

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»**

На правах рукописи



Шаронова Анна Александровна

**ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО МНОГОСЛОЙНОГО
БИОКОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И
ГИДРОКСИАПАТИТА НА ПОВЕРХНОСТИ ТИТАНА ДЛЯ
МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

1.3.8 – Физика конденсированного состояния

2.2.12 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель
кандидат физико-математических наук,
Сурменева Мария Александровна

Томск – 2024 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Биоматериалы	13
1.1 Понятие биосовместимости	14
1.2 Требования, предъявляемые к материалам медицинского назначения.....	15
1.3 Биосовместимые покрытия	16
1.4 Антибактериальные свойства покрытий	18
2 Модифицирование поверхности медицинских имплантатов посредством формирования поверхностных слоев	19
2.1 Нанесение биосовместимых покрытий.....	19
2.2 Стратегии формирования многофункциональных слоев.....	19
2.3 Способы формирования кальций-фосфатных покрытий	21
2.3.1 Параметры покрытия, оказывающие влияние на биосовместимость	25
3 Способы создания наноструктурированных слоев серебра	27
3.1 Коллоидные системы.....	27
3.2 Наночастицы серебра.....	30
4. Материалы и методы	32
4.1 Материалы и химикаты	33
4.2 Лабораторное оборудование	33
4.3 Приготовление кальций-фосфатной мишени.....	34
4.4 Формирование кальций-фосфатного покрытия	34
4.5 Синтез наночастиц серебра в присутствии стабилизатора ПВП/ПЭИ	39
4.6 Электрофоретическое осаждение	40
4.7 Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия.....	41
4.8 Рентгенофазовый анализ	42
4.9 Спектральная эллипсометрия	44
4.10 Динамическое рассеяние света и дзета-потенциал.....	46
4.11 Анализ треков наночастиц	49
4.12 Атомно-абсорбционная спектроскопия	50
4.13 Исследование адгезионной прочности покрытия методом скретч-тест.....	51
4.14 Исследование растворимости Ag-ГА биокompозита и его антибактериальных свойств <i>in vitro</i>	52
4.15 Биологические исследования с использованием клеточных культур в условиях <i>in vitro</i>	53

4.16 Флуоресцентный анализ	54
4.17 Инфракрасная спектроскопия.....	55
5. Результаты экспериментальных исследований	57
5.1 Оптимизация способа получения AgНЧ, морфологические свойства, особенности функционализации поверхности.....	57
5.1.1 Исследование заряда и размера наночастиц серебра.....	57
5.1.2 Исследование характера размещения наночастиц серебра на поверхности титана и ГА покрытий	61
5.1.3 Технологические возможности метода ЭФО осаждения, влияние параметров ЭФО осаждения на характер распределения AgНЧ и их концентрацию.	65
5.2 ГА покрытие	73
5.2.1 Исследование толщины и оптических констант ГА покрытий	73
5.2.2. Исследование морфологии и структуры ГА покрытий.....	77
5.3 Ag-ГА биокompозит	82
5.3.1 Структура и свойства Ag-ГА биокompозита	82
5.3.2. Физико-механические свойства Ag-ГА биокompозита	86
6 In vitro – исследование	88
6.1 Исследование поведения Ag-ГА биокompозита в модельной биологической среде натрий-фосфатного буфера.....	88
6.2 Антибактериальное исследование Ag-ГА биокompозита	90
ВЫВОДЫ.....	98
ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:.....	101
ПРИЛОЖЕНИЕ А АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КАНДИДАТСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ В УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС	115
ПРИЛОЖЕНИЕ Б АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ В НАУЧНО -ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ.....	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации. Разработка новых композитных, наноструктурированных биоматериалов с заданными свойствами является актуальным направлением современных междисциплинарных научных исследований, и является фундаментальной задачей медицинского материаловедения, физики и химии твердого тела. В настоящее время интенсивно возрастающий интерес научного сообщества связан с исследованием различных послеоперационных осложнений в результате действия бактерий в результате хирургического вмешательства, что может приводить к удалению имплантата.

Несмотря на многочисленные исследования, проблема снижения риска такого рода осложнений остается нерешенной в травматологии, ортопедии, и стоматологии до настоящего времени [1-3]. Решением данной проблемы является создание биокompозита путем модифицирования поверхности имплантата посредством формирования многослойной гетерогенной системы. Подобные системы слоев позволяют придавать имплантатам необходимые свойства для решения конкретных задач. Так, для получения прочной связи на границе раздела кость-имплантат и улучшения его антибактериальных и биоактивных свойств представляет большой интерес создание многослойной системы на основе титана, способного нести длительные и высокие нагрузки, слоев биоактивного кальций-фосфата и наночастиц серебра (AgНЧ), придающих данной системе антибактериальные свойства [4-7].

Настоящая диссертационная работа направлена на получение серебросодержащего (Ag-ГА) биокompозита, представляющего собой комбинацию слоев на основе AgНЧ и кальций-фосфатных (гидроксиапатит, ГА, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) покрытий с детерминированной структурой. Метод высокочастотного магнетронного распыления (ВЧМР) позволяет, управляя режимами процесса осаждения, формировать покрытия с заранее заданными свойствами [8, 9]. В свою очередь метод химического восстановления нитрата серебра глюкозой в присутствии стабилизатора позволяет контролировать заряд, размер и форму наночастиц, при этом коллоидный раствор (КР) долгое время остается стабильным [10, 11]. Следует отметить, что сохранение физических, химических и биологических свойств покрытий остается важной задачей в процессе модифицирования материалов для медицинских имплантатов.

Степень разработанности темы исследования. Используемые в настоящее время металлические имплантаты с течением времени подвергаются коррозионному воздействию, что приводит к появлению продуктов коррозии, которые проникают в прилегающие живые ткани, что может способствовать возникновению металлоза. В данном случае вокруг имплантата формируется фиброзная капсула, вследствие чего происходит расшатывание имплантата и воспаление окружающих тканей, что значительно осложняет процедуру послеоперационного

лечения и восстановления [12-15]. Немаловажным является и тот факт, что каждый организм уникален и по-разному взаимодействует с имплантатом. Следовательно, в стоматологии, ортопедии и травматологии остается актуальной задача разработки новых типов биосовместимых материалов, способных адресно решать задачи восстановления поврежденных тканей.

Для улучшения биосовместимых свойств имплантатов выделяют два направления: создание новых конструкционных материалов и модифицирование поверхности стандартизованных имплантатов с использованием различных типов биосовместимых покрытий, в том числе композитных (гибридных). К настоящему времени выполнено большое количество научно-исследовательских работ по изучению гибридных многослойных покрытий, сформированных на поверхности металлических имплантатов. Основная задача исследований заключается в поиске новых методик модифицирования поверхности имплантатов с целью предотвращения выхода легирующих элементов и одновременного увеличения остеоинтеграции. Проблемой увеличения биоактивности металлических имплантатов занимаются многие ученые в России и за рубежом: Шаркеев Ю.П., Сурменова М.А., Твердохлебов С.И., Штанский Д.В., Батрак И.К., Маркеев А.М., Баринов С.М., Яковлев В.И., Попова А.А., Лясникова А. В., Лясников В. Н., Boyd A.R., Guillot R., Liu X.Y. и т.д. В их трудах продемонстрированы методики формирования оксидных слоев с целью увеличения коррозионной стойкости, а также биоактивного покрытия на основе кальций-фосфатов. Однако, несмотря на большое количество опубликованных работ, малоизученными остаются многофункциональные биопокрытия, одновременно обладающие биосовместимостью и антибактериальными свойствами.

Перспективным решением проблемы отторжения имплантатов является формирование на поверхности имплантата гибридной тонкопленочной системы, состоящей из антибактериального и биоактивного слоев, позволяющих избежать отторжения и ускорить лечебно-восстановительный процесс [16, 17]. Эффективной методикой повышения биоактивности и остеоинтеграции металлических имплантатов является формирование на его поверхности покрытия на основе ГА [18, 19]. В то же время использование наночастиц серебра позволяет придать покрытию антибактериальные свойства.

Метод ВЧМР обладает рядом ключевых преимуществ, выгодно отличающих его от остальных методов нанесения керамических покрытий [20, 21]. В дополнение, методика химического восстановления серебра позволяет синтезировать наночастицы с высокой концентрацией, и при этом контролировать их размер, форму. В свою очередь использование метода электрофоретического осаждения (ЭФО) позволяет формировать равномерный слой наночастиц на поверхности ГА покрытий, а также позволяет контролировать концентрацию осаждаемых на поверхности образцов AgНЧ [22, 23].

Цель диссертационной работы разработка многослойного биокompозита на основе ГА с детерминированной структурой и наночастиц серебра с улучшенными физико-механическими свойствами и биосовместимостью, обладающего антибактериальным действием, для функционализации поверхности металлических материалов медицинского назначения.

Для достижения поставленной цели в диссертационном исследовании были сформулированы и решены следующие задачи:

1. Получить ГА покрытия методом ВЧМР с различной толщиной. Установить зависимость формирования структурных, морфологических и фазовых характеристик ГА покрытий, сформированных методом ВЧМР.
2. Исследовать влияние термического воздействия на структуру и фазовый состав ГА покрытий.
3. Исследовать способы получения AgНЧ с заранее заданными структурно-морфологическими свойствами методом химического восстановления нитрата серебра глюкозой в присутствии стабилизаторов.
4. Осуществить выбор методики функционализации поверхности ГА покрытия наночастицами серебра. Провести оптимизацию способа формирования слоя наночастиц в рамках выбранной методики.
5. Получить на поверхности подложек различного состава многослойное покрытие путем комбинации слоев на основе ГА с детерминированной структурой, напыленных методом ВЧМР, и осаждения AgНЧ методом ЭФО.
6. Исследовать химический и фазовый состав, структуру и физико-механические свойства Ag-ГА композита.
7. Исследовать биологические свойства (цитотоксичность, биосовместимость и антибактериальную активность) Ag-ГА композита в условиях *in vitro*.

Научная новизна. В работе впервые:

1. Установлены закономерности формирования слоя AgНЧ на поверхности магнетронного ГА покрытия методом электрофоретического осаждения при использовании следующих условий электрофоретического процесса: напряжение 50 В, время осаждения 30 мин, расстояние между анодом и катодом ~ 1,5 мм, среда на основе этанола с концентрацией наночастиц серебра 60 мг/л.
2. Предложен новый способ создания композитов на основе многослойной системы, состоящей из ГА слоев с различной структурой и толщиной (~ 150 нм и ~ 800 нм), а также слоя наночастиц серебра диаметром ~ 70 нм.
3. Показана антибактериальная активность Ag-ГА композита (концентрация суспензии $2,5 \pm 0,3$ мг/л) по отношению к бактериям штамма кишечной палочки (*E. coli*) в условиях *in vitro*.

4. Установлено, что полученный Ag-ГА композит является биосовместимым и не оказывает существенного влияния на цитотоксичность подобных остеобластам клеток человека в условиях *in vitro*.

Теоретическая значимость работы. Результаты, полученные в процессе выполнения диссертационной работы, вносят значительный вклад в развитие медицинского материаловедения, физики конденсированного состояния. Установлены закономерности формирования слоя AgНЧ методом ЭФО в зависимости от технологических режимов, а также технологии получения композитных покрытий.

Практическая значимость работы. Выполненные в работе исследования являются основой для разработки технологии формирования многослойных покрытий на медицинских изделиях, в частности, для восстановления зубных единиц и костных дефектов. Предложенная в работе методика формирования Ag-ГА композита позволяет управлять его структурой и свойствами, которые определяют функциональность материалов и целевое назначение композита.

Разработана и апробирована новая методика создания многослойной системы покрытий на основе Ag-ГА композита для применения в медицинской практике.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы основывается на комплексном подходе к анализу и решению задач в области создания новых биоматериалов с использованием современных методик исследования.

В диссертационной работе использовались следующие методы: рентгенофазовый анализ (РФА), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРА), инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия), оптическая эллипсометрия, анализ треков наночастиц (АТН), динамическое рассеяние света (ДРС), склерометрия (скретч-тест), атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС), флуоресцентная микроскопия. В условиях *in vitro*, посредством использования методики исследования биосовместимости, антибактериальной активности и биodeградации, представлено медико-биологическое обоснование перспективы использования Ag-ГА композита.

Научные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Содержание серебра от 2 до 23 мкг/см² на поверхности ГА слоя обеспечивается следующим набором основных параметров электрофоретического осаждения наночастиц серебра (ПВП, z-потенциал $-22,5 \pm 8,1$ мВ): напряженность электрического поля от 17 до 100 В/мм, время осаждения от 10 до 50 мин, концентрация коллоидного раствора от 30 до 360 мг/л.

2. Увеличение аликвоты водного коллоидного раствора наночастиц серебра в интервале от 240 до 480 мкл при электрофоретическом осаждении приводит к изменению характера распределения наночастиц на поверхности ГА покрытия с равномерного на коагуляционный.

3. Контролируемый выход серебра достигается изменением толщины и структуры верхнего слоя на основе ГА. Увеличение толщины ГА слоя от 150 ± 30 до 800 ± 50 нм, сопровождающееся ростом областей когерентного рассеяния от 21 до 38 нм и текстурного коэффициента от 0,35 до 0,69 в направлении [002], приводит к сокращению выхода серебра на $27\pm 3\%$ в течение 72 часов.

4. Антибактериальный эффект при отсутствии цитотоксичности обеспечивается высвобождением серебра из многослойного композита, состоящего из отожженного ГА слоя толщиной от 750 до 850 нм, осажденного на титановую подложку, наночастиц серебра и верхнего ГА слоя толщиной от 120 до 180 нм, в концентрации от 2,2 до 2,8 мг/л на трети сутки растворения в модельной биологической среде (фосфатный буфер), что составляет $30\pm 2\%$ от общего содержания серебра в композите.

Достоверность и обоснованность представленных в диссертационной работе экспериментальных результатов обеспечивается корректностью поставленных задач, проведением исследований с использованием современного, сертифицированного аналитического и технологического оборудования, применением комплексных методов исследования структуры материалов их механических свойств основываясь на теоретических представления физики конденсированного состояния, а также с соблюдением принципов комплексного подхода при анализе и интерпретации экспериментальных данных, воспроизводимостью результатов, применением статистических методов оценки погрешности при обработке данных эксперимента и соответствием экспериментальных результатов литературным данным.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих школах-семинарах и конференциях: Международной конференции студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Россия, г. Томск 2015, 2016, 2017, 2018), Международной конференции с элементами научной школы для молодежи «Материалы и технологии новых поколений в современном материаловедении» (Россия, Томск, 2015 г.), International Forum on Strategic Technology (Bangladesh, Chittagong, 2014, Russia, Novosibirsk, 2016), International Young Scientists School «Nanostructured materials» (Russia, Tomsk, 2016), International Conference «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications » (Russia, Tomsk, 2016), International workshop «Smart materials and technologies» (Russia, Tomsk, 2017), International Symposium «Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine» devoted to the 75th Anniversary of the National Research Nuclear University MEPhI (Russia, Moscow, 2017), International Workshop on New Approaches to High-Tech: Nano-Design, Technology, Computer Simulations (Belarus, Minsk, 2017).

Публикации. Результаты диссертационной работы изложены в 36 публикациях, в том числе в 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК России и 8 статьях в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора в диссертационную работу заключался в постановке цели и задач диссертационной работы, планировании и проведении экспериментальных исследований, обработке и анализе полученных результатов, формулировании выводов и положений, выносимых на защиту, написании публикаций, подготовке докладов и выступлениях на семинарах и конференциях по теме работы.

Связь работы с Государственными программами и НИР. Работа выполнялась в рамках следующих научных проектов и программ: РНФ проект № 14-13-00274 «Конструирование функционально-модифицированных градиентных биокерамических покрытий на биорезорбируемом магниевом сплаве для направленного регулирования скорости резорбции» (2014-2016 гг.); Федеральная целевая программа 14.587.21.0013 «Исследование способов получения гибридных скэффолдов для регенеративной медицины» (уникальный идентификационный номер заявки 2015-14-588-0002-5599) (2015-2017 гг.); РФФИ проекты: № 13-08-98082 «Исследование физических механизмов формирования электрретного состояния в биосовместимом наноструктурном ВЧ-магнетронном кальций-фосфатном покрытии» (2013-2014 гг.); №14-08-31027 "Новое нанокompозитное покрытие с улучшенными остеоиндуктивными и антибактериальными свойствами для медицинского применения: фундаментальные исследования и практические приложения" (2014-2015 гг.); гранты Президента для поддержки молодых ученых кандидатов наук: МК-6287.2018.8 «Получение трехмерных гибридных биodeградируемых скэффолдов на основе различных комбинаций проводящего полианилина и пьезополимеров, с различными по величине и полярности значениями поверхностного заряда (потенциала)» (2018-2019 гг.); МК-6459.2016.8 «Получение и исследование биodeградируемых скэффолдов с определенным по величине и полярности поверхностным потенциалом» (2016-2017 гг.); МК-7907.2016.8 «Разработка методов модификации внутри-поровых поверхностей металлического каркаса, созданного методами быстрого прототипирования, биоактивными кальций-фосфатными соединениями, обеспечивающими повышенные остеоинтеграционные характеристики» (2016-2017 гг.); Госзадание «Наука» №11.1233.2017/4.6 «Исследование физических механизмов получения новых типов композитных скэффолдов с пьезоэлектрическим эффектом и поверхностным потенциалом для регенеративной медицины» (2017 г.); стипендия Президента РФ СП-444.2016.4 «Раз-работка антибактериальных биокомпозитов на основе кальций-фосфатного покрытия и наночастиц серебра с целью повышения эффективности операций по восстановлению зубных единиц» (2016-2018 гг.); грант Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере "Ползуновские гранты" № 7630ГУ (код

009849) "Формирование антибактериального остеоиндуктивного интерфейса медицинских имплантатов" (2015 г.).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения с выводами, списка используемых источников, включающего 206 наименований. Полный объем диссертации – 116 листов машинного текста, в том числе 40 рисунков и 7 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, показана степень ее разработанности, определена цель работы и задачи, решение которых необходимо для достижения поставленной цели, сформулирована научная новизна и практическая значимость исследования, описана методология и методы исследования, сформулированы выносимые на защиту положения, обоснована достоверность результатов проведенных исследований, указаны сведения об апробации работы, личном вкладе соискателя и публикациях, представлена структура диссертации.

