их рентгеноаморфной структуре.

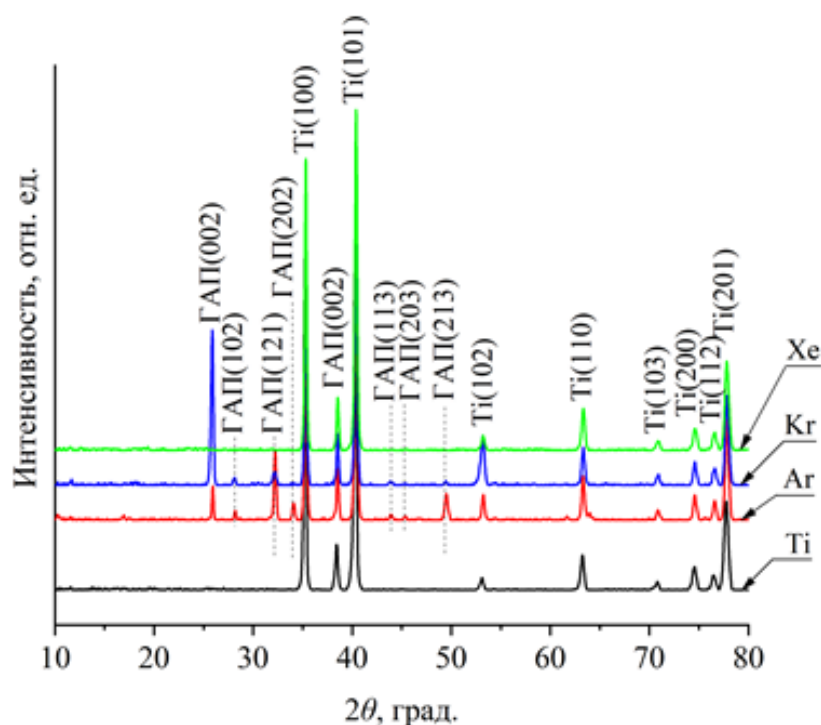


Рисунок 4.7 – Дифрактограммы образцов с КФ покрытиями, осажденными в атмосфере различных инертных газов и исходной титановой подложки

Для того чтобы определить преимущественную ориентацию зерен в сформированных покрытиях, был рассчитан коэффициент текстуры с использованием следующего уравнения:

$$TC_{hkl} = \frac{I_m(hkl)/I_0(hkl)}{\frac{1}{n} \sum_1^n I_m(hkl)/I_0(hkl)}, \quad (4.3)$$

где  $I_m(hkl)$  – это интенсивность пика, соответствующего плоскости  $(hkl)$  определенная в эксперименте,  $I_o(hkl)$  – это относительная интенсивность пика, соответствующего базе данных (база данных JCPDS, карточка # 09-0432),  $(hkl)$  – индексы плоскостей отражения,  $n$  – количество плоскостей отражения.

Для всех исследуемых покрытий (кроме покрытий, сформированных в Хе) преимущественной ориентацией зерен является ориентация зерен с плоскостью (002), параллельной поверхности подложки. Согласно [236], плоскость (002) в кристаллической решетке ГАП является плоскостью с наименьшей поверхностной энергией. Кроме того, для покрытий, сформированных в Аг, наблюдается вклад от еще одной кристаллической ориентации (102), что указывает на их смешанную структуру.

Анализ механических свойств показал, что значения величины модуля Юнга и нанотвердости подложки ниже соответствующих значения кальций-фосфатных покрытий (Таблица 4.3). Практически одинаковой величиной модуля Юнга и нанотвердости характеризуются покрытия, сформированные в Аг и Хе. В случае покрытий, сформированных в Кг, данные величины значительно ниже, а именно на 36% по нанотвердости и на 23% по величине модуля Юнга. Вероятно, снижение обусловлено плохой адгезией покрытия на границе покрытие-подложка. Последнее согласуется с данными скрэтч-теста.

Таблица 4.3 – Механические свойства образцов

Образец	Е, ГПа	Н, ГПа	Лс, мН
подложка	155 ± 8	3,6 ± 0,3	–
†Аг	202 ± 30	13,0 ± 2,2	140 ± 19
†Кг	160 ± 24	8,0 ± 1,8	162 ± 25
†Хе	211 ± 32	12,0 ± 2,1	> 500

† Кальций-фосфатные покрытия на титановой подложке сформированные в среде Аг, Кг и Хе, соответственно.

На Рисунке 4.8 представлены СЭМ-изображения царапин на поверхности исследуемых образцов. Данные скрэтч-теста указывают на то, что нарушение целостности покрытий, кроме покрытий, сформированных в среде Хе, происходит

посредством адгезионного разрушения. Ширина царапин и области отслоения покрытий увеличиваются с увеличением нагрузки и, следовательно, увеличением глубины проникновением индентора в образец.

Покрытия, сформированные в Ar, отслаиваются от подложки посредством скалывания из-за сжимающих напряжений при критической нагрузке  $140 \pm 19$  мН (рис. 4.8а,г). Площадь отслоения покрытий от подложки была наибольшей среди всех исследованных покрытий. Коробление и растрескивание покрытий наблюдалось на поверхности образцов, напыление которых осуществлялось в Kr (рис. 4.8б,д). Трещины располагались в областях максимальной локальной кривизны отслоившихся покрытий. Разрушение покрытий началось при нагрузке, равной  $162 \pm 25$  мН. В тоже время никакого видимого разрушения покрытий, сформированных в Хе, вплоть до увеличения нагрузки до 300 мН не наблюдалось (Рисунок 4.8в,е). На поверхности наблюдались лишь следы царапин с небольшими навалами, образованными вследствие пластического оттеснения материала

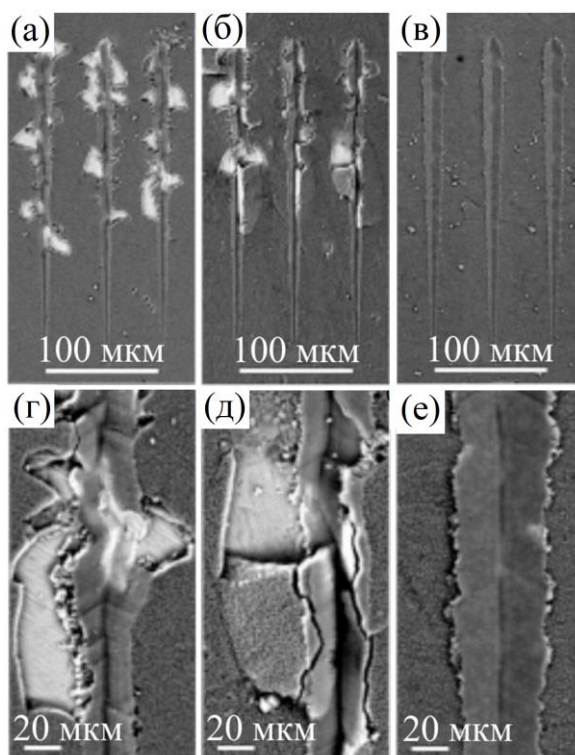


Рисунок 4.8 – СЭМ-изображения царапин на поверхности кальций-фосфатных покрытий, сформированных с помощью ВЧ-магнетронного распыления ГАП мишени в Ar (а,г), Kr (б,д) и Хе (в,е)

подложки. Более того, даже при увеличении нагрузки до 500 мН отслоение покрытий от подложки также не наблюдалось. Эти результаты указывают на то, что кальций-фосфатные покрытия, сформированные в Хе, имеют высокую адгезию к подложке.

Высокую адгезию покрытий, сформированных в Хе, можно объяснить большой прочностью связи на границе раздела «аморфный слой диоксида титана  $\text{TiO}_2$  (анатаз)/аморфное ГАП покрытие». Авторы [241] рассчитали работу адгезии ( $W_{ad}$ ) для различных видов границы раздела, в том числе и для таких пар, как «аморфный ГАП/аморфный диоксид титана ( $a\text{TiO}_2$ , анатаз)» и «аморфный ГАП/кристаллический диоксид титана ( $r\text{TiO}_2$ , рутил)». Было установлено, что граница раздела «аморфный ГАП/аморфный диоксид титана» характеризуется более отрицательной величиной  $W_{ad}$  и, как следствие, большей прочностью связи. Кроме того, полученные результаты коррелировали с продемонстрированным интегральным переносом заряда. Так, авторы [241] наблюдали немного больший перенос заряда на границе раздела «аморфный ГАП/аморфный диоксид титана», что указывает на сильное межатомное взаимодействие для данной границы раздела.

Второй причиной высокой адгезии покрытий, сформированных в Хе, является их толщина: тонкие покрытия демонстрируют лучшую адгезию. В работе [209] авторы формировали кальций-фосфатные покрытия на подложках титана и наклоненных кремниевых подложках с помощью ВЧ-магнетронного распыления мишени из Zn-замещенного гидроксиапатита. Исследование адгезионной прочности выявили, что более тонкие покрытия продемонстрировали высокую стойкость к царапинам.

Одной из характеристик, которые оказывают влияние на биологический отклик покрытий, является величина их свободной энергии поверхности (СЭП). Расчет свободной энергии поверхности с помощью метода ОВРК (метод Оунса, Вендта, Рабеля и Кьельбле) выявил, что свободная энергия поверхности, а

следовательно, и гидрофильность поверхности образцов увеличиваются в следующем порядке: Ti < Kr < Ar < Xe. Следует отметить увеличение полярной и уменьшение дисперсионной составляющих свободной энергии поверхности с увеличением атомной массы рабочего газа (Таблица 4.4).

Преобладание полярной составляющей свободной поверхностной энергии указывает на наличие сильных полярных химических связей в покрытиях, таких как OH<sup>-</sup> группы, оксиды и фосфаты [242]. Зависимость клеточной адгезии и пролиферации от полярной составляющей поверхностной свободной энергии имплантатов была продемонстрирована во многих исследованиях [243,244]. Так, в [245] поверхность имплантата с высокой величиной полярной составляющей поверхностной свободной энергии продемонстрировала самую высокую плотность клеток, самый низкий уровень продукции воспалительных цитокинов фибробластами. Напротив, имплантаты с очень низким значением полярной компоненты свободной поверхностной энергии показали явно более высокую экспрессию медиаторов воспаления и низкую пролиферацию клеток. Кроме того, кальций-фосфатные покрытия, содержащие большое количество полярных групп, хорошо смачиваются водой и, следовательно, более растворимы.

Таблица 4.4 – Значения краевых углов смачивания водой, глицерином и диметилформамидом, свободной энергии поверхности и ее компонент для исследуемых покрытий и титановой подложки

№	Группа	$\theta_{\text{в}}$ , [°]	$\theta_{\text{г}}$ , [°]	$\theta_{\text{д}}$ , [°]	$\sigma$ , [мДж/м <sup>2</sup> ]	$\sigma^{\text{D}}$ , [мДж/м <sup>2</sup> ]	$\sigma^{\text{P}}$ , [мДж/м <sup>2</sup> ]
1	Ti контроль	72,5±3,88	61,1±1,52	28,2±0,73	34,39±0,76	20,28±0,33	14,12±0,43
2	Ar	67,3±0,80	57,9±4,28	28,1±2,86	36,44±1,00	18,08±0,59	18,36±0,41
3	Kr	69,1±1,28	61,2±0,76	39,5±3,69	34,95±0,63	17,18±0,32	17,77±0,31
4	Xe	60,9±1,40	52,8±5,46	37,2±2,68	40,27±1,02	11,82±0,48	28,44±0,55

$\theta_{\text{в}}$  – краевой угол смачивания для воды;

$\theta_{\text{г}}$  – краевой угол смачивания для глицерина;

$\theta_{\text{д}}$  – краевой угол смачивания для N,N-диметилформамида;

$\sigma$  – полная свободная энергия поверхности (СЭП);

$\sigma^{\text{D}}$  – дисперсионная составляющая СЭП;

$\sigma^{\text{P}}$  – полярная составляющая СЭП.

### 4.3. Биологические свойства кальций-фосфатных покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением твердотельной ГАП мишени в среде различных инертных рабочих газов

Хотя точный механизм остеоиндукции, обусловленной КФ материалами, в настоящее время неизвестен, установлена взаимосвязь между растворением материала и его остеогенностью [246]. Авторы [246] показали на примере имплантации кальций-фосфатной керамики с различными физико-химическими и структурными характеристиками в крупный костный дефект у овцы, что керамика с наиболее выраженным остеоиндуктивным потенциалом является наиболее растворимой *in vitro* и биodeградируемой *in vivo*.