В первой главе приведен аналитический обзор литературы в области применения биоматериалов, представлен краткий обзор способов получения многослойных систем биопокровов, определены требования, предъявляемые к материалам медицинского назначения, а также рассмотрены теоретические основы синтеза сферических наночастиц серебра разного размера с положительным или отрицательным зарядом.

Во второй главе описаны методики модификации медицинских имплантатов, путем формирования многофункциональных слоев различного состава.

В третьей главе приведены способы синтеза наночастиц, дано понятие коллоидной системы, рассмотрены химические и физические свойства наночастиц серебра.

В четвертой главе описаны методики экспериментальных исследований, дана характеристика исходных рабочих материалов и химикатов, представлен список примененного в работе экспериментального оборудования, описана технология формирования ГА покрытий методами ВЧМР, представлена схема синтеза наночастиц серебра в присутствии стабилизаторов двух видов, рассмотрены технологические процессы биологических и антибактериальных исследований в условиях *in vitro*.

В пятой главе представлено описание результатов исследования синтеза и характеристики наночастиц серебра разного размера и заряда методами анализа треков наночастиц (НТА), динамического рассеяния света (ДРС) и сканирующей электронной микроскопией (СЭМ). Представлены результаты функционализации ГА покрытий

наночастицами серебра методами осаждения из раствора, сидячей капли, электрофоретического осаждения из водной и спиртовой среды. Также описаны результаты исследования формирования и структурных особенностей ГА покрытий в зависимости от технологического режима ВЧМР. Представлено описание структурных и физико-механических свойств Ag-ГА композита.

В шестой главе представлены результаты исследования поведения Ag-ГА композита в модельной биологической жидкости, проанализированы экспериментальные результаты *in vitro* исследования антибактериальной и биологической активности Ag-ГА композита на примере штаммов кишечной палочки *E. coli* и подобных остеобластам клеток остеосаркомы человека (*MG-63*), соответственно.

Благодарности

Представленная диссертационная работа является финальным этапом тернистого пути, пройденного к получению степени кандидата технических наук. Но путь этот был не менее увлекательным, многогранным и поучительным. В ходе работы закалялся боевой дух, открывались новые горизонты, приобретался огромный и бесценный опыт, что в целом позволило создать хорошую и прочную базу для будущих моментов моей научной и личной жизни. Диссертационная работа – это «маленькая жизнь» где, как и в реальности, мы бок о бок связаны с большим количеством людей включая коллег, друзей и членов семьи, без помощи и поддержки которых решить поставленные задачи не представлялось бы возможным. По этой причине я хотела бы выразить им свою признательность и благодарность за то, что они прожили вместе со мной эту «маленькую жизнь» и сделали путь поистине незабываемым.

Выражаю признательность научному руководителю к.ф.-м.н. М.А. Сурменевоу за участие и помощь в подготовке диссертационной работы, д.т.н. Р.А. Сурменевоу за интерес к работе и консультации по вопросам написания диссертации. Коллегам к.ф.-м.н. И.Ю. Грубовой, к.ф.-м.н. А.А. Ивановой, к.т.н. С.Н. Шкариной, Е.А. Чудиновой за ценные замечания и комментарии к работе. А также немецким коллегам: профессору М. Эппле, доктору О. Примак, доктору Е. Лоза, за дружественный приём, помощь в организации экспериментов и участие в обсуждении полученных результатов, доктору С. Черноусова за помощь в проведении биологических и антибактериальных экспериментов.

Также выражаю признательность всем коллегам из исследовательской группы профессора Эппле (Университет Дуйсбург-Эссен, Германия) и Томского политехнического университета, с

которыми продолжает сотрудничество или сотрудничал ранее за помощь и поддержку в нужную минуту и отличную дружескую атмосферу в коллективе.

Выражаю сердечную благодарность моей семье, в особенности родителям за их огромную всестороннюю поддержку на протяжении всего диссертационного пути, за их безграничную любовь, понимание и душевное тепло, моим любимым деткам, которые наполняют жизнь смыслом и помогают идти дальше и мужу, который рука об руку прошел со мной этот путь.

1 Биоматериалы

В 1998 и 2000 годах оргкомитеты V и VI Всемирных конгрессов по биоматериалам и международная организация по стандартизации (ISO(ISO/TR 9966), ГОСТ Р 51148-98) сформулировали понятие биоматериала, которое заключается в том, что это нежизнеспособный материал или устройство медицинского назначения, предназначенный для выполнения или замещения определенных функций при взаимодействии с биологическими системами внутри живого организма, не вызывая при этом серьезных заболеваний или осложнений [24-26].

Имплантируемые материалы вносят решающий вклад в ход развития современной медицины. Многие виды лечения, которые мы сейчас воспринимаем как должное (замена суставов, кардиостимуляторы, сердечные клапаны, стенты, дентальные имплантаты), были бы невозможны без современных металлов, полимеров и керамики. Человеческое тело представляет собой очень сложную среду для инженеров-материаловедов из-за необходимости создания имплантатов, которые обладают высокой биологической совместимостью, коррозионной стойкостью и во многих случаях способны выдерживать миллионы рабочих циклов при высоких нагрузках [27, 28].

Целью использования биоматериалов является решение определенных проблем и задач, связанных с улучшением качества и продолжительности жизни человека. В современной клинической практике все чаще используются биоматериалы различной природы. Которые практически всегда являются сложными веществами, состоящими из органических и неорганических составляющих, то есть имеется внутренняя геометрическая связь между органической матрицей и неорганическим кристаллом, причем соотношение смешивания варьируется в широких границах [18].

Материалы, используемые для медицинского применения, в особенности для дентальных и ортопедических имплантатов, должны обладать высокими биосовместимыми свойствами, коррозионной стойкостью в окружающей биологической среде живого организма, а также высокими механическими свойствами, износостойкостью и нетоксичностью [29–32]. Титан и его сплавы наиболее подходящий материал для медицинского применения поскольку обладает высокой прочностью, низкой плотностью (высокой удельной прочностью), высокой устойчивостью к коррозии [33, 34]. Однако, в отличие от биоактивной керамики, биостекла, гидроксиапатита и стеклокерамики, титановые имплантаты не могут связываться непосредственно с костной тканью из-за низких остеointеграционных и остеиндуктивных свойств [35, 36]. Структурные и качественные характеристики поверхности имплантатов, её морфология, состав, гидрофильность и шероховатость являются ключевыми факторами взаимодействия имплантат с костной тканью и их остеointеграции [37-40]. С целью повышения прочности связи имплантат-костная ткань

выделяют физико-химическую и биохимическую обработку, которые являются двумя основными подкатегориями процесса модификации поверхности металлических биоматериалов [41].

Обработки, влияющие на морфологию, такие как пескоструйная обработка, электроэрозионная обработка, плазменная обработка или успокаивающее действие, составляют физико-химическую обработку; химическая категория состоит из кислотной или щелочной обработки и электрохимического осаждения. С другой стороны, биохимическая обработка включает в себя слияние биологических молекул для копирования биоинтерфейсов [42]. Тем не менее, многие из этих обработок взаимосвязаны, и контроль одной переменной без влияния на другие характеристики материалов практически невозможен. Методы физико-химической модификации поверхности включают сформированные на поверхности покрытия, механическую обработку, полировку пескоструйной обработкой, кислотное травление, щелочное травление, анодирование, осаждение из паровой фазы и многие другие. Но наибольший интерес представляют покрытия, сформированные на титане, содержащие биоактивный фосфат кальция, аналогичны биомиметическим имплантатам, используемым для костной ткани, что во много раз увеличивает биосовместимые свойства имплантатов [43].

1.1 Понятие биосовместимости

Биосовместимость – это реализация требуемой реакции живых тканей по отношению к нежизнеспособным материалам. Биосовместимым называется материал, обладающий способностью формировать соответствующий отклик хозяина в процессе его специфического использования. Биосовместимые материалы и устройства на их основе действуют гармонично и согласованно при нахождении в организме или в контакте с биологическими жидкостями и не вызывают заболеваний или отрицательные и болезненные реакции. Биосовместимые материалы и устройства не должны вызывать местной воспалительной реакции, оказывать токсического и аллергического действия на организм, обладать канцерогенным действием, провоцировать развитие инфекции, но при этом они должны сохранять функциональные свойства в течение предусмотренного срока эксплуатации. Следовательно, биосовместимость – это не полное отсутствие токсичности, а требование того, чтобы материал в процессе имплантации вел себя должным образом и выполнял поставленную задачу [19, 44, 45].

При постановке задач и выборе биоматериала для медицинского применения, необходимо учитывать состав и тип воздействия имплантируемого материала на ткани организма. Типы воздействия материалов на ткани организма можно распределить по трем основным группам [46]:

- Биоактивные материалы – способны встраиваться в структуру биологических систем организма человека. Задача этой группы материалов заключается в повышении эффективности лечения, образовании или замещении ткани, или органа человека, а также в выполнении определенных функций организма [47]. Текстурированные фосфаты кальция и ГА являются примером биоактивных материалов, особенность которых заключается в интеграции с костной тканью за счет механизмов остеокондукции и остеоиндукции.
- Биоинертные материалы – это материалы при введении которых в организм человека, практически не наблюдается развитие воспаления, аллергии и прочих негативных реакций. К таким материалам можно отнести золото, платина, оксиды титана и алюминия, диоксиды циркония или ниобия, данные материалы практически не вызывают образования фиброзной капсулы и выраженного развития контактного гистогенеза [18,19, 48].
- Биотолерантные материалы – адсорбируют белки на своей поверхности и не обладают остеокондуктивными свойствами, следовательно, физико-химическая связь между поверхностью имплантата и костным матриксом, обычно, не образуется, что приводит к формированию соединительно-тканной капсулы вокруг имплантата в связи, с чем биотолерантные материалы практически не применяются в имплантологии. К такому виду материалом можно отнести сплавы на основе кобальта, нержавеющей сталь, метакрилаты, виталиум, хром-кобальтовый сплав и полимеры со сверхвысоким молекулярным весом (полиэтилен, полипропилен и тефлон) [18, 49].

1.2 Требования, предъявляемые к материалам медицинского назначения

Как уже сообщалось ранее, медицинское материаловедение в настоящее время находится в состоянии активного развития исследований в области создания принципиально новых биоматериалов и изделий, для медицинского применения, а также техники и технологий для повышения качества жизни человека. Следует отметить основные свойства, которыми должны обладать биосовместимые материалы и изделия при взаимодействии с биологическими структурами живого организма: в первую очередь необходимо обеспечить сохранение высоких функциональных свойств на протяжении предполагаемого срока эксплуатации; а также отсутствие местных воспалительных, аллергических реакций или канцерогенных действий на живой организм.

К биоматериалам и изделиям, используемым в медицинской практике, предъявляются высокие требования относительно:

- биосовместимости изделия и живой среды, то есть отсутствие аллергических, токсических реакций, тромбозов, разрушения клеточных элементов крови и т.д. и наоборот должен обладать антибактериальными свойствами, если это необходимо;
- уровню физико-механических и химических характеристик материала и его поверхности, которые должны полностью соответствовать назначению медицинского изделия;
- стабильности свойств и их функциональности с течением времени, что определяется индивидуально для каждого конкретного случая использования;
- возможность стерилизации является немаловажной характеристикой для материалов медицинского назначения, поскольку форма и свойства изделия и его поверхности должны оставаться неизменными в процессе стерилизационной обработки.
- долговечность работы в человеческом организме, то есть стойкость к истиранию и разрушению в среде организма.

Основные требования к изделиям медицинского назначения и медицинской технике собраны в ГОСТ ISO 10993-1-2011 [24, 25, 46, 50-52].

1.3 Биосовместимые покрытия

Число биоматериалов и покрытий на их основе используемых для клинического применения очень велико, как и широка область их применения. Биопокрытия можно разделить на две основные группы: органические и неорганические [53]. Основываясь на природе взаимодействия биопокрытий с окружающими его биологическими жидкостями и тканями живого организма можно выделить защитные/барьерные (повышение коррозионных, гидрофобных свойств и т. д.) и функциональные покрытия (доставка лекарственных средств, повышение биоактивности и т.д.) [54]. В настоящее время уделяется большое внимание разработке многофункциональных покрытий, которые нацелены на одновременное решение нескольких поставленных задач. Подобные покрытия могут применяться при дентальной имплантации, челюстно-лицевой хирургии, травматологии и ортопедии с целью улучшения остеоиндуктивных и антибактериальных свойств. Зачастую производство многофункциональных покрытий не ограничивается рамками одной методикой, а используются различные подходы, в зависимости от поставленных задач.

По природе биосовместимые покрытия могут быть как синтетическими, так и натуральными. Синтетические полимерные покрытия чрезвычайно разнообразны, и они могут быть адаптированы для придания заранее заданных характеристик путем объединения более одного мономера или полимера, включая биологические агенты, которые влияют на окружающие ткани [55-57]. Параметры покрытия, такие как биосовместимость,

биоразлагаемость или механическая стабильность, зависят от составляющих мономеров или полимеров. Примерами разлагаемых полимеров являются поли гликозилированная молочная кислота (D, L-lactic-co-glycolic acid (PLGA)), поликапролактон (poly caprolactone (PCL)), полигидроксиалканоаты (polyhydroxyalkanoates (PHAs)) и полифосфазены (polyphosphazenes) [54]. Гидрофильные биостабильные полимеры включают: поливиниловый спирт (poly(vinyl alcohol) (PVA)), полиметакриловая кислота (polymethacrylic acid (PMA)) или полиэтиленгликоль (polyethylene glycol (PEG)) часто используются в качестве покрытий для металлических имплантатов, предлагая мягкий интерфейс, который в некоторых случаях ингибирует бактериальную адгезию к материалам на основе титана [55]. Кроме того, синтетические полимеры могут быть разработаны и модифицированы с помощью широкого спектра методик [53]. Натуральные покрытия представляют собой подмножество биологически активных материалов, которые можно сгруппировать в три категории: полисахариды, белки внеклеточного матрикса и пептиды [55-57]. Кроме того, натуральные органические покрытия показали особые преимущества в инженерии костной ткани благодаря активации специфических биологических сигнальных путей, индукции клеточной адгезии и модификация ремоделирования костной ткани [58]. С точки зрения производства, состав природных систем намного сложнее, чем синтетических систем. Они представляют сложные структуры *in vivo*. Следовательно, очень сложно воспроизвести их синтез в однородной форме [55-57].

Неорганические биопокрытия представлены следующим набором основных материалов: углерод, фосфаты кальция, кремний, магний и другие. Биоактивные стекла представляют собой смеси оксидов, главным образом SiO_2 , CaO и P_2O_5 , и также были предложены в качестве материалов для покрытий [59]. Так, в стоматологии с целью восстановления зубных единиц в большей мере используют титановые имплантаты покрытие фосфатами кальция, что позволяет повысить механическую стабильность имплантата за счет врастания костной ткани в структуру дентального имплантата [18]. Также существует проблема, связанная с возникновением механических напряжений, износом материала, его коррозией и процессами химической деградации, возникающие вследствие воздействия на имплантат биологических жидкостей и тканей организма, следовательно, возможно изменение его свойств, а также возникновение реакции отторжения имплантата [24].

Считается, что идеальное ГА покрытие для дентального или ортопедического имплантата обладает малой, но достаточной для соединения с костной тканью, пористостью, высоким значением адгезионной прочности к подложке, высокой степенью кристалличности, химической и фазовой стабильностью. Нормативные документы, регламентирующие требования, предъявляемые к медицинским изделиям, а также описывающие процедуры проведения токсикологических и иных видов испытаний приведены в [24, 25. 50]. Основными

характеристиками ГА покрытия являются фазовый и химический состав, отношение кальция к фосфору (Ca/P), степень кристалличности, микроструктура, толщина, скорость резорбции, морфология поверхности имплантата, в том числе пористость или шероховатость поверхности, определяющие механические свойства, такие как модуль Юнга, предел прочности на разрыв, остаточное напряжение, долговечность и прочие. Комбинирование представленных характеристик способно приводить к различной степени биоактивности и сроку службы покрытия.

1.4 Антибактериальные свойства покрытий

Формирование антибактериальных свойств покрытий для костных имплантатов является одной из важных задач современного медицинского материаловедения, поиском оптимального решения данной задачи занимаются многие группы ученых по всему миру. На сегодняшний день выделяют несколько направлений, такие как формирование на поверхности костного имплантата функционального покрытия содержащие в своем составе антибиотики или частицы металлов (серебро, оксиды: цинка, железа, тантала, ванадия, кобальта, диоксиды: тантала, молибдена и др.), или их комбинацию. Подобные покрытия способны оказывать местное пролонгированное антибактериальное действие [60].

Покрытие, обладающее антибактериальными свойствами, должно обеспечивать выраженное бактерицидное воздействие в отношении большинства клинически значимых микроорганизмов, в том числе исключить возможность образования на поверхности имплантата бактериальной биопленки, минимизировать возможность негативного влияния на окружающие ткани в месте имплантации, а также системного действия на организм, связанного с выходом антибактериального агента в окружающую среду.

2 Модифицирование поверхности медицинских имплантатов посредством формирования поверхностных слоев

Как известно, улучшение свойств и/или функционализация поверхности имплантата – сложная и ответственная задача. Важна совокупность многих факторов, назначение, специфические свойства, прочностные характеристики, антибактериальные и/или биоактивные свойства. Поэтому выбор технологии модификации поверхности имплантата является важным аспектом планирования эксперимента.

2.1 Нанесение биосовместимых покрытий

Широко используемые методы нанесения покрытия разделены на две основные группы: физические и химические. К физическим методам можно отнести: высокочастотное магнетронное распыление [20, 21], ионная имплантация [61, 62], электроплазменное напыление [63, 64], лазерная абляция (импульсно-лазерное осаждение) [65, 66] и др. Химическими и биохимическими методами являются: микродуговое оксидирование [67-69], электрофоретическое осаждение [70, 71], золь-гель метод [72, 73], биомиметический метод [74, 75] и др.