В данном разделе описываются процессы биodeградации покрытий в питательной среде и сокультивирование образцов с ММСК.

Оценку биodeградации покрытий, сформированных в среде различных рабочих газов, проводили посредством анализа состава продуктов их 5-недельного *in vitro* растворения в питательной среде RPMI-1640 (Таблица 4.5), а также элементного состава осадков на поверхности образцов после *in vitro* растворения.

После первой недели биodeградации было выявлено увеличение (по сравнению с контролем питательной среды,  $p < 0,05$ ) выхода общего Са из КФ покрытий, сформированных в средах Ar (на 14 %), Kr и Хе (на 86-143 %, соответственно). Однако только в случае Kr и Хе отмечены статистические различия с показателем для подложки без КФ покрытия (Таблица 4.6). По-видимому, для образцов с КФ покрытиями, сформированными в среде Хе, также наблюдалось несколько более активное образование солей кальция за счет уменьшения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (до 92 % от уровня в контроле,  $p < 0,05$ ), вступавших в реакции с анионами расторителя. Вторая волна растворения с увеличением выхода в раствор  $\text{Ca}^{2+}$  имела место к 4-й неделе только для образцов с КФ покрытиями, сформированными в среде Ar и Хе (на 14-19 %, соответственно,  $p < 0,05$  по сравнению с контролем). К 5 неделе биodeградации повышение



концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в растворе (на 18 %,  $p < 0,05$ ) наблюдалось только для образцов с КФ покрытиями, сформированными в среде Хе.

Следует отметить в динамике биodeградации в растворах всех групп периодическое уменьшение содержания ионов  $\text{Na}^+$ , которое достигало достоверных различий с контролем для КФ поверхностей, полученных в атмосфере Хе (3 неделя) и Ar (4 неделя). Это обусловлено, по-видимому, ионообменными процессами с осаждением хлорида натрия на КФ покрытия вследствие высокой исходной концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в питательной среде (см. состав среды). Подобное поведение описано ранее и для других типов ВЧ-магнетронных покрытий [221].

Более интенсивный выход элементов из КФ покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением ГАП мишени в атмосфере Хе, объясняется их кристаллической структурой. Известно, что аморфные покрытия растворяются быстрее по сравнению с кристаллическими [247]. Хотя покрытия, сформированные в Ar и Kr, нельзя считать полностью кристаллическими, на их дифрактограммах присутствуют отдельные пики кристаллической фазы ГАП, в то время как на дифрактограммах покрытий, осажденных в среде Хе, данных пиков не наблюдается.

Поскольку растворение покрытий сопровождается двумя процессами: непосредственно самим растворением и выпадением осадка на поверхность исследуемых образцов – анализ продуктов *in vitro* биodeградации образцов (Таблица 4.6) был дополнен исследованием элементного состава осадков на поверхности образцов. Преципитация ионов на поверхности ВЧ-магнетронных покрытий отмечалась ранее в [221].

Состав осадков представлен как элементами, входящими в состав КФ покрытий (Ca, P, O), так и элементами питательной среды RPMI-1640 (Na, Cl, K, Mg), в которой проводилось растворение покрытий. Присутствие Ti объясняется составом подложки (Таблица 4.6).

Большие погрешности в данных объясняются тем, что анализ элементного состава осадков выполнялся точно, а не усредненно по выбранной поверхности,

Таблица 4.5 – Концентрация (мМ) элементов после 5-недельной биodeградации исследуемых образцов *in vitro* в среде RPMI-1640, Me(Q1-Q3). Группы Ag, Kг и Хе соответствуют титановой подложке с КФ покрытиями, нанесенными в соответствующих рабочих газах

Группа	1 неделя					2 неделя				
	Общий Са	Са <sup>2+</sup>	Неорганический Р	К	Na	Общий Са	Са <sup>2+</sup>	Неорганический Р	К	Na
Исходная среда	0,07 (0,06;0,07)	0,25 (0,25;0,26)	6,35 (6,26; 6,65)	5,54 (5,44;5,68)	144,9 (141,5;147,5)	0,07 (0,06;0,10)	0,22 (0,21;0,28)	6,31 (5,91;6,71)	5,54 (5,41;5,79)	143,7 (140,3;147,9)
Ti подложка	0,08* (0,08;0,08)	0,23 (0,22;0,25)	6,34 (6,11;6,58)	5,40 (5,35;5,42)	140,9 (139,5;140,9)	0,07 (0,07;0,10)	0,25 (0,24;0,26)	6,53 (6,45;6,67)	5,47 (5,36;5,60)	144,8 (141,6;147,9)
Ag	0,08* (0,08;0,17)	0,26 (0,24;0,31)	6,25 (5,88;6,57)	5,54 (5,38; 5,62)	143,4 (139,3;145,1)	0,07 (0,07;0,14)	0,24 (0,23;0,29)	6,32 (6,18;6,64)	5,49 (5,47;5,49)	141,7 (141,4;141,9)
Kг	0,13*# (0,12; 0,24)	0,24 (0,22;0,26)	6,78 (6,47;6,92)	5,50 (5,44;5,70)	142,2 (140,7;146,8)	0,08 (0,07;0,13)	0,24 (0,24;0,28)	6,74 (5,84;7,11)	5,52 (5,47;5,61)	141,6 (140,3;145,1)
Хе	0,17*# (0,11;0,19)	0,23* (0,22;0,24)	6,27 (6,13;6,39)	5,41 (5,34;5,50)	140,1 (138,3;142,0)	0,09 (0,08;0,09)	0,25 (0,23;0,26)	6,73 (6,64;6,81)	5,47 (5,44;5,50)	140,9 (140,6;141,9)
Группа	3 неделя					4 неделя				
	Общий Са	Са <sup>2+</sup>	Неорганический Р	К	Na	Общий Са	Са <sup>2+</sup>	Неорганический Р	К	Na
Исходная среда	0,07 (0,06;0,10)	0,24 (0,21;0,27)	6,72 (6,71;7,24)	5,53 (5,39;5,63)	142,8 (139,3;143,9)	0,06 (0,06;0,08)	0,21 (0,20;0,22)	6,50 (6,38;6,87)	5,47 (5,45;5,70)	141,4 (139,6;146,6)
Ti подложка	0,10 (0,08;0,11)	0,27 (0,23;0,27)	6,99 (6,74;7,22)	5,39 (5,37;5,66)	139,3 (138,9;145,6)	0,11 (0,07;0,12)	0,25 (0,22;0,27)	6,73 (6,45;6,98)	5,48 (5,45;5,55)	141,1 (140,2;143,2)
Ag	0,09 (0,08;0,10)	0,23 (0,22;0,25)	6,18# (5,99;6,72)	5,45 (5,40;5,47)	139,9 (139,2;141,1)	0,09 (0,08;0,14)	0,24* (0,23;0,28)	6,65 (6,58;7,10)	5,44 (5,43;5,44)	139,7# (139,7;139,8)
Kг	0,07 (0,07;0,08)	0,23 (0,22;0,23)	6,73 (6,64;6,92)	5,50 (5,44;5,63)	142,1 (140,4;145,1)	0,08 (0,07;0,08)	0,23 (0,21;0,24)	7,03 (6,80;7,35)	5,62 (5,48;5,95)	144,9 (141,2;152,0)
Хе	0,08 (0,08;0,09)	0,23 (0,22;0,23)	6,78 (6,01;6,79)	5,43 (5,27;5,47)	140,5* (136,7;141,1)	0,08 (0,07;0,12)	0,25* (0,23;0,28)	6,65 (6,31;6,70)	5,47 (5,46;5,50)	140,7 (140,4;142,0)
Группа	5 неделя									
	Общий Са	Са <sup>2+</sup>	Неорганический Р	К	Na					
Исходная среда	0,08 (0,07;0,08)	0,22 (0,22;0,23)	6,90 (6,53;7,25)	5,64 (5,39;5,78)	143,9 (139,6;147,6)					
Ti подложка	0,09 (0,08;0,13)	0,25 (0,23;0,26)	6,84 (6,71;6,99)	5,50 (5,49;5,62)	141,6 (141,0;145,1)					
Ag	0,08 (0,07;0,08)	0,23 (0,20;0,24)	6,93 (6,68;6,97)	5,52 (5,47;5,76)	141,9 (141,1;148,1)					
Kг	0,07 (0,07;0,08)	0,24 (0,22;0,25)	6,82 (6,40;7,03)	5,64 (5,46;5,65)	145,0 (140,8;146,1)					
Хе	0,09 (0,07;0,11)	0,26* (0,25;0,31)	6,82 (6,61;6,88)	5,61 (5,60;5,66)	144,0 (143,8;145,0)					

Примечание (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни): статистически значимые отличия исследуемых групп от исходной среды (\*), титановой подложки (#), осажденного в Ag покрытия (‡), осажденного в Kг покрытия (†), осажденного в Хе покрытия (§). Красный цвет указывает на увеличение концентрации элементов, синий – на уменьшение.

Таблица 4.6 – Элементный состав осадков на поверхности образцов после растворения *in vitro* в течение 5 недель в среде RPMI 1640. Группы Ar, Kr и Xe соответствуют титановой подложке с КФ покрытиями, нанесенными в соответствующих рабочих газах

Группа	Ca	P	O	K	Na	Mg	Cl	Ti	Ca/P
подложка	1,90±0,06	5,76±0,99	56,04±3,66	1,31±0,46	5,67±1,04	19,71±4,37	1,80±0,83	7,81±0,08	0,33±0,05
Ar	45,18±12,77*	20,51±1,53*	23,79±11,43*	0,79±0,20*	2,49±2,09	1,24±1,00*	4,36±3,15	1,64±1,24*	2,19±0,58*
Kr	21,46±3,73 <sup>†</sup>	14,99±1,70 <sup>†</sup>	51,85±2,24 <sup>†</sup>	0,40±0,07 <sup>†</sup>	4,56±2,54	2,14±0,46*	2,31±2,05	2,28±1,17*	1,42±0,10 <sup>†</sup>
Xe	22,42±7,09 <sup>†</sup>	14,41±3,40 <sup>†</sup>	24,63±12,83*	0,56±0,24*	8,80±3,84 <sup>†</sup>	1,67±0,68*	9,58±9,32	17,92±11,55 <sup>†</sup>	1,54±0,20 <sup>†</sup>

\* – достоверное различие с Ti подложкой; <sup>†</sup> – достоверное различие с группой Ar (p<0,05).

что, в свою очередь, свидетельствует о большой неоднородности осадков по химическому составу. Соотношение Ca/P, измеренное в осадках, а не в самих покрытиях, возрастает в следующем порядке: Ti подложка < Kr < Xe < Ar.

Масса исследованных образцов до и после 5-недельной биodeградации *in vitro* в питательной среде RPMI-1640 приведена в Таблице 4.7. Анализ результатов свидетельствует о том, что все образцы прибавляют в массу, и между группами нет различий. Таким образом, для исследуемых ВЧ-магнетронных покрытий характерен интенсивный ионообмен с раствором и преобладанием в итоге обратной преципитации химических элементов на КФ поверхность. По возрастанию в прибавке массы образцы располагаются в следующем порядке, в зависимости от атмосферы в камере: Xe < Ar < Ti (подложка без покрытия) < Kr. Очевидно, что прибавка в массе после биodeградации *in vitro* не коррелирует с толщиной КФ покрытий (Таблице 4.6). Следовательно, растворение покрытий и их последующее осаждение на подложку является многофакторным процессом и может зависеть не только от толщины покрытий, но и от их структуры. По-видимому, вносит вклад и скорость растворения покрытий, поскольку наиболее растворимыми являются КФ покрытия, сформированные в Xe и Ar. Это предположение основано на результатах исследования кристаллической структуры покрытий и выхода Ca<sup>2+</sup> из покрытий (Таблице 4.6). При этом Ca, выход которого зафиксирован для образцов с КФ покрытиями, сформированными в Kr, после первой недели биodeградации, вероятно, осаждается обратно на подложку, о чем свидетельствует его концентрация в питательной среде в последующие сроки растворения.