2.2 Стратегии формирования многофункциональных слоев

Однокомпонентные биоматериалы не способны полностью обеспечить все необходимые функции медицинского изделия с его определенным назначением. Таким образом существует большая потребность в многокомпонентных биоматериалах со структурой, свойствами и составом, имитирующими природную ткань, подобные материалы получают сочетанием химически и биологически разнообразных компонентов, а зачастую и гибридных методик их производства. Для объединения положительных свойств многослойной системы или надления данной системы необходимыми свойствами, требуется интеграция их составляющих в одном медицинском изделии [51, 52, 76, 77].

В области дентальной имплантологии многослойные системы зачастую позволяют решить проблему биосовместимости и в то же время снизить риск постоперационных воспалительных осложнений путем достижения местного средне-длительного антибактериального эффекта [78].

Гибридные или многофункциональные системы могут быть сформированы в рамках одного метода, но с изменением определенных параметров либо с использованием комбинированных методик.

К примеру, в работе Barbara Szaraniec [79] предложена методика модифицирования поверхности титановых имплантатов путем нанесения многофункциональных полимерных покрытий на основе полиуретана и его композитов с графеном и трикальцийфосфатом в β -форме (β -ТСР). Графен использовали в качестве антибактериального агента, трикальцийфосфат в качестве биологически активного компонента и полимерное покрытие в качестве защиты металла от коррозии. В результате были получены материалы с различной поверхностной характеристикой, от гидрофильной до гидрофобной, с различной степенью биологической активности и биосовместимости.

В работе [51] описан метод формирования гибридных биологически совместимых покрытий на металлических имплантатах для хирургического применения. Гибридные покрытия состоят из оксидного подслоя, созданного газотермическим оксидированием металла в среде кислорода (давление 2800 – 3300 Па, температура 600°C, время 30 минут) и последующего кальций-фосфатного слоя толщиной 1,6 мкм (нанесенного методом ВЧМР мишени из ГА на частоте 13,56 МГц в смеси газов аргона и кислорода с их соотношением 1:1 при давлении 0,3 Па, удельной мощности 20 Вт/см²). Покрытия удовлетворяют разработанным медико-техническим требованиям.

В свою очередь, авторы работы [77] описывают использование гибридной методики создания кальций-фосфатного покрытия. Промежуточное титановое покрытие формировалось из плазмы непрерывного вакуумно-дугового разряда в условиях короткоимпульсного высокочастотного плазменно-иммерсионного ионного ассистирования. В качестве катода использовался титан марки ВТ1-0. Его осаждение происходило при давлении – 10⁻³ Па. Ток разряда вакуумно-дуговых испарителей – 200 А. На первом этапе осаждения титанового покрытия формировался переходный адгезионный слой между материалом основы и титановым покрытием при динамическом изменении амплитуды короткоимпульсного высокочастотного потенциала смещения от -2,5 до -0,5 кВ в течение 5 мин. Далее на образцы подавалось постоянное отрицательное напряжение смещения 90 В, что обеспечивало формирование ионного потока на образцы с плотностью до 30 мА/см². При этом режиме основное титановое покрытие осаждалось со скоростью 0,33 мкм/мин при температуре 350-400 °С. Для создания биоактивного кальций-фосфатного покрытия использовался электрохимический метод микродугового оксидирования при импульсном или постоянном токе в растворе фосфорной кислоты концентрацией 5-33 % с добавлением соединений кальция сверх пересыщенного состояния. В ходе данной процедуры происходит окисление нанесенного промежуточного слоя титана

кислородом, образованным при электролизе, и взаимодействии сформированного оксидного слоя с элементами электролита в плазме микродугового разряда. В результате на материале имплантата образуется кальций-фосфатный композит.

В исследовании [80] описывается технология формирования биокompозитов на основе пористых структур оксида титана и покрытия на основе ГА. Вертикально выровненные нанотрубки с различными размерами пор получали с использованием анодного окисления подложек титана в растворе электролита с содержанием NH_4F при напряжениях анодирования 30 / 60 В и источником питания постоянного тока. ВЧМР мишени использованы для осаждения ГА покрытия на поверхности нанотрубок TiO_2 в течение 2 часов при мощности тока 300 Вт. Использование гибридных биокompозитов на основе TiO_2 нанотрубок и ГА покрытия является перспективным для использования в инженерии костной ткани. Свойства полученных биокompозитов могут контролироваться путем изменения параметров анодирования и распыления покрытия.

В исследованиях [81-84] показана перспектива использования метода ВЧМР и формирования кальций-фосфатного покрытия функционализированного кремнием, с целью улучшения osteoconductive свойств покрытия. Покрытия формировались при следующих условиях: мощность 200-250 Вт, рабочее давление 0,1 Па, рабочий газ аргон, время осаждения варьировалось от 1 до 3 часов, в качестве подложек использовались образцы титана марки VT1-0 с размерами 10×10 мм и толщиной 1 мм. Предварительно образцы титана подвергались кислотному травлению для придания им развитой шероховатой поверхности. Травление проводили в течение 5-10 с в кислотной смеси, в объемном соотношении 1: 4: 5: HF (48 мас.%): HNO_3 (65 мас.%): H_2O , с последующей очисткой в ультразвуковой ванне в среде ацетона, а затем этанола. Введение ионов кремния в структуру мишени на основе гидроксиапатита, значительно усиливает *in vivo* влияние кальций-фосфатных покрытий на остеогенную активность стромальных стволовых клеток костного мозга, что в очередной раз доказывает перспективность технологии ВЧМР для биомедицинской отрасли.

2.3 Способы формирования кальций-фосфатных покрытий

Преимущества и недостатки методов нанесения кальций-фосфатных покрытий, а также краткое описание технологии формирования покрытий приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Способы формирования кальций-фосфатных покрытий

Метод	Принцип работы	Преимущества / Недостатки	Литературные источники
Микродуговое оксидирование	<p>В среде электролита, на основе воды и ортофосфорных кислот карбоната кальция, а также гидроксиапатита, протекает формирование покрытия в ходе подачи электрических импульсов особой формы.</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет 15-50 мкм.</p>	<p>Широкий диапазон управления параметрами плазменных разрядов, хорошие прочностные и адгезионные свойства / покрытие многофазное, низкое соотношение Са/Р.</p>	67-69
Плазменное напыление	<p>Поток газа проходящий через электрическую дугу, возникающую между двумя электродами, становится высокотемпературной ионизированной плазмой с высокой скоростью движения. Взвешенные в газе порошки керамики попадают в плазму и направляются на поверхность образца в расплавленном или частично расплавленном, пластичном состоянии и как следствие формируется покрытие сходное с исходным составом порошка.</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет 20-300 мкм.</p>	<p>Высокая скорость нанесения, большая площадь нанесения покрытия / высокая температура и термодинамическая нестабильность керамики, низкие адгезионные свойства.</p>	75,76

Продолжение таблицы 2.1 – Способы формирования кальций-фосфатных покрытий

Метод	Принцип работы	Преимущества / Недостатки	Литературные источники
Осаждение ионным пучком	<p>В вакуумной камере происходит бомбардировка мишени рабочим газом, ускоренным ионной пушкой, из неё выбиваются частицы, которые осаждаются на подложке и формируют покрытие.</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет 1-5 мкм.</p>	<p>Хорошие адгезионные свойства, покрытия однородные, возможность регулировки соотношения Ca/P в покрытии / аморфное покрытие.</p>	65,66
Золь-гель	<p>Технология формирования покрытия включает следующие технологические этапы: приготовление пленкообразующего раствора; выдержку раствора до образования золя; нанесение пленкообразующего раствора на подготовленную поверхность образца; термообработку, для снятия внутренних напряжений в покрытии.</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет <1 мкм.</p>	<p>Достаточные адгезионные свойства, возможность точного контроля химического и структурного состава покрытий, высокая плотность покрытия / сложный контроль атмосферных условий, низкий показатель износостойкости, сложность контроля пористости.</p>	72, 73, 85, 86
Электрофоретическое осаждение	<p>Процесс ЭФО использует электрические поля для осаждения заряженных наночастиц из раствора на подложку.</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет 0,1 – 2 мкм.</p>	<p>Однородное покрытие, высокая скорость формирования покрытия, нанесение покрытий на образцы сложной геометрии / низкая адгезия между покрытием и подложкой.</p>	70, 71, 86

Продолжение таблицы 2.1 – Способы формирования кальций-фосфатных покрытий

Метод	Принцип работы	Преимущества / Недостатки	Литературные источники
Электрохимическое осаждение	<p>Технология электрохимического осаждения использует двухэлектродную электрохимическую ячейку, где катод представляет собой материал подложки, на которую наносится покрытие, а анод представляет собой инертный металл (платина и др.). В водном электролите на поверхности катода происходят следующие реакции (восстановление воды, разряд протонов, восстановление растворенного кислорода).</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет 20 – 80 мкм.</p>	<p>Высокая скорость осаждения покрытия, нанесение покрытий на образцы сложной геометрии / низкая адгезия, сложность контроля соотношения химических параметров электролита.</p>	86, 87
Биомиметическое осаждение	<p>На поверхности образца, погруженного в модельную биологическую жидкость при температуре 37°C в течение нескольких дней, образуется биологически активный слой костеподобного апатита.</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет 0,5 – 30 мкм.</p>	<p>Высокие биоактивные свойства, нанесение покрытий на образцы сложной геометрии, низкий температурный режим формирования покрытия / низкие адгезионные свойства и скорость формирования покрытия, высокая трудоёмкость процесса осаждения.</p>	74, 75

Продолжение таблицы 2.1 – Способы формирования кальций-фосфатных покрытий

Метод	Принцип работы	Преимущества / Недостатки	Литературные источники
Импульсное лазерное осаждение	<p>Импульсный лазерный луч фокусируется на вращающейся мишени в вакуумной камере в атмосфере водяного пара, испаряющийся материал осаждается на параллельную подложку.</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет 0,5 – 5 мкм.</p>	<p>Контроль фазы осаждаемого покрытия, покрытие плотное с хорошими адгезионными свойствами / возможно присутствие агломератов на поверхности покрытия, затруднительно нанесение покрытия на образцы со сложной геометрией.</p>	65, 66, 86
Высокочастотное магнетронное напыление	<p>В основе метода заложено использование комбинации магнитных и электрических полей. Распыление материала происходит за счет процесса бомбардировки поверхности мишени ионами рабочего газа, образующимися в плазме аномального тлеющего разряда в процессе наложения на него магнитного поля.</p> <p>Толщина формируемого покрытия составляет 0,05 – 3,5 мкм.</p>	<p>Высокие адгезионные свойства, использование подложек различной природы, формирование равномерного, плотного и однородного по толщине покрытия, контроль структуры и отношения Ca/P, нанесение покрытий на образцы сложной геометрии / низкая скорость формирования покрытия, высокая.</p>	20, 21

2.3.1 Параметры покрытия, оказывающие влияние на биосовместимость

Как правило, после процедуры имплантации в человеческое тело поверхность имплантата незамедлительно начинает контактировать с костной тканью и физиологической

жидкостью, которая содержит многочисленные ионы и белки, которые определяют адгезию определенных типов клеток к поверхности. Существует множество биологических жидкостей, которые могут моделировать реальные биологические условия в организме, что позволяет в условиях *in vitro* анализировать поведение взаимодействия поверхности имплантата с окружающей средой. Этими растворами являются SBF [88, 89], раствор Хэнкса [90, 91], раствор фетальной бычьей сыворотки [92], буферная жидкость [93], физиологический раствор [94, 95], физиологический раствор с фосфатным буфером [96] и раствор для быстрой кальцификации [97, 86].

Вопрос биологической совместимости очень тонкий и требует особого внимания, таким образом из литературных данных известно, что химический состав поверхности имплантата имеет высокое влияние на его биосовместимость. Следовательно, чем более идентичный состав поверхности имплантата с минеральной составляющей костной ткани, тем выше его биосовместимые и остеоиндуктивные свойства. В минеральной составляющей костной ткани стехиометрическое соотношение $Ca/P = 1,67$.

Другую и немаловажную роль играет топография (шероховатость, морфология, пористость и т.д.) поверхности имплантата, поскольку клеткам необходимо иметь возможность прикрепляться, расплываться для дальнейшей пролиферация и дифференциация.

Обработка и модификация поверхности имплантата главным образом нацелена на улучшение ее биомеханических и физико-химических свойств, которые вносят основной вклад в процесс адгезии молекул внеклеточного и прекостного матрикса, а также различных биоактивных компонент жидкостной среды и клеточных молекул [98-102].

3 Способы создания наноструктурированных слоев серебра

Уменьшение размера макрообъекта до нано диапазона позволяет открыть новые пути и возможности к улучшению свойств материала в процессе последующей обработки, а также возможно проявление веществом в новом нанокристаллическом состоянии особых, специфических свойств (например магнитных, оптических и др.), которые нехарактерны для объемных материалов.

Спектр методов получения наночастиц серебра постоянно расширяется. Принципиально, методики получения наночастиц серебра можно сгруппировать по принципу воздействия, как диспергационные и конденсационные. К первой группе относятся методы «сверху-вниз» которые заключаются в измельчении/разрушении макрообразца под действием сверхнизких температур, вакуумного испарения и электроконденсации, лазерного или плазмохимического воздействия, механохимического дробления и др. [103, 104]. Вторая группа включает методики «снизу-вверх» основанные на сборке наноструктуры из отдельных атомов, такие как химическое, фотохимическое, радиационное или биологическое восстановление.

В свою очередь для нанесения серебряных покрытий на поверхность имплантата подойдет множество методик, направленных на формирование металлических покрытий, например, физическое осаждение из паровой фазы, магнетронное распыление, ионная имплантация, электрофоретическое осаждение, золь-гель методики и многие другие [105, 106].

Помимо размерных характеристик, для достижение хорошего антибактериального эффекта важную роль играет и форма наночастиц серебра, так в работах [107-110] показано, что наибольшей антибактериальной активностью обладают сферические, кубические и треугольные наночастицы, активность стержневых или веретеновидных и эллиптических наночастиц значительно ниже.

3.1 Коллоидные системы

Коллоидные системы (КС) включают в состав различные высокодисперсные системы с частицами, величина которых лежит в пределах 100-1 нм. Так же для КС характерно интенсивное броуновское движение частиц дисперсной фазы.

Состояние вещества, при котором оно находится в раздробленном виде, а его отдельные частицы являются агрегатами, состоящими из множества молекул, называется коллоидным состоянием вещества [111]. Основываясь на природу взаимодействия дисперсной фазы и дисперсионной среды, КС можно разбить на две группы: лиофобные и лиофильные, то есть со слабым и сильным взаимодействием, соответственно. К лиофобным КС можно отнести КР или

золи, они устойчивы исключительно в присутствии стабилизаторов и получаются только с затратами энергии. К лиофильным КС относятся растворы высокомолекулярных соединений, данные системы устойчивы без применения стабилизаторов и способны образовываться самопроизвольно [112].

Теория устойчивости и коагуляции КС строится на принципах статистической физики, теории действия молекулярных сил и теории растворов. Теория устойчивости определяется соотношением сил электростатического отталкивания и сил притяжения, которые обусловлены межмолекулярными Ван-Дер-Ваальсовыми силами [113].

На рисунке 3.1 показаны потенциальные кривые, возникающие в результате взаимодействия между частицами. На графике показан ход потенциала в зависимости от расстояния частиц. Показано взаимодействие сил притяжения (притяжение Ван-дер-Ваальса), отталкивающие взаимодействие (электростатические силы отталкивания) и результирующее взаимодействие (полный потенциал взаимодействия). Если имеется выраженный первичный максимум (энергетический барьер), суспензия устойчива против коагуляции [114].

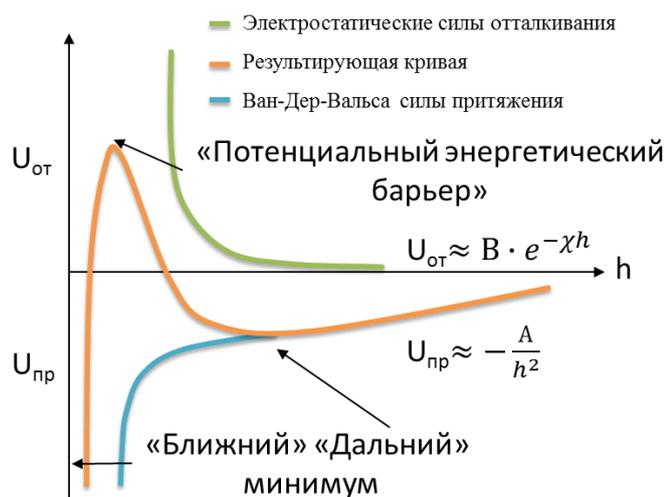


Рисунок 3.1 – Потенциальные кривые взаимодействия между двумя коллоидными частицами в зависимости от расстояния

Вторичный минимум в потенциальном курсе обычно приводит к частичной агрегации частиц в суспензиях, но флокуляция обычно обратима. Причиной вторичного минимума является больший диапазон Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий по сравнению с электростатическими взаимодействиями. Если вторичного минимума нет, суспензия может полностью коагулировать, если потенциал остается отрицательным. Ионная сила и поверхностный заряд также влияют на коагуляцию, которая может изменить высоту энергетического барьера [115]. Высокий поверхностный заряд и низкая ионная сила приводят к высокой стабильности

дисперсии. Увеличение вторичного минимума может быть вызвано средней ионной силой, но это не приводит к полной коагуляции. Полная коагуляция может быть достигнута только с высокой ионной силой и низким уровнем поверхностного заряда.

Устойчивость дисперсии также зависит от внешних воздействий, поэтому она не может быть бесконечно устойчива. В процессе старения КС дисперсия направлена на разделение системы на ее твердые и жидкие компоненты при достижении термодинамически наиболее стабильного состояния. Скорость, с которой стареет система, зависит от различных факторов, таких как растворимость и размер коллоидных частиц, межфазное натяжение, коэффициенты диффузии и температура. Растворимость для меньших частиц выше, чем для более крупных. Растворенные ионы или молекулы присоединяются к более крупным частицам и позволяют им расти. Скорость старения КС описывается следующим уравнением [116]:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{qDc_0}{\delta} \exp\left[\frac{\sigma_{sl}}{f(r_1)RT}\right] - \exp\left[\frac{\sigma_{sl}}{f(r_2)RT}\right], \quad (3.1)$$

где:

D – коэффициент диффузии;

c_0 – растворимость макроскопической фазы;

σ_{sl} – межфазное натяжение;

δ – вязкость среды;

r_1, r_2 – радиусы коллоидных частиц;

T – абсолютная температура;

R – Универсальная газовая постоянная.

Из уравнения 3.1 следует, что строго монодисперсные системы не должны стареть, поскольку в монодисперсных системах все частицы в дисперсии имеют одинаковый размер. Как показывает практика нет строго монодисперсной системы, поскольку каждая система стареет. Однако, чем более монодисперсная система, тем медленнее протекает процесс старения.

Процесс старения можно ускорить, подняв температуру, которая увеличивает растворимость и коэффициент диффузии. Старение КС является естественным процессом, который приводит к распаду дисперсии. Конец достигается, когда происходит полное разделение фаз [117].

3.2 Наночастицы серебра

Интерес к наночастицам и материалам состоящих на их основе связан с их особенными физико-химическими характеристиками, оптическими, электромагнитными и каталитическими свойствами. НЧ обладают следующими химическими и физическими свойствами [118]:

- высокая химическая реактивность из-за большой удельной поверхности (отношение поверхности частицы к объему частиц),
- возрастающее значение поверхностного заряда (теория устойчивости и коагуляции КС),
- низкое влияние массовых сил (силы тяжести),
- увеличение влияния поверхностных сил (например, сила Ван-дер-Ваальса),
- термодинамические эффекты (броуновское движение).

НЧ, как правило, классифицируются в зависимости от их размерности, морфологии, однородности и дисперсности. Как известно, далеко не все НЧ являются токсичными; токсичность зависит от химического состава, формы, размера и скорости старения НЧ. На самом деле, многие виды НЧ являются нетоксичными [119, 120], в то время как другие, оказывают благотворное влияние на здоровье [121-123]. Чтобы получить точную информацию о поведении НЧ необходимо изучить токсикологию, морфологию материала, а также процесс старения НЧ.

Как показывают результаты исследований, треугольные/усеченные треугольные серебряные нанопризмы/нанопластинки или нанокубики обладают более сильным антибактериальным свойством, чем сферические или стержневые, при той же концентрации серебра и даже при разных размерах. В работах [109, 110], авторы пришли к выводу, что нанокристаллы с базисной плоскостью $\{111\}$ обладают наибольшей активностью против бактерий из-за граней $\{111\}$ с высокой атомной плотностью. Таким образом, ожидается высокая реакционная способность треугольных нанопластинок по сравнению со стержневидными наночастицами. Предполагается, что нано размер и наличие плоскости $\{111\}$ вместе способствуют этому биоцидному свойству.

Методы, используемые для синтеза НЧ серебра, можно распределить на две группы: физические и химические.

Физические методики синтеза основываются на диспергировании макроскопического металла и его стабилизации. В данной группе методов «сверху-вниз» наиболее часто относят: электроконденсационный метод [124], метод лазерной абляции [125, 126] и метод криохимического синтез [127].

Химические методики в большинстве случаев направлены на восстановление ионов металла в растворе. Данная группа методов имеет больше возможностей для контроля процесса синтеза НЧ, что достигается большим выбором восстановителей, стабилизаторов, а также

варьированием условий эксперимента. Одним из перспективных методов синтеза НЧ является способ полимеризации. В этом способе мономеры полимеризуются с образованием НЧ в водном растворе. Суспензию НЧ очищают, чтобы удалить различные стабилизаторы и поверхностно-активные вещества, используя процесс ультрацентрифугирования [128].

AgНЧ широко используются в качестве антибактериальных агентов в индустрии здоровья, хранения продуктов питания, текстильных покрытий и ряда экологических приложений. Важно отметить, что, несмотря на широкое и многолетнее использование наночастиц серебра в медицинской практике, вопрос токсичности серебра до сих пор остается актуальным [129]. AgНЧ находятся в диапазоне от 1 до 100 нм. Они обладают уникальными антимикробными свойствами, которые помогают в молекулярной диагностике, а также в устройствах медицинского назначения [130]. Как антибактериальный агент, AgНЧ используются в широком спектре приложений как в области дезинфекции медицинских приборов и бытовой техники, так и в области очистки воды [131].

4. Материалы и методы

В диссертационной работе представлено использование комбинации методов и параметров ВЧМР и ЭФО, которые позволяют формировать гибридные покрытия на основе слоёв ГА и наночастиц серебра на поверхности титановых образцов. Данный подход является перспективным в создании биоконпозитов, ресурсоэффективным и малозатратным. Схематическое представление строения Ag-ГА композита иллюстрирует рисунок 4.1.

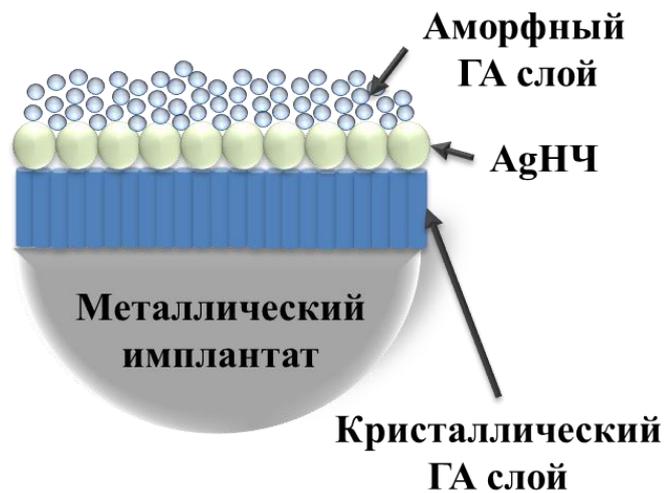


Рисунок 4.1 – Схематическое представление строения Ag-ГА композита

В настоящее время существует большое количество методов исследования тонкопленочных структур. Используемые в диссертационной работе методики позволяют определять различные свойства материала. С целью изучения морфологии, структурных особенностей, элементного и фазового состава, молекулярных связей ГА покрытия использовались методы СЭМ, РФА, ЭДРА и ИК-спектроскопии, а также для определения толщины и оптических констант прозрачных (полупрозрачных) покрытий использовали бесконтактный метод спектральной эллипсометрии. Механическую прочность созданных композитов оценивали по средствам склерометрии (скретч-тест). Для исследования физических параметров наночастиц серебра используются методы ДРС и АТН. Данные методы позволяют оценить размер наночастиц, установить их заряд, а также установить степень дисперсности системы. В условиях *in vitro*, по средствам методики исследования биосовместимости, антибактериальной активности и биodeградации, представлено медико-биологическое обоснование перспективы использования Ag-ГА композита, с использованием флуоресцентного анализа, измерения оптической плотности, атомно-абсорбционной микроскопии.

4.1 Материалы и химикаты

Технически чистый титан ВТ1-0 (99.58 мас% титана, 0,1 мас% кислорода, 0,15 мас% железа; 0,05 мас% углерода; 0.04 мас% азота; 0.08 мас% кремния);
кремния (111) монокристаллы, класс шероховатости №12;
бромид калия (KBr)
мишень гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) приготовлена по технологии механохимического синтеза в Институте химии твердого тела и механохимии СО РАН, г. Новосибирск;
поливинилпирролидон (ПВП) (Polyvinylpyrrolidone (PVP) K30, Povidon 30; Fluka, молекулярный вес 40 000 г моль⁻¹);
полиэтиленимин (ПЭИ) (Polyethylenimine (PEI); разветвленный, Sigma-Aldrich, молекулярный вес 25 000 г моль⁻¹);
нитрат серебра (AgNO_3 , Roth, p.a.);
глюкоза (D-(+), Fluka, p.a.);
бактерии кишечной палочки (*Escherichia coli*);
подобные остеобластам клетки остеосаркомы человека (MG-63).

4.2 Лабораторное оборудование

Коммерческая установка высокочастотного магнетронного распыления с генератором высокочастотного разряда (13.56 MHz, COMDEL);
сканирующий электронный микроскоп с энергодисперсионной приставкой (FEI Quanta 400 FEG, Genesis 4000, S-UTW-Si(Li) детектор, вакуум 10⁻⁵ Па);
дифрактометр (Panalytical), дифракция рентгеновских лучей в скользящем пучке (GI-XRD), дифрактометр Siemens Diffraktometer D500;
ИК-спектрометр (Thermo Nicolet 5700);
спектральный эллипсометрический комплекс (Ellipse 1891 SAG);
полировочная установка (Jeol IB-09010CP);
прибор для измерения адгезионной прочности покрытий (Micro-Scratch Tester MST-S-AX-0000);
атомно-абсорбционный микроскоп (Thermo Electron Corporation, M-Series, Perkin-Elmer 4110ZL);
система водоочистки (ELGA Purelab)

анализирующая система Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 для исследования заряда и размера наночастиц;

анализирующий комплекс треков наночастиц (NanoSight LN10);

ультрацентрифуга Sorvall WX Ultra Series;

прибор для измерения плотности клеток (CO8000, WPA, Cambridge, UK);

флуоресцентный микроскоп (Zeiss Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Goettingen, Germany);

спектрофотометр (Multiscan FC, Thermo Fisher Scientific, Vanta, Finland).

4.3 Приготовление кальций-фосфатной мишени

В первую очередь, с целью формирования ГА покрытия ВЧ-магнетронным методом, на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химии твердого тела и механохимии СО РАН (г. Новосибирск) была сформирована мишень диаметром 22 см и толщиной 0,7 см. Синтетический порошок стехиометрического ГА, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, был использован в качестве предшественника для подготовки мишени. Чтобы сформировать мишень, порошок прессуют, в разборной пресс-форме, при давлении 70 МПа по средствам холодного одноосного прессования и спустя сутки спекают в атмосфере воздуха при 1100 °С в течение 1 ч. Первоначальная структура и стехиометрия ГА остаются неизменными в процессе формирования мишени, в том числе отношение $N(\text{Ca})/N(\text{P})$ принимает значение $1,67 \pm 0,02$ [132, 133]. Чистый ГА был синтезирован в планетарной мельнице. Механохимический синтез проводили с использованием герметичных барабанов, которые обеспечили постоянство отношения компонентов в конечном продукте, что и в начальной реакционной смеси. Механохимический синтез отличается от других традиционных методов возможностью получения однофазных продуктов с заданным составом в течение короткого промежутка времени при отсутствии сточных вод и выбросов в атмосферу.

4.4 Формирование кальций-фосфатного покрытия

Кальций-фосфатные покрытия были получены с использованием технологии ВЧМР. Для напыления покрытий использовалась коммерческая установка с высокочастотным магнетронным источником (13,56 МГц, COMDEL) на базе Национального исследовательского Томского политехнического университета. В качестве подложек использовался технически чистый титан марки ВТ1-0 (10×10 мм), пластины монокристаллического кремния (10×10 мм) с ориентацией (111) и пластины бромиды калия (KBr) (5×5 мм). Пластины титана подвергали

химическому травлению в кислотном растворе по 5–10 с, содержащем HF (48 %) и HNO₃ (66 %), растворенные в дистиллированной воде с соотношением 1:4:5 по объему с целью создания развитого рельефа. После кислотного травления образцы подвергали ультразвуковой очистке последовательно в этаноле и дистиллированной воде в течение 10 минут при комнатной температуре. Режимы напыления ГА покрытий представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. – Режимы напыления ГА покрытий

Параметр	Режим №1	Режим №2
Рабочий газ	Ar	Ar
Рабочее давление, Па	0,4	0,4
Рабочая мощность, Вт	500	500
Расстояние от подложки до мишени, мм	43	43
Механизм перемещения подложки	качение-вращение	без перемещения
Время напыления, мин	180-480	480

Принципиальная схема установки представлена на рисунке 4.2. Рабочая установка включает следующие объекты: ВЧ-магнетрон, система проточного водяного охлаждения, вакуумная камера, система нагнетания газа, система перемещения подложки. Вакуумная камера представляет собой горизонтально расположенный цилиндрический сосуд доступ внутрь которого осуществляется сверху через крышку. Так же к камере присоединена вакуумная система, позволяющая создавать и поддерживать в рабочей камере требуемое рабочее давление. В ходе процесса распыления мишени подача газа происходит автоматически так, чтобы давление в рабочей камере оставалось постоянным. В качестве датчика давления используется вакуумметр по типу лампы ПМИ-10 (преобразователь манометрический ионизационный). Вакуумная система состоит из группы турбомолекулярных и форвакуумного насосов. Охлаждение рабочей камеры в ходе процесса напыления ГА покрытия достигается за счет охлаждающей системы, основанной на проточной циркуляции воды, расположенной в крышке вакуумной камеры. ВЧ-магнетрон состоящий из анода и катодного узла, установленных на едином коаксиальном вводе, располагается снизу. Зона эрозии мишени была измерена по конструкционным чертежам ВЧ-магнетрона, её размер составляет 40 мм. Зона эрозии представляет собой область эффективного распыления катода при активной бомбардировке мишени ионами рабочего газа [134].

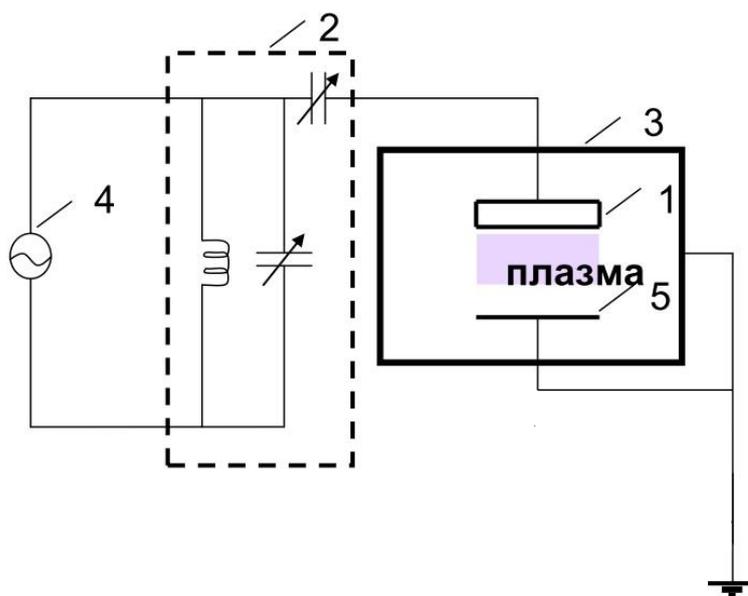


Рисунок 4.2 – Принципиальная блок-схема установки ВЧ-магнетронного распыления. 1 – ВЧ-магнетрон; 2 – устройство согласования; 3 – вакуумная камера; 4 – генератор ВЧ-разряда (13,56 МГц, COMDEL); 5 – заземленная подложка

Представленная на рисунке 4.3 схема поясняет геометрию расположения экспериментальных образцов в ходе процесса напыления ГА покрытия «в зоне эрозии» (Зона Б) а также «вне зоны эрозии» мишени (Зона А).

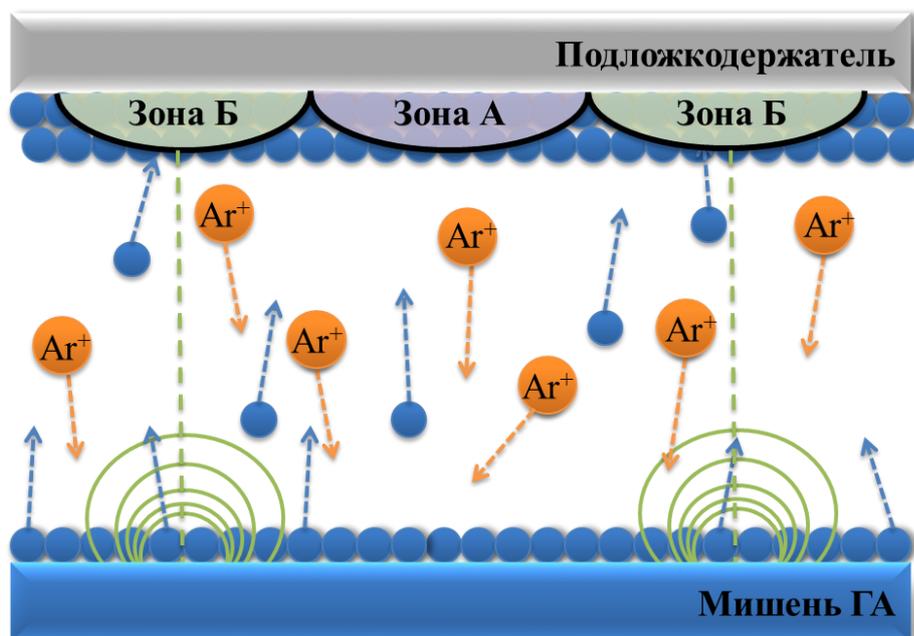


Рисунок 4.3 – Схема расположения образцов в процессе осаждения ГА покрытий. Зона А – «вне зоны эрозии» мишени, Зона Б – «в зоне эрозии» мишени

Для формирования покрытий использовались две модели: статическая и динамическая. В случае использования динамической модели подложкодержатель в виде плоского диска совершал двойное пространственное перемещение, заключающееся во вращении диска вокруг своей оси с периодом $T_1 = 86$ с и одновременно движение по дуге, относительно центральной оси магнетрона с периодом качания $T_0 = 600$ с [135, 136]. Это позволяет формировать качественные и равномерные свойства функциональных ГА покрытий. Геометрия пространственного движения подложкодержателя схематически представлена на рисунке 4.4.