На Рисунке 4.9 приведены СЭМ-изображения поверхности образцов после растворения *in vitro*. Поверхность исходной титановой подложки без покрытия

Таблица 4.7 – Масса исследованных образцов с разными видами КФ покрытий, сформированных методом ВЧ-магнетронного распыления на титановой подложке до и после 5-недельной биодеградации *in vitro* в питательной среде RPMI-1640, Me(Q1; Q3)

Образцы, n=4	До биодеградации		После 5 недель биодеградации <i>in vitro</i>	
	Исходная масса, мг	Сухая масса образцов после растворения, мг	Прибавка массы образцов после растворения, мг	Прибавка массы образцов после растворения, % от M1
0	M1	M2	M3	M4
подложка	234,79 (226,69; 237,13)	235,32* (227,74; 237,60)	0,52 (0,47; 1,04)	0,22 (0,20; 0,46)
Ag	226,87 (223,61; 240,42)	227,12* (224,22; 240,62)	0,25 (0,18; 0,62)	0,11 (0,07; 0,28)
Kr	230,48 (224,46; 235,85)	231,47* (224,59; 236,71)	0,86 (0,12; 1,01)	0,36 (0,05; 0,44)
He	222,72 (216,48; 229,16)	222,95* (216,63; 229,866)	0,22 (0,18; 0,69)	0,10 (0,08; 0,30)

Примечание: n – число образцов в каждой группе исследований. Сухая масса образцов – масса образцов после высушивания в течение 14-дней на воздухе; статистические различия ( $p < 0,05$ ): \* – с соответствующими показателями массы образцов до биодеградации согласно Т-критерию Вилкоксона.

имеет гладкую поверхность со следами полировки (Рисунок 4.9а). При большем увеличении на поверхности обнаружены кристаллы NaCl со средним размером 25-30 мкм (см. вставку на Рисунке 4.9а). Образование кристаллов NaCl происходит посредством выпадения осадка из среды RPMI 1640, которая содержит элементы Na и Cl в своем составе. На поверхности образцов с КФ покрытиями, сформированными в атмосфере Ag, видны осадки в виде частиц размером 1-2 мкм, которые равномерно распределены по поверхности (Рисунок 4.9б). В некоторых местах эти частицы образуют агломераты, размеры которых составляют 10-20 мкм. Поверхность образцов с КФ покрытиями, сформированными в атмосфере Kr, равномерно покрыта осадками сложной формы размером 1 мкм и меньше (Рисунок 4.9в), которые образуют агломераты сложной формы до нескольких десятков микрометров (вставка на Рисунке 4.9в). Похожие по форме и размеру осадки, что и на поверхности покрытий, сформированных в Ag, однородно расположены по поверхности образцов с КФ покрытиями, сформированными в атмосфере He (Рисунок 4.9д).

Предполагаемый процесс биодеградации исследованных КФ покрытий является волнообразным и может быть следующим. В процессе растворения КФ покрытий из них выходят ионы  $Ca^{2+}$  и  $HPO_4^{2-}$  [248], которые затем могут вновь вступить в химическую реакцию между собой и привести к образованию

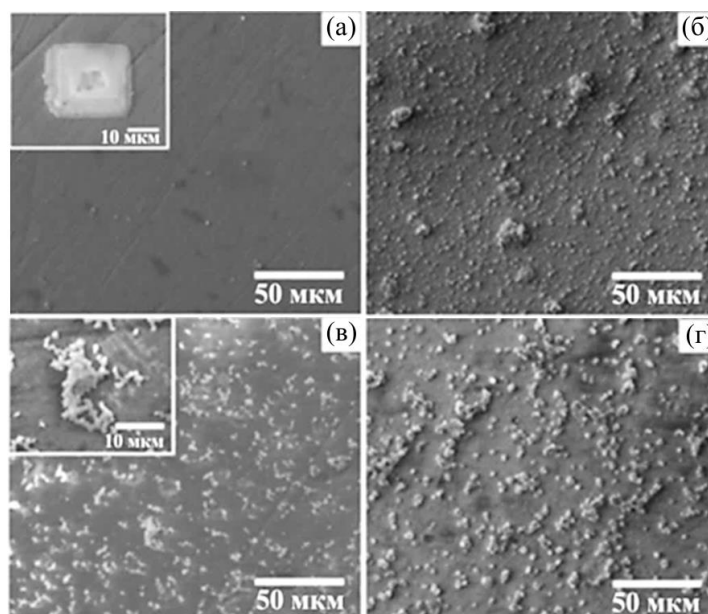


Рисунок 4.9 – СЭМ-изображения поверхности титановой подложки (а) и поверхности кальций-фосфатных покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением мишени из ГА в среде Ar (б), Kr (в) и Xe (г) после 5 недельной *in vitro* биodeградации в питательной среде RPMI 1640

малорастворимых солей кальция, прежде всего фосфатов кальция  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , которые затем осаждаются на поверхность образцов. Анализ содержания Ca и P в осадках на поверхности указывает на образование фосфатов кальция на образцах с КФ покрытиями. Кроме того,  $\text{Ca}^{2+}$  могут реагировать также с анионами Cl из среды RPMI 1640 с образованием соли  $\text{CaCl}_2$ , которая также выпадет в осадок на поверхность образцов. Как следствие, в данном исследовании концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в растворах не превышала 0,04 мМ (5 неделя) и 0,1 мМ (1 неделя) для общего Ca. Преимущественное содержание и выход кальция в полученных концентрациях соответствует ранним данным для ВЧ-магнетронных КФ пленок на титане [249].

Хорошо известно, что высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из КФ материалов влияет на последующее поведение остеобластных клеток [250]. Так, например, в работе [251] показано, что высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  стимулируют хемотаксис преостеобластов в месте резорбции кости и их созревание в клетки, образующие новую кость. Помимо воздействия на хемотаксис клеток, высвобождение внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  также играет важную роль в контроле пролиферации и дифференцировки остеобластов вблизи места резорбции кости (лакуны Хаушипа)

через передачу кальций-кальмодулин сигналов [252]. Также выявлено, что  $\text{Ca}^{2+}$  индуцирует экспрессию остеогенных факторов роста, таких как пептид, связанный с паратироидным гормоном [253], BMP-2 и BMP-4 [254]. Повышение  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивает уровень фермента щелочной фосфатазы (ALP), экспрессию мРНК Runx2 и маркеров остеокальцина остеобластов, а также индуцирует экспрессию мРНК белка BMP-2 в стромальных клетках, полученных из жировой ткани человека. Выделение  $\text{Ca}^{2+}$  из клеток временно увеличивает внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  из-за активации рецептора, чувствительного к кальцию (CaSR). Кроме того, увеличение внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  усиливает экспрессию BMP-2 посредством активации CaSR, повышения внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и стимуляции  $\text{Ca}^{2+}$ / кальмодулин NFAT-зависимых путей передачи сигналов [255] разных генов. Следует отметить тот факт, что в приведенных исследованиях отмеченные эффекты наблюдались при концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  порядка 2-8 мМ. Таким образом, согласно представленным литературным сведениям,  $\text{Ca}^{2+}$  должен влиять на поведение ММСК прежде всего на их дифференцировку в остеогенном направлении.

Тем не менее низкие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в растворах изученных КФ покрытий (не более 0,04 мМ) также оказывали модулирующее влияние на поведение ММСК *in vitro*. Так, общее число клеток статистически значимо в 1,7 раза возрастало в контрольной культуре ММСК по сравнению с исходным количеством клеток, засеянных в лунки планшетов. Присутствие титановых подложек без покрытия, а также подложек с КФ покрытиями, сформированными в атмосфере Хе, способствовало дальнейшему приросту клеточности 7-дневной культуры ММСК. Напротив, КФ покрытия, сформированные в атмосфере других инертных газов, значительно тормозили данный процесс в сравнении с клеточным контролем, Ti-контролем и тем более сокультивированием ММСК с образцами с КФ покрытиями, сформированными в атмосфере Хе. Общее количество клеток в культуре зависит от сбалансированности процессов деления и гибели клеток.

Исследование жизнеспособности контрольной культуры ММСК (Таблица 4.8) показало низкие значения гибели клеток как путем апоптоза (4 % от общего

количества клеток), так и некроза (2,5 % от общего количества клеток). Титановые образцы без покрытий вызывали усиление гибели клеток по обоим механизмам, особенно посредством некроза (37 % от общего количества клеток). Другими словами, титановые образцы без покрытий являются сильными раздражителями, вызывающими *in vitro* некроз ММСК, возможно, за счет выхода легирующих элементов из сплава титана. Это предположение обусловлено тем, что все КФ покрытия оказывали в разной степени выраженный защитный эффект, значительно (в 1,5-2 раза) снижая количество погибших клеток в культуре в сравнении с Ti-контролем. Кроме того, наиболее растворимые тонкие КФ покрытия, сформированные в атмосфере Хе, (Таблица 4.8) стимулировали, по-видимому, еще и деление ММСК, что обусловило максимальные значения общего количества клеток (208% от исходной культуры) к 7-м суткам наблюдения. По содержанию жизнеспособных ММСК, способных к делению и дифференцировке, через 7 суток исследования (Таблица 4.9) изученные КФ покрытия располагаются в следующем порядке по убыванию: Хе > Аг ≈ Кг. Таким образом, биосовместимыми в отношении ММСК являются КФ покрытия, которые в той или иной степени растворяются в модельной биологической среде. Известно, что ММСК проявляют свою способность к делению, дифференцировке и созреванию только после прилипания. Ионы кальция в зависимости от концентрации выполняют разнообразные функции, в том числе стимулируют клеточную адгезию [252,256]. Таким образом, выход  $\text{Ca}^{2+}$  в раствор, преобладающий над обратной преципитацией его солей, может быть молекулярным механизмом эффекта *in vitro*, описанного для КФ покрытия, осажденного в Хе.

Известным эффектом внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  является его стимулирующее влияние в отношении дифференцировки и созревания ММСК в остеобласты [256], реализуемое через активацию экспрессии остеогенных генов [255].

Результаты исследования уровня относительной экспрессии мРНК генов, ассоциированных с дифференцировкой ММСК в остеогенном направлении в присутствии исследуемых образцов с КФ покрытиями, представлены в Таблице 4.9. Образцы с КФ покрытиями, сформированными в атмосфере Аг,

Таблица 4.8 – Общее число клеток ( $\times 10^6$  кл/мл) и жизнеспособность ММСК после 7-дневного *in vitro* культивирования с исследуемыми образцами, Me (Q1–Q3)

Варианты культивирования	Общее число клеток	Количество клеток		
		живые	апоптотические	мертвые
ММСК до эксперимента	0,200(0,200-0,200)	0,190(0,190-0,192)	0,002(0,002-0,002)	0,008(0,008-0,010)
контроль ММСК	0,340(0,333-0,348)*	0,317(0,310-0,320)*	0,013(0,011-0,016)*	0,009(0,008-0,011)
контроль	0,380(0,373-0,388)**	0,211(0,204-0,218) <sup>+</sup>	0,027(0,024-0,032)**	0,139(0,131-0,140)**
†Ar	0,300(0,300-0,308)**°	0,213(0,208-0,224)**	0,015(0,012-0,016)**°	0,072(0,069-0,075)**°
†Kr	0,325(0,313-0,33)**°	0,207(0,202-0,214)** <sup>+</sup>	0,019(0,015-0,021)**°	0,095(0,091-0,097)**°
†Xe	0,415(0,41-0,428)**°	0,306(0,295-0,312)**°	0,031(0,025-0,037)**	0,088(0,077-0,093)**°

† – кальций-фосфатные покрытия на титановой подложке сформированные в среде Ar, Kr и Xe, соответственно;

\* – достоверные отличия от исходной (до культивирования) культуры ММСК ( $p < 0,05$ );

<sup>+</sup> – достоверные отличия от контроля ММСК ( $p < 0,05$ );

° – достоверные отличия от Ti-контроля ( $p < 0,05$ ).

Таблица 4.9. Экспрессия генов (кратность разы) ММСК, ассоциированных с дифференцировкой в остеогенном направлении после 7-дневного *in vitro* культивирования с модельными образцами с КФ-покрытиями, сформированными в атмосфере различных инертных газов

Образцы	ALPL	BMP6	BMP2
Ar	1,802	1,786	2,467
Kr	1,366	1,264	2,906
Xe	1,603	0,966	1,821

Примечание: Экспрессия генов рассчитана относительно результатов, полученных при культивировании образцов титановой подложки без покрытий. Все образцы анализировали в трех экземплярах.