Исходя из основ кинематики, методика основана на применении математических зависимостей, позволяющих для каждой рассматриваемой точки напыляемой поверхности, совершающей движение по механизму «вращение-качение», определять расстояние до центра подложкодержателя и анализировать свойства покрытий в зависимости от времени, которое образец проводит в области проекции зоны эрозии мишени за один цикл вращения в процессе ВЧ-магнетронного распыления.

Подложкодержатель вращается относительно собственной центральной оси А, которая совпадает с осью магнетрона в стационарном положении, расстояние от центра подложкодержателя до анализируемой точки определяется радиусом R. В Декартовой системе координат XOY механизм движения центра подложкодержателя представляется дугой с радиусом D, который поворачивается вокруг точки O на угол $(\beta \pm \frac{\alpha}{2})$.

Координаты центра подложкодержателя, совершающего движение по дуге, задается следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} x_0 = D \cos \left(\beta + \frac{\alpha}{2} \sin \frac{2\pi t}{T_0} \right) - D \cos \beta \\ y_0 = D \sin \left(\beta + \frac{\alpha}{2} \sin \frac{2\pi t}{T_0} \right) - D \sin \beta \end{cases} \quad (4.1)$$

где T_0 – период движения подложкодержателя по дуге.

Вращение образцов по окружности в плоскости подложкодержателя можно описать следующим образом:

$$\begin{cases} x_1 = R \cos \frac{2\pi t}{T_1} \\ y_1 = R \sin \frac{2\pi t}{T_1} \end{cases} \quad (4.2)$$

где T_1 – период движения подложкодержателя по окружности.

Таким образом, двойное пространственное вращение образцов в каждой точке подложки может быть описано комбинацией представленных систем уравнений:

$$\begin{cases} x = x_0 + x_1 \\ y = y_0 + y_1 \end{cases} \quad (4.3)$$

Расстояние от центра плоскости проекции магнетронной системы на плоскость подложкодержателя до определенной точки напыляемой поверхности определяется по формуле:

$$P = \sqrt{x^2 + y^2}. \quad (4.4)$$

Зная расстояние P в каждый момент времени можно определить траекторию движения образца за один цикл вращения. В качестве примера на рисунке 4.5 приведена траектория движения для двух точек поверхности подложкодержателя, расположенных на расстоянии R равном 20 мм и 60 мм от центра.

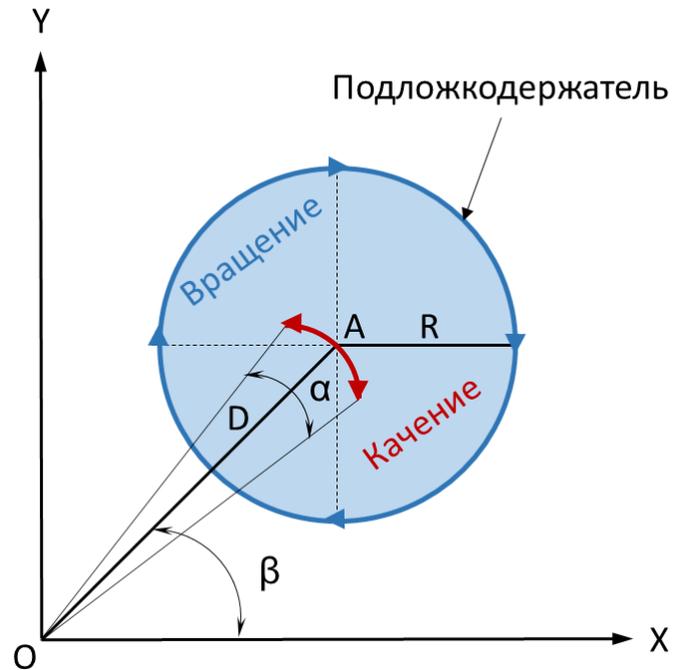


Рисунок 4.4 – Схематическое представление механизма движения подложкодержателя

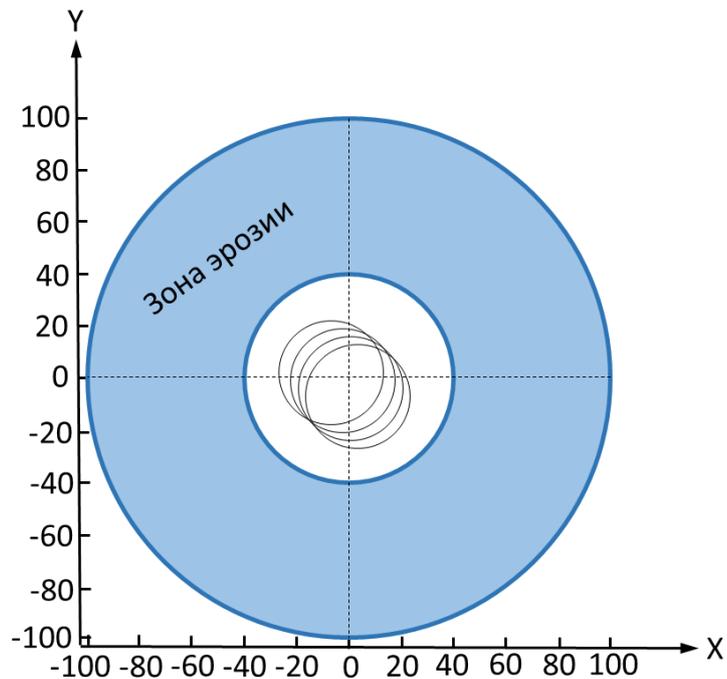


Рисунок 4.5 – Траектория движения точек подложкодержателя, расположенных на расстоянии 20 мм от его центра в процессе вращения-качения

4.5 Синтез наночастиц серебра в присутствии стабилизатора ПВП/ПЭИ

Наночастицы серебра были синтезированы методом химического восстановления нитрата серебра глюкозой (рисунок 4.6 (а)) в присутствии стабилизатора ПВП/ПЭИ (рисунок 4.6 (б) / (в)), данная технология описана в трудах [16, 10, 137].

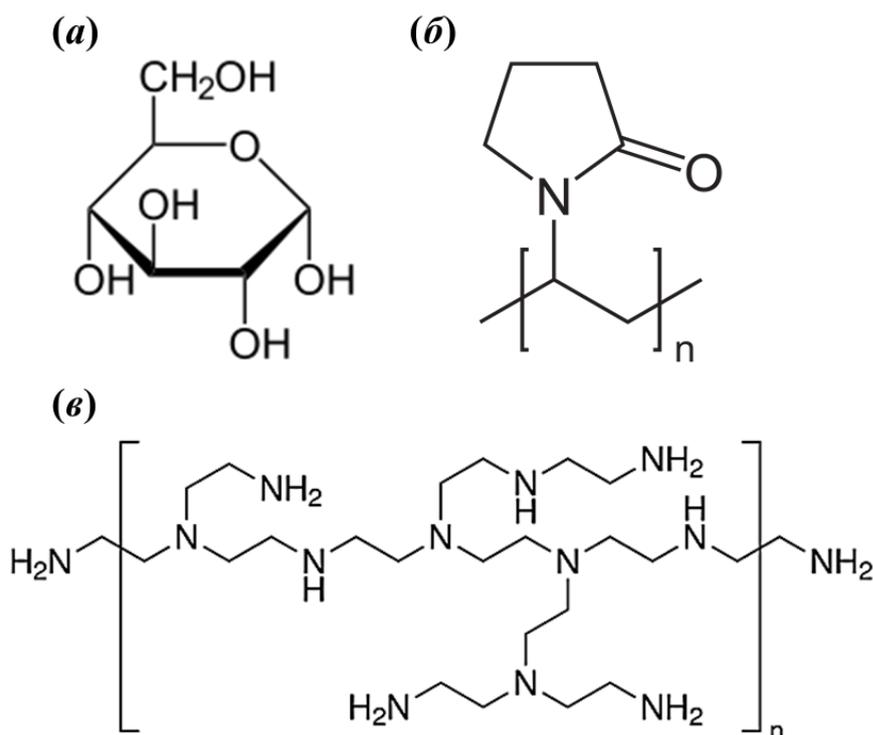


Рисунок 4.6 – Проекция Хеурса для D-(+)-глюкозы (а); структурная формула ПВП (б); структурная формула ПЭИ (в)

Схема синтеза AgНЧ стабилизированных с ПВП и ПЭИ: 2 г глюкозы и 1 г ПВП/ПЭИ были растворены в 40 мл воды и нагреты до 90 °С. Затем быстро добавляли 0,5 г AgNO₃, растворенных в 1 мл воды. Восстановление частиц серебра протекало при температуре 90 °С в течение 5/60 минут, с последующим охлаждением до комнатной температуры. Наночастицы были фракционированы посредством ультрацентрифугирования (3 промывания, 20 000 об/мин, 20 мин), повторно диспергированы в чистой дистиллированной воде и вновь фракционированы. Таким образом, путем промывания были удалены все избытки NO₃⁻, ПВП, Ag⁺, глюкозы и ее продуктов окисления. Конечная концентрация серебра во всех дисперсиях определяли с

помощью атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС). Гидродинамический размер, степень дисперсности системы, а также заряд частиц определяли с помощью методов ДРС и АТН.

4.6 Электрофоретическое осаждение

Метод ЭФО часто встречается в случае осаждения керамических покрытий или пленок органокерамических материалов на катоде, состоящем на основе коллоидных дисперсий [138-141]. Методика ЭФО имеет ряд отличительных особенностей: наноразмерные частицы в коллоидных дисперсиях стабилизированы по электростатическому или электростерическому механизму, осадок получаемый методом ЭФО не всегда является электропроводящим. В ходе диспергирования в полярных растворителях или растворах электролитов на поверхности наночастиц накапливается электрический заряд по одному или нескольким нижеперечисленных механизмов: 1) предпочтительное растворение или 2) осаждение заряженных частиц, 3) предпочтительное восстановление или 4) окисление и 5) адсорбция заряженных частиц, например, полимеров. Заряженные поверхности электростатически притягивают противоположно заряженные частицы (которые обычно называют противоионами), находящиеся в растворе. Комбинация электростатических сил, Броуновского движения и осмотических сил приводит к образованию так называемой структуры двойного слоя. Концентрация противоионов постепенно уменьшается с увеличением расстояния от поверхности, в то время как концентрация определяющих заряд ионов увеличивается. Как результат, электрический потенциал уменьшается с расстоянием. Около частиц, расположенных на поверхности, электрический потенциал уменьшается линейно (слой Стерна). За пределами слоя Стерна уменьшение происходит экспоненциально, и область между слоем Стерна и точкой, где электрический потенциал равен нулю, называется диффузионным слоем. Слой Стерна и диффузионный слой формируют структуру двойного слоя. При приложении внешнего электрического поля к КС, входящие в её состав заряженные частицы начинают свое движение [138, 141]. Принципиальная схема ЭФО ячейки для электрофоретического осаждения AgНЧ представлена на рисунке 4.7.

ЭФО осуществляется с помощью движения заряженных частиц, диспергированных в подходящем растворителе, к электроду под приложенным электрическим полем. В результате электрофоретического движения заряженных частиц на электроде образуется однородный слой-покрытие. В отличие от многих коллоидных процессов, могут быть использованы суспензии с относительно низким содержанием НЧ. Данный метод может быть применен, к любым твердофазным частицам в различных формах и с малыми размерами (<30 нм), а также к КР [138, 140]. В метод ЭФО заложено два процесса. На первом этапе частицы, взвешенные в жидкости,

переходят к электроду посредством приложенного электрического поля (электрофорез). На втором этапе частицы собирают на электроде и образуют слой НЧ (отложение).

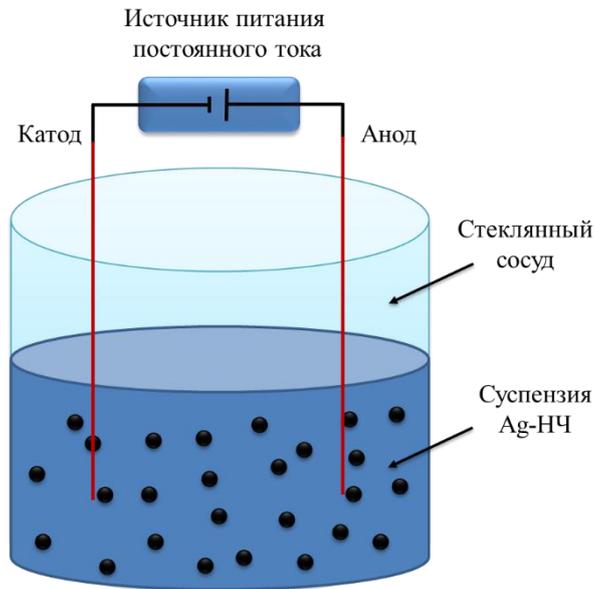


Рисунок 4.7 – Принципиальная схема электрофоретического осаждения AgНЧ в ЭФО ячейке с плоскими электродами

С помощью ЭФО нанесение слоя НЧ может выполняться как на проводящих, так и неэлектропроводных поверхностях [138, 141]. По сравнению с другими методами обработки ЭФО обладает рядом преимуществ: низкая стоимость, простота процесса формирования покрытия, равномерность слоя, легкий контроль толщины осаждаемого слоя, однородная микроструктура, возможность осаждения на подложки сложной формы [138-141]. Все эти преимущества могут быть также характерны для формирования пленок и покрытий на основе AgНЧ.

4.7 Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

СЭМ представляет собой метод визуализации поверхностей с высоким разрешением. Световые микроскопы могут использоваться только до минимального размера наблюдаемого объекта около 200 нм, что соответствует половине длины волны видимого света. Вместо света электронные микроскопы используют электроны с гораздо меньшей длиной волны допуская разрешение вплоть до диапазона 1 нм.

Все образцы исследуются в высоком вакууме, чтобы избежать взаимодействия электронного пучка с молекулами из воздуха. В горячем катоде электроны генерируются и ускоряются анодом. Создаваемый таким образом первичный электронный пучок фокусируется цилиндром Вайнтельта, затем луч проходит через электромагнитные катушки, они фокусируют луч и фокусируются на исследуемом объекте. Образец сканируется по точкам, поэтому электроны выбиваются из образца электронным пучком. Эти электроны имеют более низкую энергию, чем излучаемые (первичные электроны) и называются вторичными электронами. Интенсивность вторичного излучения зависит от угла наклона поверхности объекта. Вторичные электроны собираются с помощью бокового датчика, тем самым создавая рельефность объектов, потому что наклонное расположение деталей кажется ближе к детектору и ярче, чем обращенное от него. Изображение образца рассчитывается путем обнаружения первичного и вторичного электронов. Отображаться могут только проводящие поверхности, непроводящие образцы могут заряжаться, что приводит к отклонению электронного луча, делая изображение белым [142, 143]. Чтобы этого избежать, непроводящие образцы покрываются проводящим слоем (например, Ag и Pd или Au) [144]. Проводящий слой не должен быть слишком толстым, иначе морфология образца, которая имеет характерные наноразмеры будет искажена. Изображения СЭМ, показанные в этой работе, были сделаны с помощью FEI Quanta FEG 400.

С помощью СЭМ возможно получать только изображения поверхности исследуемого образца. Чтобы узнать элементный состав материала образца, используется ЭДРА. В этом случае элементный состав образца может определяться испускаемыми рентгеновскими лучами. Атомы образца возбуждаются электронным пучком, затем возбужденный электрон выбивается из внутренней оболочки атома. Полученный зазор заполняется электроном из энергетически более высокой оболочки, этот электрон излучает характерное рентгеновское излучение. С помощью этого рентгеновского излучения, характерного для каждого элемента, можно записать рентгеновский спектр образца. Впоследствии пики могут быть отнесены к элементам, присутствующим в образце [115]. Спектры ЭДРА в этой работе были получены с помощью системы анализа EDAX EDS Genesis 4000.

4.8 Рентгенофазовый анализ

Структурно-фазовый анализ наноструктурированных поверхностей в последние годы становится все более важным из-за стремительно развивающейся области нанотехнологий и наук о поверхности. РФА является очень мощным инструментом, позволяющим исследовать структуру поверхности образца, определить его фазовый состав, размер кристаллитов, а также

параметры кристаллической решетки. Его часто используется в качестве универсального метода для бесконтактного и неразрушающего исследования наноструктурированных поверхностей. РФА основывается на дифракции волн при взаимодействии рентгеновских лучей с атомами кристаллической решетки исследуемого образца, рисунок 4.8 [145].

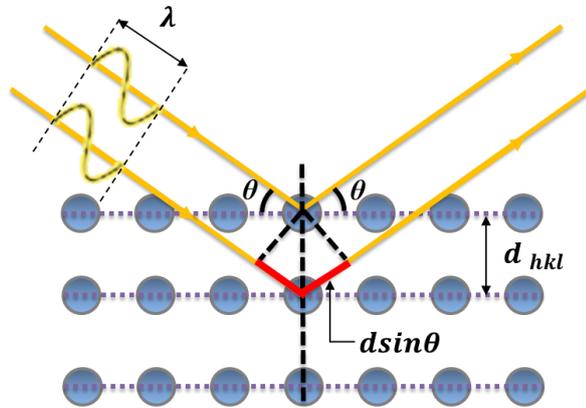


Рисунок 4.8 – Рентгеновская дифракция

Образец облучается монохроматическим рентгеновским излучением и детектируется рассеянное излучение. Длина волны охватывает диапазон от 1 мкм до 10 нм, что соответствует расстоянию атомов в кристаллических решетках. Поэтому рентгеновский луч дифрагирует на электронной оболочке атомов, а дифрагированные волны усиливают друг друга, если разность хода равна целому числу длин волн. Расстояние между атомами отвечает за разность хода дифрагированных волн. Эта разность хода может быть рассчитана по углу падения и межплоскостному расстоянию, используя соотношение Вульфа-Брэгга:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta, \quad (4.5)$$

где, n – порядок дифракционного максимума, d_{hkl} – межплоскостное расстояние, λ – длина волны рентгеновского излучения, θ – угол Брэгга.