способствовали *in vitro* усилению экспрессии всех исследуемых генов (ALPL, BMP6, BMP2). В случае осажденных в Kr покрытий наблюдался достоверный рост экспрессии BMP2.

При культивировании ММСК с КФ покрытиями, осажденными в Xe, не наблюдается достоверный рост экспрессии ни одного из маркеров, ассоциированных с дифференцировкой в остеогенном направлении. Вероятно, это связано с активным ростом в исследуемые сроки популяции ММСК в присутствии данного покрытия (Таблица 4.8), что препятствует дифференцировке клеток в период их деления и миграции. Некоторые авторы [247] не наблюдали пролиферации или дифференцировки стромальных клеток костного мозга при исследовании на аморфных покрытиях. Авторы связали это с тем, что высокий уровень растворения аморфных покрытий ингибирует их пролиферацию и



дифференцировку. В нашем исследовании КФ покрытия, сформированные в Хе, являются аморфными и хорошо растворяются, но, напротив, стимулируют увеличение клеточной массы и остеогенную дифференцировку ММСК. Возможны несколько объяснений: 1) различные концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при растворении покрытий; 2) различная чувствительность к раздражителям различных линий клеток; 3) высокая растворимость сформированного в Хе покрытия индуцирует остеоиндукцию и остеоиндукцию не на покрытии, а вокруг имплантата, создавая условия для так называемого "ползучего остеогенеза".

#### 4.4. Выводы по главе

1) Проведенными исследованиями установлено, что с повышением атомной массы инертного рабочего газа наблюдается общая тенденция к снижению скорости осаждения кальций-фосфатных покрытий. Это объясняется снижением доли передаваемой энергии от бомбардирующей частицы к распыляемой и повышением пороговой энергии выбивания частиц из мишени.

2) Выбор инертного рабочего газа оказывает влияние на морфологию поверхности и структуру формируемых покрытий.

3) По мере увеличения атомной массы инертного рабочего газа наблюдается увеличение содержания кальция и снижение содержания кислорода в осаждаемых покрытиях. Это также объясняется селективностью распыления различных элементов при варьировании типом рабочего газа.

4) Распыление мишеней из ГАП в Аг и Кг приводит к формированию покрытий с соотношением Са/Р, близким к стехиометрическому ГАП. Покрытия, сформированные в Хе, имеют более высокое соотношение Са/Р, чем стехиометрический ГАП.

5) Покрытия, сформированные в Хе, являются полностью аморфными и характеризуются высокой адгезией к подложке. Аморфная структура покрытий вызвана уменьшением тепловой нагрузки на модифицируемую подложку, что обусловлено снижением потока распыленных частиц.

6) Проведенные исследования показали, что тонкие полностью аморфные КФ покрытия, сформированные на титановых подложках с помощью распыления

мишени из ГАП в Хе, характеризуются самой большой величиной свободной энергии поверхности по сравнению с остальными исследуемыми покрытиями и исходной титановой подложкой и являются наиболее гидрофильными.

7) Наиболее растворимыми кальций-фосфатными покрытиями из всех исследуемых групп образцов являются покрытия, сформированные в атмосфере Хе и Аг. Образование кальций-фосфатов в процессе растворения происходило в основном на образцах с КФ покрытиями, сформированными в Аг и Хе.

8) *In vitro* эксперименты выявили, что наибольшее количество живых ММСК как в абсолютном выражении, так и относительно общего числа клеток было отмечено на поверхности КФ покрытий, сформированных в Хе.

9) Образцы с КФ покрытиями, сформированными в Хе, продемонстрировали большее количество жизнеспособных ММСК, способных к делению.

10) КФ покрытия, осажденные в Аг, способствовали усилению экспрессии *in vitro* ALPL, BMP6 и BMP2 генов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование влияния рабочего газа и состава распыляемой мишени на физико-химические, механические и биологические свойства кальций-фосфатных покрытий, сформированных с помощью высокочастотного магнетронного распыления.

Получены результаты экспериментальных исследований влияния Sr- и Mg-замещений (с концентрацией  $0,87 \pm 0,02$  ат.% и  $1,38 \pm 0,01$  ат.%, соответственно) в составе распыляемых порошковых мишеней на основе гидроксиапатита и  $\beta$ -трикальцийфосфата на скорость их распыления. Продемонстрировано, что наличие Sr замещений в структуре порошковых мишеней на основе  $\beta$ -ТКФ увеличивает скорость осаждения покрытий, формируемых методом ВЧМР, в то время как Mg замещения, напротив, снижают этот параметр. При распылении  $\beta$ -ТКФ мишени, одновременно содержащей оба типа замещений, Sr оказывает больший эффект на ее скорость осаждения вследствие его способности замещать кальций в четырех ее позициях против одной позиции, которую может замещать Mg. Никаких статистически достоверных отличий в скорости формирования покрытий, осаждаемых распылением порошковых Mg- и Sr-замещенных мишеней из ГАП с концентрацией замещающих элементов  $0,93 \pm 0,13$  ат.% и  $\sim 0,47$  ат.%, соответственно, обнаружено не было.

Проведено исследование ионного выхода элементов кальций-фосфатных покрытий в изотонический раствор NaCl. Показано, что в растворах покрытий, содержащих стронций, наблюдается увеличение растворимости по всем исследуемым элементам, что обусловлено его дестабилизирующим влиянием на структуру покрытий. Напротив, в растворах покрытий, содержащих магний, наблюдается значительное сокращение выхода всех элементов.

В работе впервые проведено распыление твердотельной мишени из гидроксиапатита в атмосфере различных инертных газов. Выявлено, что осаждение КФ покрытий распылением мишени из ГАП в Ar и Kr происходит с более высокой скоростью по сравнению с формированием покрытий в атмосфере Хе, что обусловлено низкой долей передаваемой энергии от бомбардирующей частицы

(Xe) к распыляемой (Ca, P, O), а также более высоким значением пороговой энергии выбивания распыляемой частицы с поверхности мишени.

В работе продемонстрировано, что распыление мишени из ГАП в Ar и Kr приводит к формированию покрытий с соотношением Ca/P, близким к стехиометрическому ГАП. Покрытия, сформированные в Xe, имеют более высокое соотношение Ca/P, чем стехиометрический ГАП.

Убедительно показано, что выбор инертного рабочего газа оказывает влияние на морфологию поверхности и структуру формируемых покрытий. Покрытия, сформированные в атмосфере Xe, являются полностью аморфными, что обуславливает их высокую растворимость.

Получены результаты исследований биологических свойств покрытий, сформированных распылением твердотельной мишени из ГАП в атмосфере различных инертных рабочих газов. Показано, что образцы с КФ покрытиями, сформированными в Xe и Ar, продемонстрировали большее количество жизнеспособных ММСК, способных к делению и дифференцировке, соответственно.

Достоверно установлено, что КФ покрытия, сформированные в Xe, способствуют полуторакратному увеличению количества жизнеспособных ММСК по сравнению со всеми исследуемыми группами образцов с покрытиями и титановой подложкой без покрытия.

Выявленные в диссертационной работе закономерности формирования кальций-фосфатных покрытий могут быть применены при разработке имплантатов с высокой биоактивностью и персонафицированными свойствами, что обуславливает высокую социальную значимость проведенных исследований.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АКФ – аморфный кальций-фосфат,  $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ,  $n = 3-4,5$ ;
- БКФ – бифазный кальций-фосфатный (бифазные кальций-фосфаты);
- БЭТ – метод Брунауэра-Эммета-Теллера;
- ВЧМР – высокочастотное магнетронное распыление;
- ГАП – гидроксипатит,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ;
- ДКФД – дикальцийфосфат дигидрат,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;
- ДКФМ – дикальцийфосфат моногидрат,  $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- КФ – кальций-фосфатный (кальций-фосфат);
- ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки;
- ОКФ – октакальцийфосфат,  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;
- РФА – рентгенофазовый анализ;
- РЭМ – растровая электронная микроскопия;
- РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия;
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;
- СЭП – свободная энергия поверхности;
- ТТКФ – тетракальцийфосфат,  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ;
- УПП – удельная площадь поверхности;
- ЭДС – энергодисперсионная спектроскопия;
- $\alpha$ -ТКФ –  $\alpha$ -трикальцийфосфат  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;
- $\beta$ -МФК –  $\beta$ -метафосфат кальция,  $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ ;
- $\beta$ -ПФК –  $\beta$ -пирофосфат кальция,  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ;
- $\beta$ -ТКФ –  $\beta$ -трикальцийфосфат  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;
- ALPL – щелочная фосфатаза;
- ВМР2 – костный морфогенетический белок-2;
- ВМР6 – костный морфогенетический белок-6;
- DEX – дексаметазон;
- FGF-2 – фактор роста фибробластов-2;
- PLGA – полилактид-ко-гликолид;

PVD – осаждение покрытий конденсацией из газовой фазы;

Mg-ГАП – гидроксиапатит, содержащий замещения кальция магнием;

Mg-замещения – замещения атомов кальция атомами магния в элементарной ячейке;

Mg- $\beta$ -ТКФ –  $\beta$ -трикальцийфосфат, содержащий магниевые замещения;

Mg/Sr- $\beta$ -ТКФ –  $\beta$ -трикальцийфосфат, содержащий замещения кальция магнием и стронцием;

Sr-ГАП – гидроксиапатит, содержащий замещения кальция стронцием;

Sr-замещения – замещения атомов кальция атомами стронция в элементарной ячейке;

Sr- $\beta$ -ТКФ –  $\beta$ -трикальцийфосфат, содержащий замещения кальция стронцием.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Материалы для медицины , клеточной и тканевой инженерии // Красноярск: ИПК СФУ. – 2009. – 262 с.
2. Васин Л.С. и др. Биосовместимость // Москва. – 1999. – 368 с.
3. Meffert R.M. et al. Hydroxylapatite as an Alloplastic Graft in the Treatment of Human Periodontal Osseous Defects // Journal of periodontology. – 1985. – Vol. 56. – No. 2. – P. 63-73.
4. Dorozhkin S. V. Calcium-orthophosphate-based bioactive ceramics // Fundamental Biomaterials: Ceramics. – 2018. – P. 297-405.
5. LeGeros R.Z., Balmain N., Bonel N.G. Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone // J. Chem. Res. Synopses. 1986. Vol. 1. P. 8–9.
6. Qadir M., Li Y., Wen C. Ion-substituted calcium phosphate coatings by physical vapor deposition magnetron sputtering for biomedical applications: A review // Acta biomaterialia. – 2019. – Vol. 89. – P. 14-32.
7. Graziani G., Boi M., Bianchi M. A review on ionic substitutions in hydroxyapatite thin films: Towards complete biomimetism // Coatings. – 2018. – Vol. 8. – No. 8. – P. 269.
8. Su Y. et al. Biofunctionalization of metallic implants by calcium phosphate coatings // Bioactive materials. – 2019. – Vol. 4. – P. 196-206.
9. Ducheyne P., Radin S., King L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution // Journal of biomedical materials research. – 1993. – Vol. 27. – No. 1. – P. 25-34.
10. Ducheyne P., Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function // Biomaterials. – 1999. – Vol. 20. – No. 23-24. – P. 2287-2303.
11. Radin S. R., Ducheyne P. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation // Journal of biomedical materials research. – 1993. – Vol. 27. – No. 1. – P. 35-45.
12. Takahashi Y., Yamamoto M., Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and  $\beta$ -tricalcium

phosphate // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – No. 17. – P. 3587-3596.

13. Ginebra M. P., Traykova T., Planell J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review // *Journal of controlled release*. – 2006. – Vol. 113. – No. 2. – P. 102-110.

14. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate-based bioceramics // *Materials*. – 2013. – Vol. 6. – No. 9. – P. 3840-3942.

15. Zhao C. et al. Enhanced corrosion resistance and antibacterial property of Zn doped DCPD coating on biodegradable Mg // *Materials Letters*. – 2016. – Vol. 180. – P. 42-46.

16. Kajánek D. et al. Study of corrosion behavior of dicalcium phosphate-dihydrate (DCPD) coating prepared by large amplitude sinusoidal voltammetry (LASV) technique on ZW3 magnesium alloy // *Procedia engineering*. – 2017. – Vol. 192. – P. 399-403.

17. Kajánek D. et al. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of ZW3 magnesium alloy coated by DCPD using LASV deposition technique // *Acta Metallurgica Slovaca*. – 2017. – Vol. 23. – Vol. 2. – P. 147-154.

18. Brown W. E. Crystal growth of bone mineral // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 1966. – Vol. 44. – P. 205-220.

19. Suzuki O. Biological role of synthetic octacalcium phosphate in bone formation and mineralization // *Journal of Oral Biosciences*. – 2010. – Vol. 52. – No. 1. – P. 6-14.

20. Li C. et al. Facile preparation of nanostructured octacalcium phosphate coatings on micro-arc oxidized magnesium with different functionalities for bone repair application // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2021. – Vol. 197. – P. 111426.

21. Fan L. et al. Strontium substituted octacalcium phosphate coatings by electrochemical deposition and their dose-dependent bioactivities // *Materials Letters*. – 2020. – Vol. 272. – P. 127844.

22. Mokabber T. et al. Crystal growth mechanism of calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition // *Surface and Coatings Technology*. – 2018. – Vol. 334. – P. 526-535.

23. Lu B. Q. et al. Introducing the crystalline phase of dicalcium phosphate monohydrate // *Nature communications*. – 2020. – Vol. 11. – No. 1. – P. 1-8.



24. LeGeros R. Z. et al. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications // Journal of materials science: Materials in Medicine. – 2003. – Vol. 14. – No. 3. – P. 201-209.

25. Daculsi G. et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2003. – Vol. 14. – No. 3. – P. 195-200.

26. Dorozhkina E. I., Dorozhkin S. V. Mechanism of the solid-state transformation of a calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA) into biphasic calcium phosphate (BCP) at elevated temperatures // Chemistry of materials. – 2002. – Vol. 14. – No. 10. – P. 4267-4272.

27. Li Y., Kong F., Weng W. Preparation and characterization of novel biphasic calcium phosphate powders ( $\alpha$ -TCP/HA) derived from carbonated amorphous calcium phosphates // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2009. – Vol. 89. – No. 2. – P. 508-517.

28. Sureshbabu S., Komath M., Varma H. K. *In situ* formation of hydroxyapatite– $\alpha$  tricalcium phosphate biphasic ceramics with higher strength and bioactivity // Journal of the American Ceramic Society. – 2012. – Vol. 95. – No. 3. – P. 915-924.

29. Radovanović Ž. et al. Antimicrobial activity and biocompatibility of Ag<sup>+</sup>-and Cu<sup>2+</sup>-doped biphasic hydroxyapatite/ $\alpha$ -tricalcium phosphate obtained from hydrothermally synthesized Ag<sup>+</sup>-and Cu<sup>2+</sup>-doped hydroxyapatite // Applied surface science. – 2014. – Vol. 307. – P. 513-519.

30. Oishi M. et al. Fabrication and chemical durability of porous bodies consisting of biphasic tricalcium phosphates // Phosphorus Research Bulletin. – 2004. – Vol. 17. – P. 95-100.

31. Kamitakahara M. et al. Preparation of porous biphasic tricalcium phosphate and its in vivo behavior // Key Engineering Materials. – Trans Tech Publications Ltd. – 2005. – Vol. 284. – P. 281-284.

32. Wang R. B. et al. Dissolution behavior of submicron biphasic tricalcium

phosphate powders // *Key Engineering Materials*. – Trans Tech Publications Ltd. – 2006. – Vol. 309. – P. 223-226.

33. Zhu X. D. et al. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption // *Acta biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6. – No. 4. – P. 1536-1541.

34. Mondal S., Dorozhkin S. V., Pal U. Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2018. – Vol. 10. – No. 4. – P. e1504.

35. Furukawa T. et al. Histomorphometric study on high-strength hydroxyapatite/poly (L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures // *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2000. – Vol. 50. – No. 3. – P. 410-419.

36. Trombelli L. et al. Single flap approach with and without guided tissue regeneration and a hydroxyapatite biomaterial in the management of intraosseous periodontal defects // *Journal of periodontology*. – 2010. – Vol. 81. – No. 9. – P. 1256-1263.

37. Strietzel F. P., Reichart P. A., Graf H. L. Lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim®). Preliminary clinical and histological results // *Clinical oral implants research*. – 2007. – Vol. 18. – No. 6. – P. 743-751.

38. Ye Q. et al. Histological reaction to hydroxyapatite in the middle ear of rats // *Auris Nasus Larynx*. – 2001. – Vol. 28. – No. 2. – P. 131-136.

39. Lv Q., Nair L., Laurencin C. T. Fabrication, characterization, and in vitro evaluation of poly (lactic acid glycolic acid)/nano-hydroxyapatite composite microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering in rotating bioreactors // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2009. – Vol. 91. – No. 3. – P.

679-691.

40. Suchanek W., Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants // *Journal of materials research*. – 1998. – Vol. 13. – No. 1. – P. 94-117.

41. Wopenka B., Pasteris J. D. A mineralogical perspective on the apatite in bone // *Materials Science and Engineering: C*. – 2005. – Vol. 25. – No. 2. – P. 131-143.

42. White T. J., Dong Z. L. Structural derivation and crystal chemistry of apatites // *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*. – 2003. – Vol. 59. – No. 1. – P. 1-16.

43. Elliott J.C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates // *Elsevier Science* – 1994. – P. 404.

44. Aina V. et al. Magnesium-and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2012. – Vol. 23. – No. 12. – P. 2867-2879.

45. Laurencin D. et al. Magnesium incorporation into hydroxyapatite // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – No. 7. – P. 1826-1837.

46. Posner A. S., Perloff A., Diorio A. F. Refinement of the hydroxyapatite structure // *Acta Crystallographica*. – 1958. – Vol. 11. – No. 4. – P. 308-309.

47. Surmenev R. A., Surmeneva M. A., Ivanova A. A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—a review // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10. – No. 2. – P. 557-579.

48. Graziani G. et al. Ion-substituted calcium phosphate coatings deposited by plasma-assisted techniques: A review // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – Vol. 74. – P. 219-229.

49. Yu T. et al. Synthesis and drug delivery property of calcium phosphate cement with special crystal morphology // *Journal of the American Ceramic Society*. – 2010. – Vol. 93. – No. 5. – P. 1241-1244.

50. Stallmann H. P. et al. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile // *BMC musculoskeletal disorders*. – 2006. – Vol. 7. – No. 1. – P. 1-8.

51. Hesaraki S., Nemati R. Cephalexin-loaded injectable macroporous calcium phosphate bone cement // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* – 2009. – Vol. 89. – No. 2. – P. 342-352.

52. Yang Z. et al. Incorporation of methotrexate in calcium phosphate cement: behavior and release in vitro and in vivo // *Orthopedics (Online).* – 2009. – Vol. 32. – No. 1. – P. 27.

53. Blom E. J. et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 incorporation in a calcium phosphate bone cement: Material properties and release characteristics // *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* – 2002. – Vol. 59. – No. 2. – P. 265-272.

54. Weir M. D., Xu H. H. K. High-strength, in situ-setting calcium phosphate composite with protein release // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* – 2008. – Vol. 85. – No. 2. – P. 388-396.

55. Ikawa N. et al. Amino acid containing amorphous calcium phosphates and the rapid transformation into apatite // *Journal of Materials Chemistry.* – 2009. – Vol. 19. – No. 28. – P. 4906-4913.

56. Stallmann H. P. et al. In vivo release of the antimicrobial peptide hLF1-11 from calcium phosphate cement // *Journal of Orthopaedic Research.* – 2008. – Vol. 26. – No. 4. – P. 531-538.

57. Stallmann H. P. et al. Osteomyelitis prevention in rabbits using antimicrobial peptide hLF1-11-or gentamicin-containing calcium phosphate cement // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2004. – Vol. 54. – No. 2. – P. 472-476.

58. Dubnika A. et al. Functionalized silver doped hydroxyapatite scaffolds for controlled simultaneous silver ion and drug delivery // *Ceramics International.* – 2017. – Vol. 43. – No. 4. – P. 3698-3705.

59. Mondal S., Pal U. 3D hydroxyapatite scaffold for bone regeneration and local drug delivery applications // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2019. – Vol. 53. – P. 101131.
60. Chen S. et al. Layer-by-layer coated porous 3D printed hydroxyapatite composite scaffolds for controlled drug delivery // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – Vol. 179. – P. 121-127.
61. Mondal S., Pal U., Dey A. Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute // *Ceramics International*. – 2016. – Vol. 42. – No. 16. – P. 18338-18346.
62. Zhang Y. G. et al. A novel composite scaffold comprising ultralong hydroxyapatite microtubes and chitosan: preparation and application in drug delivery // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2017. – Vol. 5. – No. 21. – P. 3898-3906.
63. Min B. M. et al. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25. – No. 7-8. – P. 1289-1297.
64. Son J. S. et al. Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres // *Journal of Controlled Release*. – 2011. – Vol. 153. – No. 2. – P. 133-140.
65. Fomin A. et al. Structure and mechanical properties of hydroxyapatite coatings produced on titanium using plasma spraying with induction preheating // *Ceramics International*. – 2017. – Vol. 43. – No. 14. – P. 11189-11196.
66. Candidato Jr R. T., Thouzellier C., Pawłowski L. Evaluation of the in-vitro behavior of nanostructured hydroxyapatite and zinc doped hydroxyapatite coatings obtained using solution precursor plasma spraying // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2018. – Vol. 106. – No. 6. – P. 2101-2108.
67. Unabia R. B. et al. Investigation on the structural and microstructural properties of copper-doped hydroxyapatite coatings deposited using solution precursor plasma spraying // *Journal of the European Ceramic Society*. – 2019. – Vol. 39. – No. 14. – P. 4255-4263.
68. Domínguez-Trujillo C. et al. Sol-gel deposition of hydroxyapatite coatings on

porous titanium for biomedical applications // *Surface and Coatings Technology*. – 2018. – Vol. 333. – P. 158-162.

69. Jonauske V. et al. Characterization of sol-gel derived calcium hydroxyapatite coatings fabricated on patterned rough stainless steel surface // *Coatings*. – 2019. – Vol. 9. – No. 5. – P. 334.

70. Jaafar A. et al. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings for titanium implants: A review // *Bioengineering*. – 2020. – Vol. 7. – No. 4. – P. 127.

71. Morejón-Alonso L. et al. Electrochemical deposition of Sr and Sr/Mg-co-substituted hydroxyapatite on Ti-40Nb alloy // *Materials Letters*. – 2019. – Vol. 248. – P. 65-68.

72. Marashi-Najafi F., Khalil-Allafi J., Etmianfar M. R. Biocompatibility of hydroxyapatite coatings deposited by pulse electrodeposition technique on the Nitinol superelastic alloy // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – Vol. 76. – P. 278-286.

73. Vranceanu D. M. et al. Magnesium doped hydroxyapatite-based coatings obtained by pulsed galvanostatic electrochemical deposition with adjustable electrochemical behavior // *Coatings*. – 2020. – Vol. 10. – No. 8. – P. 727.

74. Bartmanski M. et al. Effects of solution composition and electrophoretic deposition voltage on various properties of nanohydroxyapatite coatings on the Ti13Zr13Nb alloy // *Ceramics International*. – 2018. – Vol. 44. – No. 16. – P. 19236-19246.

75. Bartmanski M. et al. Effects of electrophoretic deposition times and nanotubular oxide surfaces on properties of the nanohydroxyapatite/nanocopper coating on the Ti13Zr13Nb alloy // *Ceramics International*. – 2019. – Vol. 45. – No. 16. – P. 20002-20010.

76. Bartmanski M. et al. Electrophoretic deposition (EPD) of nanohydroxyapatite-nanosilver coatings on Ti13Zr13Nb alloy // *Ceramics International*. – 2017. – Vol. 43. – No. 15. – P. 11820-11829.

77. Zhu B. et al. Preparation and characterization of aminated hydroxyethyl cellulose-induced biomimetic hydroxyapatite coatings on the AZ31 magnesium alloy //

Metals. – 2017. – Vol. 7. – No. 6. – P. 214.