Отдельные кристаллические фазы могут быть идентифицированы в соответствии с базой данных ICDD (Международный центр дифракционных данных) номер карточки для: синтетического ГА (4-0432), монокристаллов кремния (111) (27–1402), титана (44–1294), серебра (4-0783). Важное значение имеют дифракционная картина и относительная интенсивность сигналов. Степень кристалличности может быть определена с помощью рентгеновской дифракции. Очень узкие рефлексы говорят о высококристаллическом образце, в результате чего аморфные образцы не показывают отражений из-за отсутствия дальнего порядка. В нанокристаллических образцах отражения расширяются, несмотря на высокую кристалличность из-за ограниченных размеров кристаллов, также на уширение спектральных линий влияют структурные дефекты в структуре образца.

Размер кристаллитов или области когерентного рассеяния (ОКР) рассчитывались из формулы Шеррера:

$$R_{hkl} = \frac{k\lambda}{B \cdot \cos\theta}, \quad (4.6)$$

где R_{hkl} – размер кристаллита, $k = 0,9$ зависящая от формы кристалла постоянная; λ – длина волны рентгеновского излучения; θ – угол Брэгга; B – ширина дифракционного пика на полувысоте.

Для определения внутренней структуры и фазового состава исследуемых образцов использовался Panalytical Empyrean X-ray дифрактометр с источником излучения $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, 40 кВ и 40 мА). Покрытия были исследованы с использованием рентгеновской дифракции в геометрии скользящего пучка (GIXRD) с фиксированным углом падения луча $\varphi = 1,0^\circ$ и $2,0^\circ$ (относительно поверхности образца) и 2θ от 5° до 90° с шагом сканирования $0,05^\circ$.

Для определения среднего размера кристаллитов и кристаллографической плотности, а также параметров решетки и индивидуального содержания фаз было проведено уточнение Ритвельда с программным пакетом TOPAS 4.2 (Bruker). Метод Ритвельда является методом уточнения, который может быть использован для характеристики кристаллических материалов. Высота, ширина и положение рефлексов предоставляют информацию о многих аспектах исследуемой структуры. В уточнении Ритвельда используется математический метод наименьших квадратов. Посредством этого способа могут быть охарактеризованы различные фазы в образце, а пропорции соответствующей фазы могут быть рассчитаны в процентном соотношении.

Для каждого уточнения Ритвельда учитывалась инструментальная поправка, определяемая стандартным образцом порошка LaB_6 из Национального института стандартов и технологий, в качестве стандартного эталонного материала использовали (SRM 660b, $\lambda (\text{LaB}_6) = 4.15689 \text{ \AA}$).

4.9 Спектральная эллипсометрия

Эллипсометрия – это универсальная технология неразрушающего и бесконтактного контроля свойств тонких пленок, которая имеет приложения во многих областях науки и техники [146]. Ключевой особенностью эллипсометрии является то, что она измеряет изменение поляризованного света при отражении света от поверхности образца. Эллипсометрия измеряет два основополагающих значения (ψ , Δ). Они представляют собой отношение амплитуды ψ и разность фаз Δ между светом, известными как р- и s-поляризованные световые волны, рисунок 4.9. В спектральной эллипсометрии (ψ , Δ) спектры измеряются путем изменения длины волны света в диапазоне от 250 до 1000 нм.

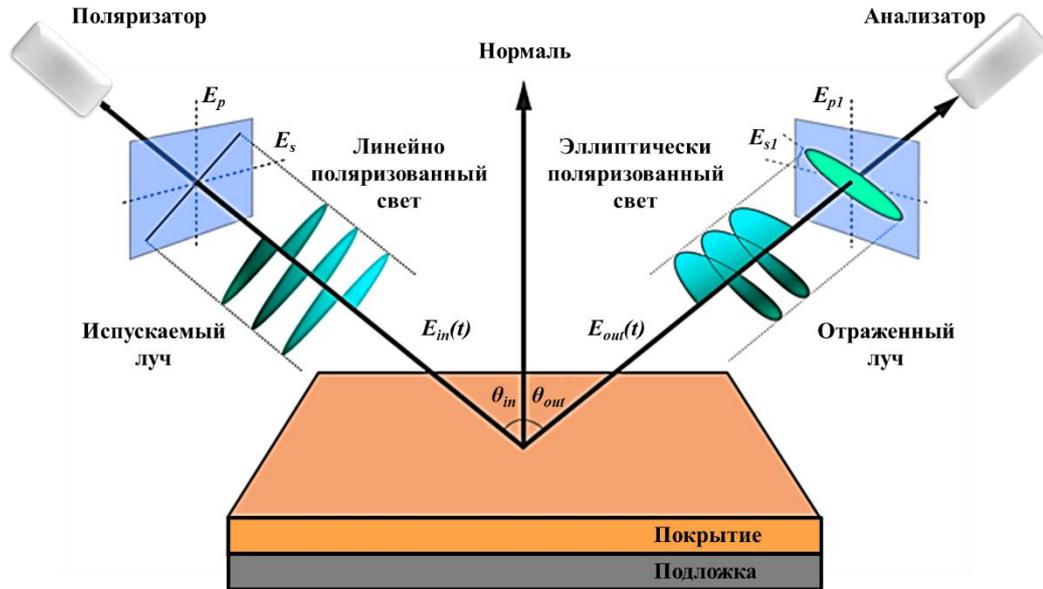


Рисунок 4.9 – Схема, поясняющая принцип эллипсометрических измерений

Из рисунка 4.9 видно, что испускаемое излучение с линейно поляризованным светом достигает исследуемого образца, взаимодействует с его структурой и после отражения свет становится эллиптически поляризованным. Свойства эллипса поляризации, а именно, эксцентриситет и ориентация осей, характеризуются оптическими свойствами исследуемой структуры и исходным углом испускаемого луча света. В ходе эксперимента измеряются значения отношения комплексных показателей отражения для двух видов поляризации луча световой волны: в плоскости (p) и перпендикулярно к плоскости падения (s), данное отношение можно выразить через параметры ψ и Δ . Эллипсометрические параметры характеризуются изменением амплитуд поляризаций, а также сдвигом фаз. Уравнение, связывающее параметры эллипса поляризации с коэффициентами отражения (основное уравнение эллипсометрии) можно записать в следующем виде:

$$\rho \equiv tg\psi \cdot e^{i\Delta} \equiv r_p/r_s \equiv \left(\frac{E_{p1}}{E_p} \right) / \left(\frac{E_{s1}}{E_s} \right), \quad (4.7)$$

где ψ и Δ – эллипсометрические углы, измеряемые с помощью эллипсометра.

С целью определения параметров модели по измеренным эллипсометрическим значениям ψ и Δ , необходимо решить так называемую обратную задачу эллипсометрии.

Различия эллипсометрических параметров, включая Δ и ψ , представлены на рисунке 4.10. Отраженный пучок, можно характеризовать из соотношения осей эллипса поляризации отраженной волны и разность фаз его компонент, электрические векторы которых находятся в плоскости падения и перпендикулярны ей [146, 147].

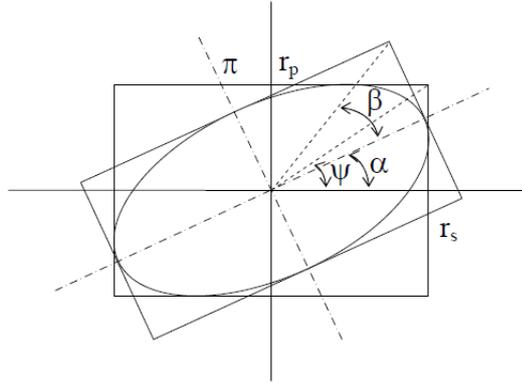


Рисунок 4.10 – Эллипс поляризации

Связь между углами α и β , рисунок 4.10, и ψ , Δ выражается из следующих соотношений:

$$\cos 2\psi = \cos 2\alpha \cdot \cos 2\beta ; \quad (4.8)$$

$$\operatorname{tg} \Delta = \operatorname{tg} 2\beta / \sin 2\alpha .$$

Из соотношений (2.7) получаем:

$$n^2 - k^2 = n_0^2 \cdot \sin \theta_0 \left[1 + \frac{\operatorname{tg}^2 \theta_0 \cdot (\cos^2 2\psi - \sin^2 2\psi \cdot \sin^2 \Delta)}{(1 + \sin^2 \psi \cdot \cos \Delta)^2} \right], \quad (4.9)$$

$$n \cdot k = \frac{n_0^2 \cdot \sin^2 \theta_0 \cdot \operatorname{tg}^2 \theta_0 \cdot \sin 2\psi \cdot \cos 2\psi \cdot \sin \Delta}{(1 + \sin^2 \psi \cdot \cos \Delta)^2}. \quad (4.10)$$

Соотношения (4.9) и (4.10) свидетельствуют о том, что искомые параметры n и k возможно определить для любого угла падения θ_0 по измеренным значениям эллипсометрических параметров Δ и ψ .

Коэффициенты отражения характеризуются свойствами отражающей поверхности, то есть её рельефом, распределением оптических постоянных в приповерхностных слоях.

Разработанные, в настоящее время, математические модели способны рассчитать показатели отражения многослойных и неоднородных по толщине систем, гетерогенных слоев, композиционных материалов, описать отражение от поверхностей с развитой морфологией и островковых пленок. Следовательно, в ходе комплексного подхода стало возможным проводить быстродействующий неразрушающий контроль сложных многослойных наноструктур [148]. Исследование толщины покрытий и оптических характеристик проводилось спектральным эллипсометрическим комплексом Ellipse 1891 SAG.

4.10 Динамическое рассеяние света и дзета-потенциал

ДРС является одним из самых популярных методов рассеяния света, поскольку позволяет измерять размер частиц до 1 нм. Основной принцип работы метода достаточно прост:

образец освещается лазерным лучом, а флуктуации рассеянного света обнаруживаются при известном угле рассеяния θ быстрым детектором фотонов, рисунок 4.11. Лазерный свет рассеивается коллоидными частицами, что приводит к флуктуации интенсивности рассеяния, вызванной броуновским движением, которое постоянно изменяет расстояния рассеивающих центров. Чтобы получить информацию о скорости движения частиц в растворе, флуктуации должны наблюдаться зависящим от времени. С помощью автокорреляционной функции определяются динамические характеристики частиц. В случае моодисперсных частиц получается экспоненциальная функция. Их курс отклоняется в полидисперсных системах. В случае моодисперсных сфер корреляционная функция зависит от коэффициента трансляционной диффузии. Определяя коэффициент диффузии, гидродинамический радиус может быть рассчитан с использованием уравнения Стокса-Эйнштейна [149]:

$$r_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (4.11)$$

где, r_H – гидродинамический радиус, k – постоянная Больцмана, T – температура, η – вязкость растворителя, D – коэффициент диффузии.

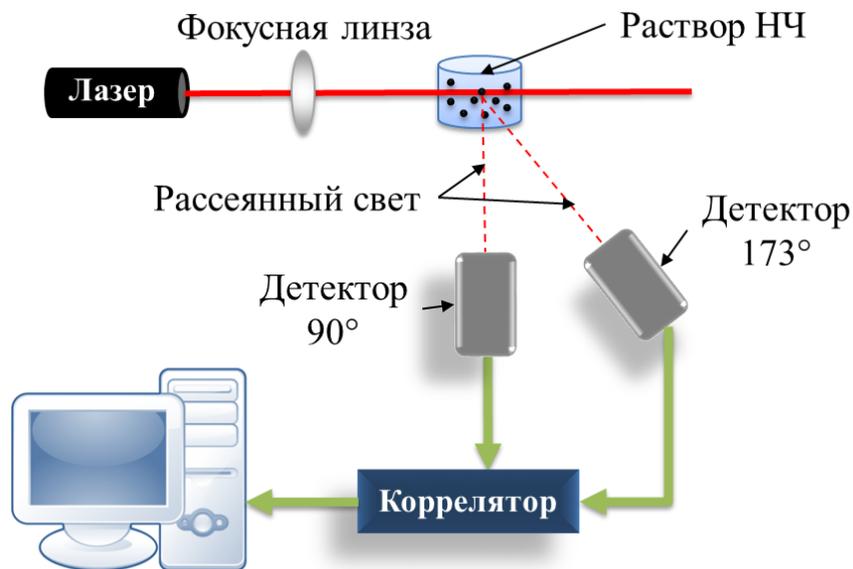


Рисунок 4.11 – Схематическое изображение траектории пучка в Malvern Zetasizer NanoZS

Оценка измерения осуществляется в соответствии с методом кумулянтов. Они дают значения размера частиц, а также ширины распределения. Из подгонки кумулянтов можно рассчитать индекс полидисперсности (ИПД) образца. Это значение дает информацию о ширине распределения частиц по размеру. ИПД равный 0 соответствует строго моодисперсному распределению размеров, это значение практически невозможно реализовать на практике. Чем

больше полидисперсных частиц, тем выше ИПД. До значения 0,3 можно говорить о монодисперсном распределении коллоидных частиц по размеру [116].

Измерения для определения размера частиц проводили с помощью Malvern Zetasizer NanoZS (длина волны лазера 633 нм). Это устройство использует неинвазивную оптику обратного рассеяния. Благодаря этому методу рассеянный свет увеличивается без снижения качества сигнала. Он также позволяет проводить измерения в чрезвычайно высоких концентрациях. Использование обратного рассеяния под углом 173° вместо детектирования рассеянного света под углом 90° , увеличивает чувствительность измерения, и в то же время минимизируются возмущения вследствие многократного рассеяния. Это бесконтактная технология, устраняющая необходимость очистки измерительной ячейки и детектора. Водные образцы измеряют в капиллярной ячейке из полистирола, образцы в органических растворителях в кювете из кварцевого стекла. Схематическая схема пути луча в Zetasizer показана на рисунке 4.11. Благодаря объективу фокусировки лазерная фокусировка может перемещаться внутри измерительной ячейки. Для малых частиц или образцов с низкой концентрацией фокус в центре образца направлен на увеличение рассеяния образца.

Дзета-потенциал (ζ) также называется кулоновским потенциалом. Это электрический потенциал на сдвиговом слое движущейся частицы в суспензии, рисунок 4.12.

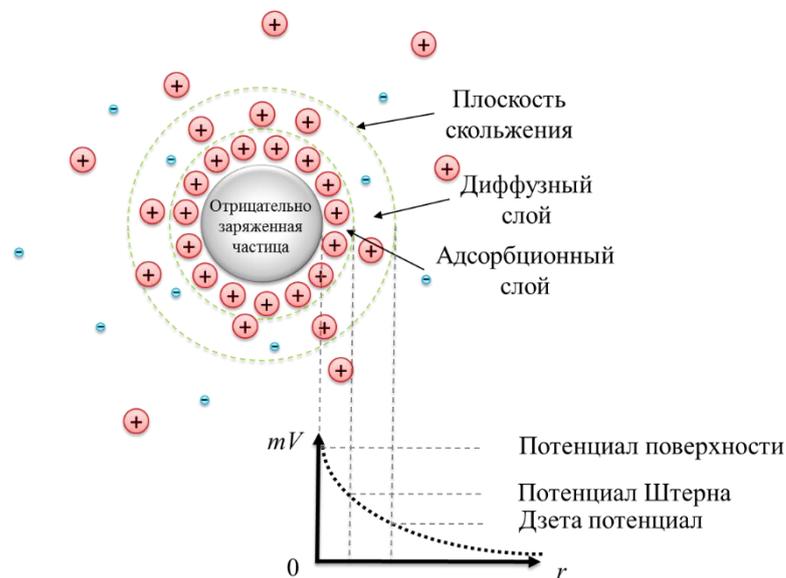


Рисунок 4.12 – Образование двойного электрического слоя приводит к появлению электрического потенциала, который убывает с расстоянием и его значение в разных точках соответствует: потенциалу поверхности, потенциалу Штерна и дзета-потенциалу

Дзета-потенциал нельзя измерить напрямую, он рассчитывается с использованием других измеряемых величин. Он дает информацию об электрохимических свойствах частицы в

жидкости. Определяя электрофоретическую подвижность частиц, а затем вычисляя с помощью уравнения Генри, можно определить дзета-потенциал. Электрофоретическая подвижность может быть определена электрофоретическим экспериментом. В этом случае заряженные частицы мигрируют в приложенном поле в соответствии с их зарядом к электроду встречного заряда. Скорость частиц зависит от следующих факторов: прочность электрического поля или напряжения, диэлектрическая постоянная среды, вязкость среды, дзета-потенциал [116, 145, 150].

Скорость частиц в электрическом поле называется их электрофоретической подвижностью.

$$U_E = v/E, \quad (4.12)$$

где, U_E – электрофоретическая подвижность, v – скорость движения частиц, E – напряженность электрического поля. Используя уравнение Генри, дзета-потенциал можно вычислить из уравнения электрофоретической подвижности:

$$\zeta = \frac{3U_E\eta}{2\epsilon f(\kappa\alpha)}, \quad (4.13)$$

где, ζ – дзета-потенциал, U_E – электрофоретическая подвижность, η – вязкость, ϵ – диэлектрическая постоянная, $f(\kappa\alpha)$ – функция Генри [151, 152].

Для расчета дзета-потенциала имеются два приближения. В водных средах с низкими концентрациями электролита предполагается приближение по Смолуховскому, для функции Генри значение 1,5. Для малых частиц в средах с малой диэлектрической постоянной используется значение 1,0 для $f(\kappa\alpha)$, так называемое приближение Хюккеля. В неводных средах обычно используется приближение Хюккеля. Определение дзета-потенциала и размера AgНЧ производилось с помощью Malvern Zetasizer Nano ZS.

4.11 Анализ треков наночастиц

Метод АТН является уникальным для визуализации и анализа размерных характеристик частиц в жидкостях, находящихся в броуновского движении. Скорость данного движения связана с вязкостью жидкости, температурой и размером частиц, не зависит от плотности частиц или показателя преломления. Частицы, содержащиеся в образце, визуализируются в силу рассеивания света при освещении лазером. Типичное время анализа составляет порядка 30 с, однако более длительное время анализ приводит к повышению точности и статистики исследования. Размер исследуемых частиц может варьироваться в субмикронном диапазоне 10-1000 nm. Схема метода АТН поясняет рисунок 4.13.