78. Mali S. A., Nune K. C., Misra R. D. K. Biomimetic nanostructured hydroxyapatite coatings on metallic implant materials // Materials technology. – 2016. – Vol. 31. – No. 13. – P. 782-790.

79. Graziani G. et al. Fabrication and characterization of biomimetic hydroxyapatite thin films for bone implants by direct ablation of a biogenic source // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – Vol. 99. – P. 853-862.

80. Tang H. et al. Synthesis and properties of hydroxyapatite-containing coating on AZ31 magnesium alloy by micro-arc oxidation // Applied Surface Science. – 2017. – Vol. 400. – P. 391-404.

81. Aktug S. L., Kutbay I., Usta M. Characterization and formation of bioactive hydroxyapatite coating on commercially pure zirconium by micro arc oxidation // Journal of Alloys and Compounds. – 2017. – Vol. 695. – P. 998-1004.

82. Durdu S. et al. Characterization and bioactivity of hydroxyapatite-based coatings formed on steel by electro-spark deposition and micro-arc oxidation // Surface and Coatings Technology. – 2017. – Vol. 326. – P. 111-120.

83. Prosolov K. A. et al. Deposition of polycrystalline zinc substituted hydroxyapatite coatings with a columnar structure by RF magnetron sputtering: Role of in-situ substrate heating // Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing. – 2018. – Vol. 1115. – No. 3. – P. 032077.

84. Das A., Shukla M. Surface morphology and in vitro bioactivity of biocompatible hydroxyapatite coatings on medical grade S31254 steel by RF magnetron sputtering deposition // Transactions of the IMF. – 2017. – Vol. 95. – No. 5. – P. 276-281.

85. Jeong W. J. A Study on the Deposition of Hydroxyapatite Nano Thin Films Fabricated by Radio-Frequency Magnetron Sputtering for Biomedical Applications // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2020. – Vol. 20. – No. 7. – P. 4114-4119.

86. Ion R. M. et al. Ion-substituted carbonated hydroxyapatite coatings for model stone samples // Coatings. – 2019. – Vol. 9. – No. 4. – P. 231.

87. Robinson L. et al. The deposition of strontium and zinc Co-substituted

hydroxyapatite coatings // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2017. – Vol. 28. – No. 3. – P. 1-14.

88. Arcos D., Vallet-Regí M. Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2020. – Vol. 8. – No. 9. – P. 1781-1800.

89. Bose S. et al. Effects of polycaprolactone on alendronate drug release from Mg-doped hydroxyapatite coating on titanium // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – Vol. 88. – P. 166-171.

90. Geuli O. et al. Synthesis, coating, and drug-release of hydroxyapatite nanoparticles loaded with antibiotics // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2017. – Vol. 5. – No. 38. – P. 7819-7830.

91. Manatunga D. C. et al. pH responsive controlled release of anti-cancer hydrophobic drugs from sodium alginate and hydroxyapatite bi-coated iron oxide nanoparticles // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2017. – Vol. 117. – P. 29-38.

92. Pawlik A. et al. Fabrication and characterization of electrophoretically deposited chitosan-hydroxyapatite composite coatings on anodic titanium dioxide layers // *Electrochimica Acta*. – 2019. – Vol. 307. – P. 465-473.

93. Baştan F. E. et al. Electrophoretic co-deposition of PEEK-hydroxyapatite composite coatings for biomedical applications // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2018. – Vol. 169. – P. 176-182.

94. Yan Y. et al. Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO<sub>2</sub> nanotube composite coatings on titanium // *Applied Surface Science*. – 2014. – Vol. 314. – P. 348-357.

95. Vorobyev A. et al. Composite biphasic coatings formed by hybrid technology for biomedical applications // *2020 7th International Congress on Energy Fluxes and Radiation Effects (EFRE)*. – IEEE. – 2020. – P. 560-563.

96. Kharapudchenko E. et al. Hybrid calcium phosphate coatings for titanium implants // *Journal of Physics: Conference Series*. – IOP Publishing. 2017. – Vol. 789. – No. 1. – P. 012025.

97. Zhou W. et al. Enhanced corrosion resistance and bioactivity of Mg alloy



modified by Zn-doped nanowisker hydroxyapatite coatings // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2020. – Vol. 186. – P. 110710.

98. Bakhsheshi-Rad H. R. et al. Bioactivity, in-vitro corrosion behavior, and antibacterial activity of silver–zeolites doped hydroxyapatite coating on magnesium alloy // *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. – 2018. – Vol. 28. – No. 8. – P. 1553-1562.

99. Popkov A. V. et al. Bioactivity and osteointegration of hydroxyapatite-coated stainless steel and titanium wires used for intramedullary osteosynthesis // *Strategies in trauma and limb reconstruction*. – 2017. – Vol. 12. – No. 2. – P. 107-113.

100. Ji X. J. et al. Corrosion resistance and antibacterial effects of hydroxyapatite coating induced by polyacrylic acid and gentamicin sulfate on magnesium alloy // *Frontiers of Materials Science*. – 2019. – Vol. 13. – No. 1. – P. 87-98.

101. Li Q. et al. Improving the corrosion resistance of ZEK100 magnesium alloy by combining high-pressure torsion technology with hydroxyapatite coating // *Materials & Design*. – 2019. – Vol. 181. – P. 107933.

102. Cai S. et al. Ultrasonic aqueous synthesis of corrosion resistant hydroxyapatite coating on magnesium alloys for the application of long-term implant // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2019. – Vol. 58. – P. 104677.

103. Khan A. S., Awais M. Low-cost deposition of antibacterial ion-substituted hydroxyapatite coatings onto 316L stainless steel for biomedical and dental applications // *Coatings*. – 2020. – Vol. 10. – No. 9. – P. 880.

104. Ghosh R. et al. Antibacterial copper–hydroxyapatite composite coatings via electrochemical synthesis // *Langmuir*. – 2019. – Vol. 35. – No. 17. – P. 5957-5966.

105. Ji X. J. et al. Corrosion resistance and antibacterial properties of hydroxyapatite coating induced by gentamicin-loaded polymeric multilayers on magnesium alloys // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – Vol. 179. – P. 429-436.

106. Suchanek K. et al. Assessment of phase stability and in vitro biological properties of hydroxyapatite coatings composed of hexagonal rods // *Surface and Coatings Technology*. – 2019. – Vol. 364. – P. 298-305.

107. Predoi D. et al. Evaluation of antibacterial activity of zinc-doped hydroxyapatite colloids and dispersion stability using ultrasounds // *Nanomaterials*. – 2019. – Vol. 9. – No. 4. – P. 515.

108. Ferraris S. et al. The mechanical and chemical stability of the interfaces in bioactive materials: The substrate-bioactive surface layer and hydroxyapatite-bioactive surface layer interfaces // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – Vol. 116. – P. 111238.

109. Samavedi S., Whittington A. R., Goldstein A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior // *Acta biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9. – No. 9. – P. 8037-8045.

110. Kozelskaya A. I. et al. Radio frequency magnetron sputtering of Sr-and Mg-substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate: Analysis of the physicochemical properties and deposition rate of coatings // *Applied Surface Science*. – 2020. – Vol. 509. – P. 144763.

111. Yin X. et al. Density functional study of structural, electronic and vibrational properties of Mg-and Zn-doped tricalcium phosphate biomaterials // *Biomaterials*. – 2002. – Vol. 23. – No. 20. – P. 4155-4163.

112. Tanaka T. et al. Basic research and clinical application of beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) // *Morphologie*. – 2017. – Vol. 101. – No. 334. – P. 164-172.

113. Komaki H. et al. Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of  $\beta$ -tricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2 // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27. – No. 29. – P. 5118-5126.

114. Tanaka T. et al. Use of an injectable complex of  $\beta$ -tricalcium phosphate granules, hyaluronate, and fibroblast growth factor-2 on repair of unstable intertrochanteric fractures // *The Open Biomedical Engineering Journal*. – 2012. – Vol. 6. – P. 98.

115. Sous M. et al. Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics // *Biomaterials*. – 1998. – Vol. 19. – No. 23. – P. 2147-2153.

116. Liu H. et al.  $\beta$ -Tricalcium phosphate nanoparticles adhered carbon nanofibrous membrane for human osteoblasts cell culture // *Materials Letters*. – 2010. –

Vol. 64. – No. 6. – P. 725-728.

117. Cai S. et al. Fabrication and biological characteristics of  $\beta$ -tricalcium phosphate porous ceramic scaffolds reinforced with calcium phosphate glass // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2009. – Vol. 20. – No. 1. – P. 351-358.

118. Yao C. H. et al. Biocompatibility and biodegradation of a bone composite containing tricalcium phosphate and genipin crosslinked gelatin // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2004. – Vol. 69. – No. 4. – P. 709-717.

119. Miao X. et al. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly (lactic-co-glycolic acid) // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – Vol. 4. – No. 3. – P. 638-645.

120. Cardenas L. J. et al. Synthesis and in vitro cell compatibility of  $\alpha$ -tricalcium phosphate-based apatite cement containing tricalcium silicate // *The Third International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam*. – Springer, Berlin, Heidelberg. – 2010. – P. 207-210.

121. Liu L. et al. Reconstruction of Cranial Bone Defects Using a Compound of Bone Marrow Stromal Cells and Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate // *Key Engineering Materials*. – Trans Tech Publications Ltd. 2008. – Vol. 368. – P. 1235-1237.

122. Roy M. et al. Laser processing of bioactive tricalcium phosphate coating on titanium for load-bearing implants // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – Vol. 4. – No. 2. – P. 324-333.

123. Luginbuehl V. et al. Controlled release of tetracycline from biodegradable  $\beta$ -tricalcium phosphate composites // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2010. – Vol. 92. – No. 2. – P. 341-352.

124. Shirasu N. et al. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate // *Acta histochemica*. – 2010. – Vol. 112. – No. 3. – P. 270-277.

125. Liu G. et al. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and  $\beta$ -tricalcium phosphate // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2008. – Vol. 19. – No. 6. – P. 2367-2376.

126. Bi L. et al. Reconstruction of goat tibial defects using an injectable tricalcium phosphate/chitosan in combination with autologous platelet-rich plasma // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – No. 12. – P. 3201-3211.

127. Boyd A. R. et al. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings deposited via a co-deposition sputter technique // *Materials Science and Engineering: C*. – 2015. – Vol. 46. – P. 290-300.

128. Li L. et al. Comparison study of biomimetic strontium-doped calcium phosphate coatings by electrochemical deposition and air plasma spray: morphology, composition and bioactive performance // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2012. – Vol. 23. – No. 10. – P. 2359-2368.

129. Eliaz N., Metoki N. Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications // *Materials*. – 2017. – Vol. 10. – No. 4. – P. 334.

130. Pichugin V. F. et al. The preparation of calcium phosphate coatings on titanium and nickel–titanium by rf-magnetron-sputtered deposition: composition, structure and micromechanical properties // *Surface and Coatings Technology*. – 2008. – Vol. 202. – No. 16. – P. 3913-3920.

131. Surmenev R. et al. Radio frequency magnetron sputter deposition as a tool for surface modification of medical implants // *Modern technologies for creating the thin-film systems and coatings*. – 2017. – P. 213-248.

132. Surmeneva M. A. et al. Comparative study of the radio-frequency magnetron sputter deposited CaP films fabricated onto acid-etched or pulsed electron beam-treated titanium // *Thin Solid Films*. – 2014. – Vol. 571. – P. 218-224.

133. Ruddell D. E., Thompson J. Y., Stoner B. R. Mechanical properties of a dental ceramic coated by RF magnetron sputtering // *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for*

Biomaterials. – 2000. – Vol. 51. – No. 3. – P. 316-320.

134. Chen K. et al. Growth of c-axis orientation ZnO films on polymer substrates by radio-frequency magnetron sputtering // *Optical Materials*. – 2008. – Vol. 30. – No. 8. – P. 1244-1250.

135. Graziani G. et al. Ion-substituted calcium phosphate coatings deposited by plasma-assisted techniques: A review // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – Vol. 74. – P. 219-229.

136. Boanini E., Gazzano M., Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature // *Acta biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6. – No. 6. – P. 1882-1894.

137. Solla E. L. et al. Study of the composition transfer in the pulsed laser deposition of silicon substituted hydroxyapatite thin films // *Applied surface science*. – 2007. – Vol. 253. – No. 19. – P. 8282-8286.

138. Thian E. S. et al. Silicon-substituted hydroxyapatite: The next generation of bioactive coatings // *Materials Science and Engineering: C*. – 2007. – Vol. 27. – No. 2. – P. 251-256.

139. Rau J. V. et al. Bioactive, nanostructured S i-substituted hydroxyapatite coatings on titanium prepared by pulsed laser deposition // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2015. – Vol. 103. – No. 8. – P. 1621-1631.

140. Šupová M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review // *Ceramics international*. – 2015. – Vol. 41. – No. 8. – P. 9203-9231.

141. Xue W. et al. Preparation and cell-materials interactions of plasma sprayed strontium-containing hydroxyapatite coating // *Surface and Coatings technology*. – 2007. – Vol. 201. – No. 8. – P. 4685-4693.

142. Chavassieux P. et al. Fluoride increases rat osteoblast function and population after in vivo administration but not after in vitro exposure // *Bone*. – 1993. – Vol. 14. – No. 5. – P. 721-725.

143. Thian E. S. et al. Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties // *Journal of Materials Science*:

Materials in Medicine. – 2013. – Vol. 24. – No. 2. – P. 437-445.

144. Hong Z. et al. Osteoblast proliferation on hydroxyapatite coated substrates prepared by right angle magnetron sputtering // Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2010. – Vol. 93. – No. 3. – P. 878-885.

145. Landi E. et al. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2008. – Vol. 19. – No. 1. – P. 239-247.

146. Spence G. et al. Carbonate substituted hydroxyapatite: resorption by osteoclasts modifies the osteoblastic response // Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2009. – Vol. 90. – No. 1. – P. 217-224.

147. Yang Y. C. et al. Flame sprayed zinc doped hydroxyapatite coating with antibacterial and biocompatible properties // Ceramics International. – 2017. – Vol. 43. – P. S829-S835.

148. Iqbal N. et al. Characterization, antibacterial and in vitro compatibility of zinc–silver doped hydroxyapatite nanoparticles prepared through microwave synthesis // Ceramics International. – 2014. – Vol. 40. – No. 3. – P. 4507-4513.

149. Li Y. et al. Rapid sterilization and accelerated wound healing using Zn<sup>2+</sup> and graphene oxide modified g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> under dual light irradiation // Advanced Functional Materials. – 2018. – Vol. 28. – No. 30. – P. 1800299.

150. Kolmas J., Groszyk E., Kwiatkowska-Różycka D. Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties // BioMed Research International. – 2014. – P. 2014.

151. Bhattacharjee A. et al. Site-specific antibacterial efficacy and cyto/hemo-compatibility of zinc substituted hydroxyapatite // Ceramics International. – 2019. – Vol. 45. – No. 9. – P. 12225-12233.

152. Riaz M. et al. Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and

evaluation of antibacterial activity // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – Vol. 90. – P. 308-313.

153. Habibovic P., Barralet J. E. *Bioinorganics and biomaterials: bone repair* // *Acta biomaterialia*. – 2011. – Vol. 7. – No. 8. – P. 3013-3026.

154. Yang L. et al. The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – No. 11. – P. 2976-2989.

155. Huang Y. et al. Osteoblastic cell responses and antibacterial efficacy of Cu/Zn co-substituted hydroxyapatite coatings on pure titanium using electrodeposition method // *Rsc Advances*. – 2015. – Vol. 5. – No. 22. – P. 17076-17086.

156. Mróz W. et al. Structural studies of magnesium doped hydroxyapatite coatings after osteoblast culture // *Journal of Molecular Structure*. – 2010. – Vol. 977. – No. 1-3. – P. 145-152.

157. Mróz W. et al. Characterization of calcium phosphate coatings doped with Mg, deposited by pulsed laser deposition technique using ArF excimer laser // *Micron*. – 2009. – Vol. 40. – No. 1. – P. 140-142.

158. Ren F. et al. Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6. – No. 7. – P. 2787-2796.

159. Tampieri A. et al. Magnesium doped hydroxyapatite: synthesis and characterization // *Key Engineering Materials*. – Trans Tech Publications Ltd. – 2004. – Vol. 264. – P. 2051-2054.

160. Sprio S. et al. Raman and cathodoluminescence spectroscopies of magnesium-substituted hydroxyapatite powders // *Journal of materials research*. – 2005. – Vol. 20. – No. 4. – P. 1009-1016.

161. Mróz W. et al. In vivo implantation of porous titanium alloy implants coated with magnesium-doped octacalcium phosphate and hydroxyapatite thin films using pulsed laser deposition // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2015. – Vol. 103. – No. 1. – P. 151-158.

162. Tardei C. et al. The study of Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> substitution of-tricalcium phosphate

// Journal of Optoelectronics and advanced Materials. – 2006. – Vol. 8. – No. 2. – P. 568-571.

163. Hashimoto K., Matsumoto N., Shibata H. Control of beta-tricalcium phosphate biomaterial properties by metal-ion-substitution // Phosphorus Research Bulletin. – 2014. – Vol. 29. – P. 21-30.

164. Roy M., Bose S. Osteoclastogenesis and osteoclastic resorption of tricalcium phosphate: Effect of strontium and magnesium doping // Journal of biomedical materials research Part A. – 2012. – Vol. 100. – No. 9. – P. 2450-2461.

165. Yoshida K. et al. Substitution model of monovalent (Li, Na, and K), divalent (Mg), and trivalent (Al) metal ions for  $\beta$ -tricalcium phosphate // Journal of the American Ceramic Society. – 2006. – Vol. 89. – No. 2. – P. 688-690.

166. Yashima M. et al. Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction // Journal of Solid State Chemistry. – 2003. – Vol. 175. – No. 2. – P. 272-277.

167. Boanini E. et al. Strontium and zinc substitution in  $\beta$ -tricalcium phosphate: An X-ray diffraction, solid state NMR and ATR-FTIR study // Journal of functional biomaterials. – 2019. – Vol. 10. – No. 2. – P. 20.

168. Parra J. et al. In vitro study of the proliferation and growth of human fetal osteoblasts on Mg and Si co-substituted tricalcium phosphate ceramics // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2017. – Vol. 105. – No. 8. – P. 2266-2275.

169. Boyd A. R. et al. The deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2015. – Vol. 26. – No. 2. – P. 1-14.

170. Capuccini C. et al. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response // Acta Biomaterialia. – 2008. – Vol. 4. – No. 6. – P. 1885-1893.

171. Pereiro I. et al. Pulsed laser deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings // Applied Surface Science. – 2012. – Vol. 258. – No. 23. – P. 9192-9197.

172. Ozeki K. et al. Characterization of Sr-substituted hydroxyapatite thin film by



sputtering technique from mixture targets of hydroxyapatite and strontium apatite // *Bio-Medical Materials and Engineering*. – 2014. – Vol. 24. – No. 2. – P. 1447-1456.

173. Bigi A. et al. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals // *Inorganica Chimica Acta*. – 2007. – Vol. 360. – No. 3. – P. 1009-1016.

174. Li Z. Y. et al. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28. – No. 7. – P. 1452-1460.

175. O'donnell M. D. et al. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – Vol. 4. – No. 5. – P. 1455-1464.

176. Terra J. et al. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2009. – Vol. 11. – No. 3. – P. 568-577.

177. Pan H. B. et al. Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration // *Acta Biomaterialia*. – 2009. – Vol. 5. – No. 5. – P. 1678-1685.

178. Ratnayake J. T. B., Mucalo M., Dias G. J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2017. – Vol. 105. – No. 5. – P. 1285-1299.

179. Ozeki K., Fukui Y., Aoki H. Influence of the calcium phosphate content of the target on the phase composition and deposition rate of sputtered films // *Applied surface science*. – 2007. – Vol. 253. – No. 11. – P. 5040-5044.

180. Sigmund P. Theory of sputtering. I. Sputtering yield of amorphous and polycrystalline targets // *Physical review*. – 1969. – Vol. 184. – No. 2. – P. 383.

181. Ozeki K. et al. Phase composition of sputtered film from a mixture target of hydroxyapatite and strontium-apatite // *Journal Of Materials Science & Technology*. – 2013. – Vol. 29. – No. 1. – P. 1-6.

182. Petrov I. et al. Comparison of magnetron sputter deposition conditions in neon, argon, krypton, and xenon discharges // *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*. – 1993. – Vol. 11. – No. 5. – P. 2733-2741.

183. Takagi Y. et al. Generation processes of super-high-energy atoms and ions in magnetron sputtering plasma // *Vacuum*. – 2006. – Vol. 80. – No. 6. – P. 581-587.

184. Schmidt S. et al. A comparative study of direct current magnetron sputtering and high power impulse magnetron sputtering processes for CN<sub>x</sub> thin film growth with different inert gases // *Diamond and Related Materials*. – 2016. – Vol. 64. – P. 13-26.

185. Bowes M., Bradley J. W. Inert gas effects on the deposition rate of TiO<sub>2</sub> during reactive HiPIMS // *Surface and Coatings Technology*. – 2014. – Vol. 250. – P. 2-6.

186. Surmenev R. A. A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication // *Surface and Coatings Technology*. – 2012. – Vol. 206. – No. 8-9. – P. 2035-2056.

187. Yamashita K., Yagi T., Umegaki T. Bonelike coatings onto ceramics by reactive magnetron sputtering // *Journal of the American Ceramic Society*. – 1996. – Vol. 79. – No. 12. – P. 3313-3316.

188. Ivanova A. A. et al. Structural evolution and growth mechanisms of RF-magnetron sputter-deposited hydroxyapatite thin films on the basis of unified principles // *Applied Surface Science*. – 2017. – Vol. 425. – P. 497-506.

189. Astala R., Stott M. J. First-principles study of hydroxyapatite surfaces and water adsorption // *Physical Review B*. – 2008. – Vol. 78. – No. 7. – P. 075427.

190. Buyle G. et al. Simplified model for the DC planar magnetron discharge // *Vacuum*. – 2004. – Vol. 74. – No. 3-4. – P. 353-358.

191. Herrmann D. et al. Analysis of relevant plasma parameters for ZnO: Al film deposition based on data from reactive and non-reactive DC magnetron sputtering // *Surface and Coatings Technology*. – 2003. – Vol. 174. – P. 229-234.

192. Cebulla R., Wendt R., Ellmer K. Al-doped zinc oxide films deposited by simultaneous rf and dc excitation of a magnetron plasma: relationships between plasma parameters and structural and electrical film properties // *Journal of Applied Physics*. – 1998. – Vol. 83. – No. 2. – P. 1087-1095.

193. Matsunami N. et al. Energy dependence of the ion-induced sputtering yields of monatomic solids // *Atomic data and nuclear data tables*. – 1984. – Vol. 31. – No. 1. – P. 1-80.

194. Cai Y. et al. Influence of negative ion resputtering on Al-doped ZnO thin films

prepared by mid-frequency magnetron sputtering // *Applied surface science*. – 2010. – Vol. 256. – No. 6. – P. 1694-1697.

195. Kester D. J., Messier R. Macro-effects of resputtering due to negative ion bombardment of growing thin films // *Journal of materials research*. – 1993. – Vol. 8. – No. 8. – P. 1928-1937.

196. Cuomo J. J. et al. Significance of negative ion formation in sputtering and SIMS analysis // *Journal of Vacuum Science and Technology*. – 1978. – Vol. 15. – No. 2. – P. 281-287.

197. van Dijk K. et al. Study of the influence of oxygen on the composition of thin films obtained by rf sputtering from a  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  target // *Thin Solid Films*. – 1997. – Vol. 304. – No. 1-2. – P. 191-195.

198. Aissani L. et al. Influence of film thickness and  $\text{ArN}_2$  plasma gas on the structure and performance of sputtered vanadium nitride coatings // *Surface and Coatings Technology*. – 2019. – Vol. 378. – P. 124948.

199. Wang L. et al. Effect of He content on microstructure, mechanical properties and He thermal desorption behavior of W film fabricated by RF magnetron sputtering // *Journal of Nuclear Materials*. – 2020. – Vol. 534. – P. 152151.

200. Kusano Y. et al. Influence of inert gases on ionized magnetron plasma deposition of carbon nitride thin films // *Surface and Coatings Technology*. – 2003. – Vol. 174. – P. 601-605.