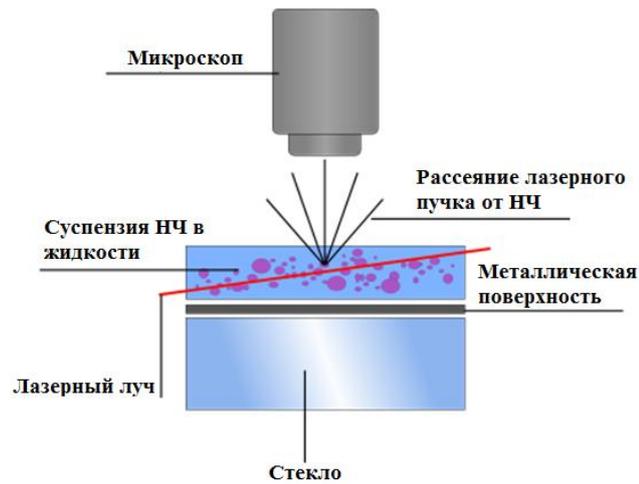


Рисунок 4.13 – Принципиальная схема измерения методом АТН

Исследуемый образец, находящийся в экспериментальной ячейке, освещается лазерным лучом. Свет, рассеянный частицами, детектируется камерой и движение каждой частицы отслеживается от кадра к кадру. Этот рассеянный свет можно непосредственно наблюдать в виде точек отражения через микроскоп, т.е. движение отдельных частиц сразу становится видимым. Движущиеся рассеянные световые центры регистрируются с помощью камеры, подключенной к микроскопу. Уравнение Стокса-Эйнштейна (4.14), основанное на скорости движения частиц, позволяет рассчитать значение гидродинамического радиуса (4.15) [153-156]:

$$D = \frac{\overline{\langle x, y \rangle^2}}{4t}; D = \frac{4k_B T}{3\pi\eta d}, \quad (4.14)$$

$$d = \frac{16tk_B T}{3\pi\eta \overline{\langle x, y \rangle^2}} \quad (4.15)$$

где, k_B – постоянная Больцмана, T – температура, η – вязкость, d – гидродинамический диаметр частицы, t – время измерения.

4.12 Атомно-абсорбционная спектроскопия

ААС представляет собой метод элементного анализа и служит для количественного определения отдельных элементов. Метод основан на том, что каждый элемент имеет конкретные линии поглощения. Каждый атом в основном состоянии способен поглощать определенную длину волны электромагнитного спектра в интервале длин волн от 190 нм до 850 нм. В методе ААС используются источники света, излучающие характерное излучение искомого элемента, поэтому атомное поглощение может быть использовано в качестве селективного, специфичного для элемента, высокочувствительного метода анализа. Атомы, которые

измеряются в ААС, должны присутствовать в газовой фазе для обнаружения. Образец, подлежащий испытанию, преобразуется в газообразное состояние и распыляется термической диссоциацией путем распыления. Используются различные методы распыления:

- технология пламени,
- технология труб из графита,
- гибридная технология,
- технология холодного пара.

Технология пламени и технология графитовой печи являются наиболее часто используемыми методами распыления. В обоих методах образцы вводят в газовую фазу путем нагревания. После переноса образца в газовую фазу свободные атомы возбуждаются электромагнитным излучением определенной длины волны. Свет частично поглощается образцом, и измеряется интенсивность выходящего света [115, 157-159]. ААС проводили с помощью спектрометра А-серии М от Thermo Electron Corporation.

4.13 Исследование адгезионной прочности покрытия методом скретч-тест

Современная технология склерометрии (метод царапания, scratch-test, скретч-тест), является простым, быстрым и информативным методом для исследования прочности сцепления покрытий, а также их механических свойств [160]. В основе метода лежит процесс нанесения царапин (алмазным/сапфировым индентором) на поверхности покрытия, который проходит на выбранном участке образца при заданной длине царапины и под постоянной, растущей или прогрессивной нагрузкой до момента разрушения исследуемого покрытия.

В представленном методе, величина критической нагрузки обусловлена прочностью сцепления исследуемого покрытия, поскольку при достижении данного параметра происходит отслоение покрытия. Механизм разрушения покрытия складывается из системы следующих воздействий: при заданном равномерном движении увеличение глубины проникновения приводит к увеличению площади соприкосновения исследуемого образца и индентора, что в свою очередь приводит к росту силы трения в месте соприкосновения или так называемой тангенциальной силе отрыва.

Обычно скретч-тестер оснащен интегрированным оптическим микроскопом, который используется для сбора данных панорамного изображения, где точки критического повреждения покрытия легко идентифицируются, также датчиками для контроля глубины проникновения, силы поперечного трения и акустической эмиссии.

Исследование адгезионных свойств Ag-ГА биокompозита на титановой (BT1-0) подложке проводилось на установке CSEM Micro Scratch Tester (MST-S-AX-0000).

4.14 Исследование растворимости Ag-ГА биокompозита и его антибактериальных свойств *in vitro*

Для растворения Ag-ГА биокompозита был выбран изотонический натрий-фосфатный буфер (Phosphate buffered saline, PBS), широко используемый в биологических исследованиях. натрий-фосфатного буфера это водный раствор солей: хлорида натрия, фосфата натрия, хлорида калия и фосфата калия, таблица 2.2. Водородный показатель (pH) составляет 7,4, следовательно, среда буфера щелочная.

Таблица 4.2. – Состав и концентрации солей натрий-фосфатного буфера

Соль	NaCl	KCl	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
Концентрация, г/л	8	0,2	1,44	0,24

Исследуемые образцы растворяли в 5 мл раствора натрий-фосфатного буфера на протяжении 1, 3 и 7 дней при температуре 37°C и постоянном перемешивании (170 об / мин). Исследование количества серебра в среде после растворения проводилось методом ААС. Анализ морфологии поверхности и элементного состава Ag-ГА биокompозита после растворения проводился методом СЭМ. Так же методом ААС был проведен анализ количества серебра в Ag-ГА биокompозите после растворения в натрий-фосфатного буфера, при полной деградации исследуемого образца в азотной кислоте (HNO₃, 65 масс %).

Антибактериальные тесты проводились полуколичественным методом определения оптической плотности при длине волны $\lambda=600$ нм, с помощью установки для измерения плотности клеток (СО8000, WPA, Cambridge, UK), при нормировке на величину отрицательного контроля (100%). Антибактериальную активность Ag-ГА биокompозита оценивали с помощью грамтрицательного штамма кишечной палочки (*Escherichia coli* DH5 α , *E.coli*). Исследуемые образцы Ag-ГА биокompозита (6 образцов размером 1×1 см² помещали в 4 мл натрий-фосфатного буфера) инкубировали в среде натрий-фосфатного буфера в течение 3 дней при 37°C при постоянном перемешивании (170 об / мин). Затем в питательную среду для роста бактерий, лизогенный бульон (Lysogeny broth, LB) (20 г / л), добавляли по 0,5 или 1 мл, инкубированной в натрий-фосфатного буфера, среды с последующим введением *E. coli* (1,5×10³ КОЕ / мл). Бактерии *E. coli* разбавляли согласно стандарту мутности, McFarland 0,5, что эквивалентно 1,5×10⁸ колониеобразующим единицам (КОЕ), с последующим серийным разбавлением до 1,5 ×10³ КОЕ / мл. Раствор натрий-фосфатного буфера добавляли в пробы до достижения равного объема. Отрицательным контролем был выбран раствор на основе LB, *E. coli* (1,5×10³ КОЕ / мл) и

раствора натрий-фосфатного буфера. Положительный контроль состоял из раствора на основе LB, ампициллина (10 мг / л) и *E. coli* ($1,5 \times 10^3$ КОЕ / мл). Все пробы культивировали на протяжении ночи при постоянном перемешивании (170 об / мин) и температуре 37°C.

4.15 Биологические исследования с использованием клеточных культур в условиях *in vitro*

Исследование биосовместимых свойств Ag-ГА биокompозита является необходимым. Так для *in vitro* исследования была выбрана методика, позволяющая проводить эксперимент в непосредственном контакте с поверхностью Ag-ГА биокompозита, где исследуемые образцы помещают в клеточную культуру. Данная методика позволяет проанализировать биосовместимые свойства композита и спрогнозировать реакцию взаимодействия, исследуемого материала с костной тканью.

Для проведения *in vitro* исследования была выбрана клеточная линия человеческих остеобластов (*MG-63*). Для оценки жизнеспособности клеток был проведен колориметрический МТТ-тест. Исследование морфологии и эффективности прикрепления клеток к исследуемой поверхности проводилось методом СЭМ и по средствам флуоресцентного анализа.

Клетки высевали на поверхность Ag-ГА биокompозита и чистые титановые подложки в 24-луночные планшеты с плотностью клеток 10 000 и 2000 клеток на лунку инкубировали в течение 1 и 3 дней, соответственно. Затем, образцы переносили в свежие лунки, чтобы исключить тот массив клеток, который вырос за пределами исследуемых образцов.

С целью определения цитотоксичности исследуемых образцов был приготовлен исходный раствор МТТ (3- [4,5-диметилтиазол-2-ил] -2,5-дифенилтетразолия бромид, Sigma, Taufkirchen, Германия) в среде натрий-фосфатного буфера (5 мг / мл) с последующим разбавлением до 1 мг / мл в клеточной культуральной среде (среда с высоким содержанием D-глюкозы (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Fetal Calf Serum, FCS), 2 мМ глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг / мл стрептомицина). К клеткам добавляли 300 мкл раствора МТТ, с последующим культивированием не менее 1 часа при 37°C в 5% CO₂. Затем полученную темно-синюю формазановую соль растворяли в 300 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) путем инкубации клеток в течение 30 мин. Спектрофотометрические измерения проводили с использованием установки Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) при $\lambda = 570$ нм, анализируемый объем каждой пробы составлял 50 мкл. Для оценки жизнеспособности клеток в качестве контроля была выбрана система с клетками, культивированными на чистой титановой подложке.

Для исследования морфологии клеток, культивируемых на исследуемых образцах, и степень их прикрепления, использовали метод флуоресцентного анализа и СЭМ.

После инкубации клеток в течение 24 и 72 ч образцы дважды промывали средой для культур клеток (Roswell Park Memorial Institute medium, RPMI) и окрашивали с помощью Alexa-488-конъюгированного фаллоидина (Invitrogen, Германия) и ДНК красителем (4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI), Molecular Probes™, Life Technologies, США) для визуализации клеточной мембраны и из ядер, соответственно. Клетки изучали с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием прибора Zeiss Axiovert 40 CFL, оснащенного фильтрами для тетраметилродамин-изотиоцианата (TRITC, возбуждение: 540 нм, эмиссия: 605 нм), зеленого флуоресцентного белка (Green fluorescent protein, GFP) BP, возбуждение: 470 нм, эмиссия: 535 нм) и каналы для 4', 6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, возбуждение: 360 нм, излучение: 460 нм).

По завершении процесса инкубации клеток в течение 24 ч и 72 ч, образцы промывали в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (pH 7.4) и фиксировали 12 часов в 2,5% растворе глутарового альдегида, приготовленном на буфере, при температуре 5°C. После фиксации образцы материалов промывали в растворе ФСБ и последовательно дегидратировали в водном растворе этанола с возрастающей концентрацией: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и в абсолютном этаноле на заключительном этапе. На каждой стадии образцы дважды погружали на 5 минут в раствор этилового спирта. Для удаления спирта образцы переносили на 30 минут в гексаметилдисилазан (ГМДС), после чего высушивали на воздухе. Образцы фиксировали углеродным скотчем на предметном столике микроскопа и предварительно напыляли проводящий слой золота 10±5 нм. Изображения клеток получали методом СЭМ на микроскопе FEI Quanta 400 FEG.

4.16 Флуоресцентный анализ

Флуоресцентная микроскопия является специальной формой световой микроскопии, где используется физический эффект флуоресценции. Автофлуоресцентные образцы или флуорохромы возбуждаются светом определенной длины волны, которые снова излучают через несколько наносекунд светом различной длины волны, который можно детектировать [115, 161]. Флуоресцентное излучение, обусловленное световым потоком, зависит от характеристик поглощения и излучения флуорофора, его концентрации в образце и длины оптического пути образца. В математическом выражении полученная флуоресценция (F) определяется уравнением (4.16):

$$F = \sigma \cdot Q \cdot I, \quad (4.16)$$

где σ – сечение молекулярного поглощения, Q – квантовый выход, I – падающий световой поток. Принцип флуоресцентного микроскопа основан на разделении интенсивного возбужденного света от гораздо более слабого флуоресцентного света. В результате флуоресцентный свет может быть отображен с высокой контрастностью на детекторе.

На рисунке 4.14 приведена схематическая структура флуоресцентного микроскопа. Подходящими источниками света являются ксеноновые, ртутные и галогенные лампы, а также лазеры. Выбор источника света зависит от исследуемого образца.

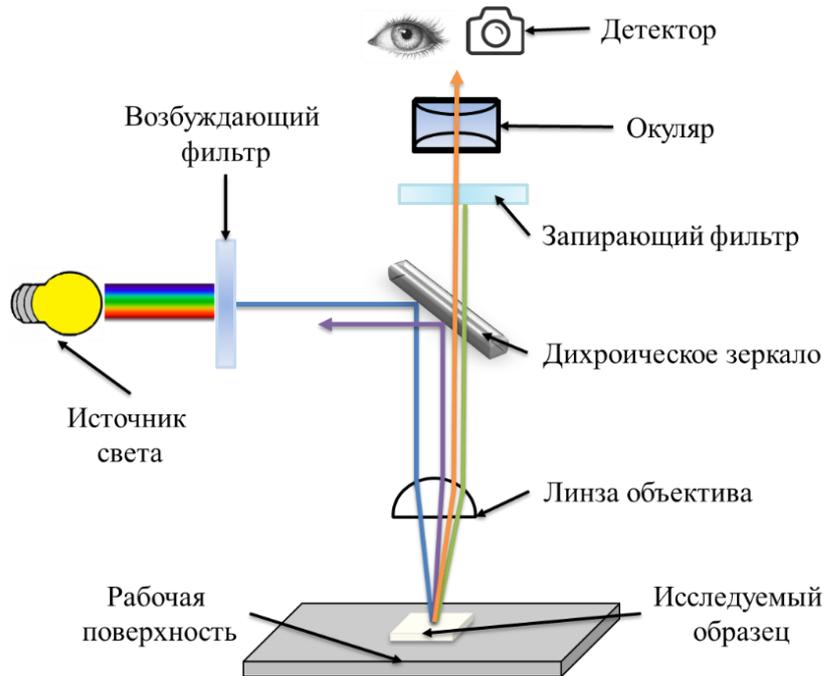


Рисунок 4.14 – Схематическая структура флуоресцентного микроскопа

Лазеры имеют преимущество монохроматический свет с высокими интенсивностями возбуждения, в то время как лампы излучают свет на широком участке спектра. Представленные в работе флуоресцентные микрофотографии были получены на микроскопе Zeiss Axiovert 40 CFL.

4.17 Инфракрасная спектроскопия

ИК-спектроскопия широко используется как в промышленности, так и в исследованиях. Это простой и надежный метод измерения, контроля качества и динамических измерений. ИК-спектроскопия представляет собой абсорбционно-спектроскопический аналитический метод, используемый для идентификации функциональных групп и структурной информации об органических веществах. Если молекулы облучаются ИК светом, они меняют свои

колебательные состояния после поглощения излучения. Наибольшее количество колебательных переходов в органических соединениях молекул происходит в диапазоне длин волн (λ) 2,5 – 25 мкм или в величинах обратных длине волны 4000 – 400 см^{-1} (волновое число $\nu = 1/\lambda$, см^{-1}) [162].
Области применений ИК-спектроскопии:

1. Определение функциональных группы и структуры. В области групповой частоты могут наблюдаться пики, соответствующие различным функциональным группам. В соответствии с соответствующими пиками можно определить функциональную группу.

2. Идентификация веществ. ИК-спектроскопия используется для определения того, совпадает ли данный образец органического вещества с другим или нет. Это связано с тем, что в ИК-спектрах органических молекул наблюдается большое количество полос поглощения, а вероятность того, что любые два соединения будут давать одинаковые спектры, почти равна нулю. Поэтому, если два соединения имеют одинаковые ИК-спектры, то оба они должны быть образцами тех же веществ.

3. Изучение хода реакции. Процесс химической реакции можно определить, анализируя небольшую часть реакционной смеси, отводимой время от времени. Наблюдается скорость исчезновения характерной полосы поглощения группы реагентов и / или скорости появления характерной полосы поглощения группы продуктов за счет образования продукта.

4. Обнаружение примесей. ИК-спектр тестируемого образца, который должен быть определен, сравнивают со стандартным соединением. Если в ИК-спектре наблюдаются какие-либо дополнительные пики, то это связано с примесями, присутствующими в соединении. 5. Количественный анализ. Количество вещества может быть определено либо в чистом виде, либо в виде смеси двух или более соединений. При этом выбирают характерный пик, соответствующий лекарственному веществу, и сравнивают $\log \frac{I_0}{I_t}$ пиков для стандартного и тестового образцов. Это называется методом базовой линии для определения количества вещества.

5. Результаты экспериментальных исследований

5.1 Оптимизация способа получения AgНЧ, морфологические свойства, особенности функционализации поверхности

Наночастицы серебра были синтезированы методом химического восстановления нитрата серебра глюкозой и цитратом натрия в присутствии стабилизатора ПВП или ПЭИ, подробное описание технологии синтеза наночастиц серебра представлено в главе 4.5.

5.1.1 Исследование заряда и размера наночастиц серебра

Основные характеристики синтезированных AgНЧ, такие как размер, форма, заряд и индекс полидисперсности КС наночастиц, были определены посредством методов СЭМ, АТН и ДРС, результаты исследований которых приведены в таблице 5.1, на рисунке 5.1, рисунке 5.2 и рисунке 5.3. Важные аспекты исследования связаны с продолжительностью и природой восстановителя в процессе синтеза AgНЧ.