201. Schmidt S. et al. Influence of inert gases on the reactive high power pulsed magnetron sputtering process of carbon-nitride thin films // *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*. – 2013. – Vol. 31. – No. 1. – P. 011503.

202. Novotný M. et al. RF magnetron sputtering of silver thin film in Ne, Ar and Kr discharges—plasma characterisation and surface morphology // *Surface and Coatings Technology*. – 2013. – Vol. 228. – P. S466-S469.

203. Song P. K. et al. Crystal structure and photocatalytic activity of  $\text{TiO}_2$  films deposited by reactive sputtering using Ne, Ar, Kr, or Xe gases // *Japanese journal of applied physics*. – 2004. – Vol. 43. – No. 3A. – P. L358.

204. Motohiro T., Taga Y. Monte Carlo simulation of thermalization process of

sputtered particles // *Surface Science*. – 1983. – Vol. 134. – No. 1. – P. L494-L499.

205. Hagstrum H. D. Auger ejection of electrons from molybdenum by noble gas ions // *Physical Review*. – 1956. – Vol. 104. – No. 3. – P. 672.

206. Chandra R., Chawla A. K., Ayyub P. Optical and structural properties of sputter-deposited nanocrystalline Cu<sub>2</sub>O films: Effect of sputtering gas // *Journal of nanoscience and nanotechnology*. – 2006. – Vol. 6. – No. 4. – P. 1119-1123.

207. Geesink R. G. T., de Groot K., Klein C. P. A. T. Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings: the development of a human total hip prosthesis for chemical fixation to bone using hydroxyl-apatite coatings on titanium substrates // *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. – 1987. – Vol. 225. – P. 147-170.

208. de Groot K., Wolke J. G. C., Jansen J. A. Calcium phosphate coatings for medical implants // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. – 1998. – Vol. 212. – No. 2. – P. 137-147.

209. Prosolov K. A. et al. Glancing angle deposition of Zn-doped calcium phosphate coatings by RF magnetron sputtering // *Coatings*. – 2019. – Vol. 9. – No. 4. – P. 220.

210. Stipniece L. et al. Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method // *Ceramics International*. – 2014. – Vol. 40. – No. 2. – P. 3261-3267.

211. Salma-Ancane K. et al. Effect of Mg content on thermal stability of  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics // *Key Engineering Materials*. – Trans Tech Publications Ltd. 2014. – Vol. 604. – P. 192-195.

212. Korotchenko N.M., Rasskazova L.A. Laboratory workshop on the course of modern inorganic synthesis. Microwave synthesis of substances and materials // *Calcium Phosphates. Teaching aid*. Tomsk: Publishing House of Tomsk State University. – 2015. P. 64.

213. Rasskazova L. A. et al. Synthesis of magnesium-and silicon-modified hydroxyapatites by microwave-assisted method // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – No. 1. – P. 1-10.

214. Pharr G. M., Oliver W. C. Measurement of thin film mechanical properties

using nanoindentation // *Mrs Bulletin*. – 1992. – Vol. 17. – No. 7. – P. 28-33.

215. Blöchl P. E. Projector augmented-wave method // *Physical review B*. – 1994. – Vol. 50. – No. 24. – P. 17953.

216. Kresse G., Joubert D. From ultrasoft pseudopotentials to the projector augmented-wave method // *Physical review b*. – 1999. – Vol. 59. – No. 3. – P. 1758.

217. Kresse G., Hafner J. Ab initio molecular dynamics for open-shell transition metals // *Physical Review B*. – 1993. – Vol. 48. – No. 17. – P. 13115.

218. Kresse G., Furthmüller J. Efficient iterative schemes for ab initio total-energy calculations using a plane-wave basis set // *Physical review B*. – 1996. – Vol. 54. – No. 16. – P. 11169.

219. Perdew J. P., Burke K., Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple // *Physical review letters*. – 1996. – Vol. 77. – No. 18. – P. 3865.

220. Zuk P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue engineering*. – 2001. – Vol. 7. – No. 2. – P. 211-228.

221. Pichugin V. F. et al. 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. – No. 2. – P. 282-291.

222. Torrisi L., Foti G. keV ion sputtering of hydroxyapatite // *Applied physics letters*. – 1993. – Vol. 62. – No. 3. – P. 237-239.

223. Prado da Silva M. H. et al. In vitro cellular response to titanium electrochemically coated with hydroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2003. – Vol. 14. – No. 6. – P. 511-519.

224. Stipp S. L., Hochella Jr M. F. Structure and bonding environments at the calcite surface as observed with X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and low energy electron diffraction (LEED) // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1991. – Vol. 55. – No. 6. – P. 1723-1736.

225. Ni M., Ratner B. D. Differentiating calcium carbonate polymorphs by surface analysis techniques—an XPS and TOF-SIMS study // *Surface and Interface Analysis: An*

International Journal devoted to the development and application of techniques for the analysis of surfaces, interfaces and thin films. – 2008. – Vol. 40. – No. 10. – P. 1356-1361.

226. Kačiulis S. et al. XPS study of apatite-based coatings prepared by sol–gel technique // *Applied Surface Science*. – 1999. – Vol. 151. – No. 1-2. – P. 1-5.

227. Matsunaga K. et al. First-principles calculations of divalent substitution of Ca<sup>2+</sup> in tricalcium phosphates // *Acta Biomaterialia*. – 2015. – Vol. 23. – P. 329-337.

228. Mardziah C. M., Sopyan I., Ramesh S. Strontium-doped hydroxyapatite nanopowder via sol-gel method: effect of strontium concentration and calcination temperature on phase behavior // *Artif. Organs*. – 2009. – Vol. 23. – No. 2. – P. 105-113.

229. Lide D. R. CRC handbook of chemistry and physics // CRC press. – 2004. – Vol. 85.

230. Ryu H. S. et al. Variations of structure and composition in magnesium incorporated hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate // *Journal of materials research*. – 2006. – Vol. 21. – No. 2. – P. 428-436.

231. Kaygili O., Keser S. Sol–gel synthesis and characterization of Sr/Mg, Mg/Zn and Sr/Zn co-doped hydroxyapatites // *Materials Letters*. – 2015. – Vol. 141. – P. 161-164.

232. Tardei C. et al. The study of Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> substitution of-tricalcium phosphate // *Journal of Optoelectronics and advanced Materials*. – 2006. – Vol. 8. – No. 2. – P. 568-571.

233. Kannan S. et al. Synthesis and structural characterization of strontium-and magnesium-co-substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate // *Acta biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6. – No. 2. – P. 571-576.

234. Bigi A. et al. Isomorphous substitutions in  $\beta$ -tricalcium phosphate: the different effects of zinc and strontium // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 1997. – Vol. 66. – No. 4. – P. 259-265.

235. Filgueiras M. R. T., Mkhonto D., de Leeuw N. H. Computer simulations of the adsorption of citric acid at hydroxyapatite surfaces // *Journal of crystal growth*. – 2006. – Vol. 294. – No. 1. – P. 60-68.

236. Gittens R. A. et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10. – No. 7. – P. 2907-2918.
237. Behrisch R., Wittmaack K. Sputtering by particle bombardment // New York: Springer-Verlag. – 1981. – P. 9-64.
238. Seah M. P. Pure element sputtering yields using 500–1000 eV argon ions // *Thin Solid Films*. – 1981. – Vol. 81. – No. 3. – P. 279-287.
239. D. Depla. Magnetrons, reactive gases and sputtering. 3-rd edition. – 2015. – 311 p.
240. Petrov I. et al. Comparison of some basic plasma parameters and discharge characteristics of planar magnetron sputtering discharges in argon and neon // *Contributions to Plasma Physics*. – 1990. – Vol. 30. – No. 2. – P. 223-231.
241. Grubova I. Y. et al. Density functional theory study of interface interactions in hydroxyapatite/rutile composites for biomedical applications // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2017. – Vol. 121. – No. 29. – P. 15687-15695.
242. Sharkeev Y. et al. *Bioceramics and Biocomposites* // New York: Wiley. – 2019.
243. Hallab N. J. et al. Cell adhesion to biomaterials: correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein, and cell morphology // *Journal of long-term effects of medical implants*. – 1995. – Vol. 5. – No. 3. – P. 209-231.
244. Hallab N. J. et al. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion // *Tissue engineering*. – 2001. – Vol. 7. – No. 1. – P. 55-71.
245. Peššková V. et al. The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – Vol. 18. – No. 3. – P. 465-473.
246. Yuan H. et al. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – No. 31. – P. 13614-13619.
247. Ellingsen J. E., Lyngstadaas S. P. Bio-implant interface: improving

biomaterials and tissue reactions // Boca Raton: CRC Press. – 2003.

248. Subramani K. Emerging nanotechnologies in dentistry // New York: William Andrew. – 2017.

249. Pichugin V. F. 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.

250. Chai Y. C. et al. Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies // Acta biomaterialia. – 2012. – Vol. 8. – No. 11. – P. 3876-3887.

251. Dvorak M. M., Riccardi D. Ca<sup>2+</sup> as an extracellular signal in bone // Cell calcium. – 2004. – Vol. 35. – No. 3. – P. 249-255.

252. Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation // Journal of cellular biochemistry. – 2006. – Vol. 97. – No. 1. – P. 56-70.

253. Ahlstrom M. et al. Extracellular calcium regulates parathyroid hormone-related peptide expression in osteoblasts and osteoblast progenitor cells // Bone. – 2008. – Vol. 42. – No. 3. – P. 483-490.

254. Nakade O. et al. Effect of extracellular calcium on the gene expression of bone morphogenetic protein-2 and-4 of normal human bone cells // Journal of bone and mineral metabolism. – 2001. – Vol. 19. – No. 1. – P. 13-19.

255. Yanai R. et al. Extracellular calcium stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by enhancing bone morphogenetic protein-2 expression // Cell Calcium. – 2019. – Vol. 83. – P. 102058.

256. Aerts F., Wagemaker G. Mesenchymal stem cell engineering and transplantation // Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells // Berlin: Springer. – 2006. – P. 1-44.



## ПРИЛОЖЕНИЕ А. АКТ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии  
имени академика Г.А. Илизарова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации  
ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России

6, ул. М. Ульяновой, г. Курган, 640014, Россия  
Тел. (352 2) 45-47-47, факс (3522) 45-40-60, 45-45-05  
E-mail: office@ilizarov.ru Internet: www.ilizarov.ru

№ \_\_\_\_\_

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по научной  
работе ФГБУ «НМИЦ ТО  
имени академика Г.А. Илизарова»  
Минздрава России,  
кандидат биологических наук

Е.Н. Овчинников

МП

АКТ

об использовании результатов диссертационной работы  
Федоткина А.Ю. в ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Настоящий акт составлен представителями ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г. А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по результатам проведенных совместно с Томским политехническим университетом экспериментальных исследований в рамках соглашения № 89 о стратегическом партнерстве между федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» от 21 мая 2018 г.

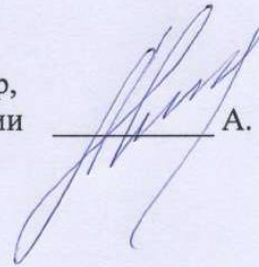
Целью работы Федоткина Александра Юрьевича являлось повышение остеоиндуктивности медицинских имплантатов для их дальнейшего использования в исследованиях и экспериментальной клинической практике. Поставленная задача решалась путем формирования биоактивных кальций-фосфатных покрытий методом высокочастотного магнетронного распыления. Метод высокочастотного магнетронного распыления позволяет в атмосфере различных инертных газов формировать биоактивные кальций-фосфатные покрытия на поверхности широкого спектра материалов.

Федоткиным А.Ю. методом магнетронного напыления были сформированы кальций-фосфатные покрытия на поверхности стальных стержней-шурупов для их дальнейшего использования в ФГБУ «НМИЦ ТО



имени академика Г. А. Илизарова» в исследованиях и экспериментальной клинической практике (акт приемки-передачи от 19.10.2021 г.). Проведенные исследования показали, что разработанные покрытия являются перспективными и благодаря своей высокой адгезионной прочности могут применяться для изготовления костных имплантатов, подвергаемых при установке высокой механической нагрузке.

Главный научный сотрудник  
лаборатории коррекции деформаций  
и удлинения конечностей, д.м.н., профессор,  
врач травматолог-ортопед высшей категории



А. В. Попков