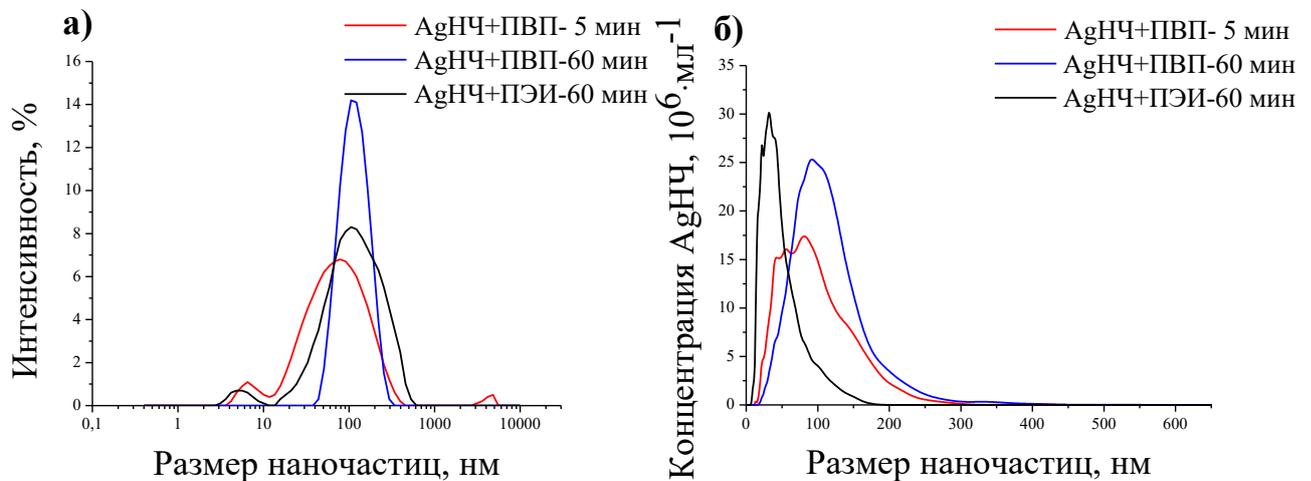


Рисунок 5.1 – Графики распределения серебряных наночастиц по размеру в зависимости от времени синтеза (5, 60 мин) и природы восстановителя (ПВП, ПЭИ): а) ДРС, б) АТН

Таблица.5.1. Основные характеристики AgНЧ

	Размер наночастиц, нм			ζ -потенциал, мВ	ИПД, отн. ед.
	СЭМ	АТН	ДРС		
ПВП (5 мин)	20±10	110±50	90±65	0,3±15,6	0,491±0,035
ПВП (60 мин)	70±10	120±30	110±45	-22,5±8,1	0,195±0,015
ПЭИ (60 мин)	40±20	130±50	115±70	+54,1±14,8	0,404±0,025

С целью формирования частиц разного размера синтез проводили при различном времени восстановления (5 и 60 мин) для частиц, стабилизированных с ПВП. В то время как полярность частиц определялась природой восстановителя. На рисунке 5.1 представлены результаты исследования гидродинамического размера AgНЧ, определенные методом АТН и ДРС, в зависимости от времени восстановления и природы восстановителя.

Увеличение времени синтеза AgНЧ, стабилизированных ПВП, от 5 до 60 минут приводит к увеличению гидродинамического диаметра AgНЧ от 90 до 110 нм, соответственно по данным ДРС и от 110 до 120 нм согласно результатам АТН. Данный факт также подтверждается результатами СЭМ, где с увеличением времени синтеза наночастиц происходит рост среднего диаметра серебряных наночастиц от 20 до 70 нм. На СЭМ изображениях, рисунок 5.2. (а, в, д), видно, что во всех трех случаях синтеза формируются преимущественно сферические наночастицы с размером порядка 20-70 нм. В литературе неоднократно упоминается, что наночастицы сферической формы широко используются в медицинской практике поскольку их синтез, является высоко воспроизводимым, а КС стабильной [163]. Также на рисунке 5.2 (б, г, е) приведены снимки метода АТН, где наблюдается типичная картина рассеяния лазерного излучения на отдельных наночастицах или их агломерированных группах. Светлые точки на тёмном фоне это отдельные наночастицы или их агломерированные группы с размером менее длины волны, которые ведут себя как рассеиватели. В случае синтеза в течении 5 минут с ПВП, часть частиц не попадает в дифракционный предел (менее 10 нм для AgНЧ) и не вызывает дифракции электромагнитных волн рисунок 5.2. (б). На рисунке 5.2 (г, е) насчитывается большее количество светящихся точек, а интенсивность их свечения также указывает на размер наночастиц, чем оно ярче, тем больше размер наночастиц или их агломерированных групп.

AgНЧ, синтезированные с ПВП в течение 60 мин, показывают характерное, равномерное распределение размера гидродинамического диаметра (рисунке 5.1, синяя линия). в то время как AgНЧ, синтезированные с ПВП и ПЭИ, в течение 5 и 60 мин, соответственно, имеют неравномерное распределение по размеру, наблюдается наличие двух и более пиков в разных областях размерного спектра, что в свою очередь указывает на формирование полидисперсного КР наночастиц в том числе из-за возможного наличия побочных продуктов синтеза таких как: нитраты, избыток глюкозы и продуктов ее окисления, избыток ПВП/ПЭИ и Ag^+ [10, 164], что также подтверждается высокими значениями ИПД (см. таблица 5.1).

Определение индекса полидисперсности методом ДРС позволяет получить информацию о качестве КС с точки зрения распределения частиц по размеру. Основываясь на литературных данных [165, 166], КС считается монодисперсной в случае узкого и равномерного распределения частиц по размеру, когда ИПД ниже критического значения 0,3.

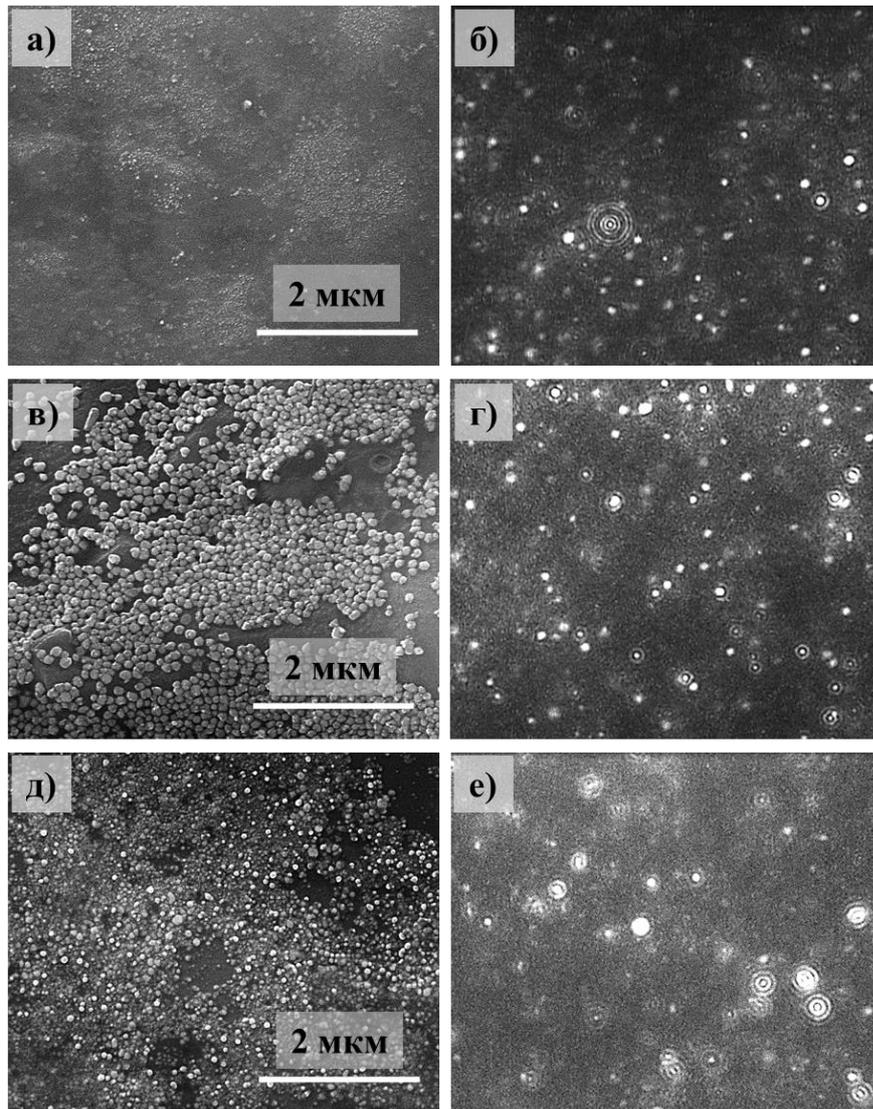


Рисунок 5.2 – Внешний вид AgНЧ, слева (а, в, д) представлены типичные изображения СЭМ, справа (б, г, е) показаны рассеивающие центры частиц в процессе АТН. а), б) AgНЧ+ПВП восстановление 5 мин, в), г) AgНЧ+ПВП восстановление 60 мин, д), е) AgНЧ+ПЭИ восстановление 60 мин

Из таблицы 5.1 следует, что AgНЧ, синтезированные с ПВП в течение 60 мин, имеют узкое распределение по размеру и среднее значение ИПД равное 0,195, таким образом представленную КС можно считать монодисперсной, что является благоприятным условием при формировании однородных и равномерных слоев AgНЧ на рабочей поверхности.

Заряд AgНЧ является не менее важным параметром чем их размер, поскольку имеет влияние на устойчивость КС, а также влияет на процесс функционализации поверхности и как следствие на свойства осажденного слоя, так, например, для метода ЭФО является важным использование устойчивой КС для сохранения электрофоретической подвижности в процессе формирования слоя AgНЧ на функционализируемой поверхности [167-169]. Результаты

исследования дзета-потенциала, методом ДРС представлены в таблице 5.1 и на рисунке 5.3. Графическое представление дзета-потенциала серебряных наночастиц, стабилизированных с ПВП и ПЭИ, рисунок 5.3, ясно показывает его равномерное распределение (синяя/красная линии) а также формирование отрицательно заряженных наночастиц синтезированных с ПВП в течение 60 мин и частиц, заряженных положительно, синтезированных с ПЭИ в течение 60 мин. Частицы стабилизированные с ПВП в течение 5 мин имеют неоднородное распределение заряда в положительной и отрицательной областях спектра.

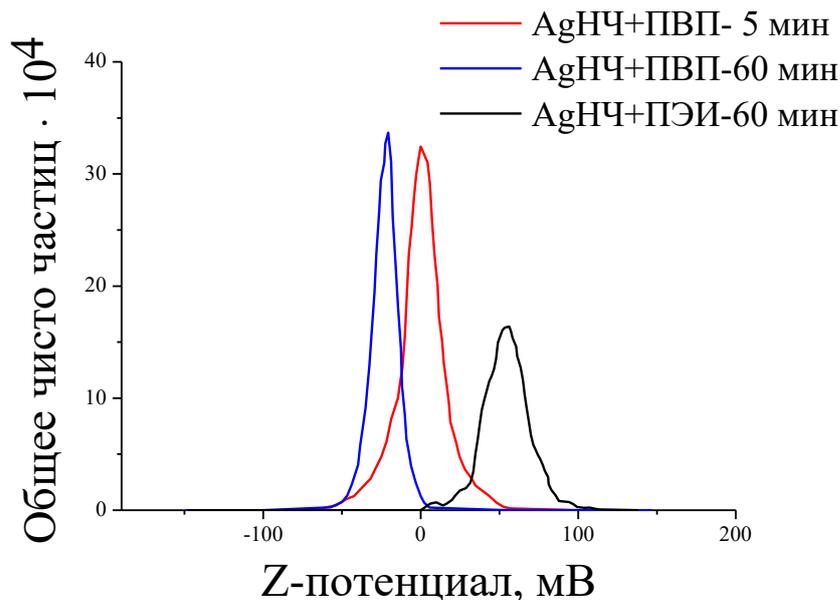


Рисунок 5.3 – График распределения дзета-потенциала AgНЧ, стабилизированных с ПВП и ПЭИ

Следует подчеркнуть, что частицы, стабилизированные с ПВП, синтезированные 60 мин, не имеют агломераций, тогда как частицы, синтезированные 5 мин, имеют агломерации и неоднородное распределение наночастиц по размеру, что негативно может влиять на процесс дальнейшей функционализации покрытия на основе гидроксиапатита, в частности изменение электрофоретической подвижности AgНЧ, а также равномерность осажденного слоя AgНЧ. Подобная ситуация наблюдается и с AgНЧ стабилизированными с ПЭИ, они также имеют значимые различия размерных параметров.

Также следует отметить, что несмотря на одинаковую функциональную работу ПЭИ и ПВП основанную на связывании ионов серебра в комплексы для их последующего восстановления глюкозой и модификации их поверхности объемными макромолекулами полимера для предотвращения агломерации наночастиц, отличия главным образом состоят в размере макромолекул, т.е. величине их молекулярной массы в форме макромолекул полимера

(ПВП – линейный полимер рисунок 4.6 (б), ПЭИ – широко разветвленный полимер рисунок 4.6 (в)) и их сродстве с растворителем, в котором проходит синтез. Из литературы известно, что ПВП обладает большим сродством к воде, чем ПЭИ который проявляет гидрофильные свойства, следовательно, макромолекулы ПВП в воде наиболее развернуты, что влияет на характер адсорбции полимера на поверхности наночастиц, т.е. наиболее однородно происходит покрытие их поверхности в выбранной методике синтеза, где в качестве растворителя используется вода [167,169].

Анализ представленных результатов, показал, что наиболее перспективными для дальнейшей работы по функционализации композита антибактериальными свойствами являются наночастицы, стабилизированные с ПВП в течение 60 мин, которые проявляют такие свойства как воспроизводимость заряда, размера AgНЧ в процессе синтеза, агрегативная, седиментационная устойчивость коллоидных растворов, а также антибактериальные свойства [12, 167], подробная методика функционализации рабочей поверхности представлена в главе 5.1.2. Дальнейшая работа с серебряными наночастицами, стабилизированными с ПВП в течение 5 мин, не проводилась, поскольку полученный КР имеет высокое значение ПДИ (0,491), также на рисунке 5.1 (а) выделяются три значимых пика распределения частиц по размеру, что в значительной мере может осложнить процесс функционализации рабочей поверхности.

5.1.2 Исследование характера размещения наночастиц серебра на поверхности титана и ГА покрытий

В процессе формирования функционального многослойного покрытия Ag-ГА композита необходимо провести выбор способа функционализации слоёв покрытий на основе гидроксиапатита наночастицами серебра. Для решения представленной задачи были изучены литературные данные [167-169], а также учтены нюансы практического применения и реализации технологии производства Ag-ГА композита, на основании которых были выбраны следующие наиболее энерго- и ресурсоэффективные методы и параметры функционализации поверхности:

1) Метод «сидячей капли». Наиболее простая и лёгкая в управлении параметрами методика, процесс которой заключается в формировании капли 120 мкл водного раствора на рабочей поверхности с концентрацией AgНЧ 60 мг/л и последующей сушкой при 55,5°C до полного высыхания. Параметры подбирались экспериментально исходя из особенностей растекания и скорости высыхания капли. Стоит отметить, что растекание капли зависит от природы КР, его концентрации, объема, и скорости высыхания капли.

2) Осаждение из водного раствора. Методика обусловлена осаждением наночастиц на поверхности экспериментального образца под действием коагуляции, потери седиментационной устойчивости и как следствие осаждения. Технология метода заключается в погружении образцов в 5 мл водного раствора наночастиц с концентрацией AgНЧ 60 мг/л и выдерживали без движения в течение 24 часов с последующей сушкой при 55,5°C до полного высыхания. Выбор времени обусловлен технологией создания Ag-ГА композита, таким образом увеличение времени выдержки будет влиять на длительность процесса создания Ag-ГА композита, а также на ГА покрытие, которое входит в состав композита и с течением времени может начать разрушаться.

3) Электрофоретическое осаждение из спиртовой или водной среды. Осаждение достигалось за счет движения заряженных AgНЧ, диспергированных в рабочем растворе, к электроду под приложенным электрическим полем в течении установленного времени с последующей сушкой образца при 55,5°C до полного высыхания, концентрация рабочего раствора также составляла 60 мг/л. В данной методике выбор параметров осаждения напрямую зависит от природы КР, его электропроводности, так в эксперименте с водным коллоидным раствором экспериментально определены следующие параметры: время осаждения 30 мин, напряжение 3 В, расстояние между анодом и катодом $1,5 \pm 0,5$ мм, тогда как в эксперименте с КР на основе этилового спирта, для отработки методики, время составляло 5 мин, напряжение 50 В, расстояние между анодом и катодом $1,5 \pm 0,5$ мм.

В первую очередь указанные методики были апробированы на чистых титановых подложках, результаты функционализации представлены на рисунке 5.4. В ходе отработки указанных ранее методик, концентрация рабочего раствора была одинаковой для всех методов получения слоя наночастиц. Подбирались такие параметры, которые позволяли бы получить монослой частиц, равномерно распределенных по поверхности без локальных скоплений. Из представленных результатов, СЭМ изображений, рисунок 5.4, видны преимущества методов сидячей капли и ЭФО из спиртовой среды. В случае использования наночастиц, восстановленных с ПВП и с ПЭИ в течении 60 мин в процессе метода ЭФО из спиртовой среды формируется равномерный слой наночастиц по всей поверхности без образования локального скопления наночастиц серебра, что и требовалось достичь, для дальнейшей функционализации ГА покрытия и создания Ag-ГА композита. При использовании AgНЧ, восстановленных с ПЭИ, в процессе функционализации титановой поверхности методом сидячей капли на рисунке 5.4 (г) можно заметить локальные области поверхности с высоким содержанием наночастиц, что в свою очередь указывает на влияние морфологии рабочей поверхности, на процесс высыхания капли и влияние поверхностного натяжения самой капли, что не позволяет равномерно заполнить рабочую поверхность AgНЧ.

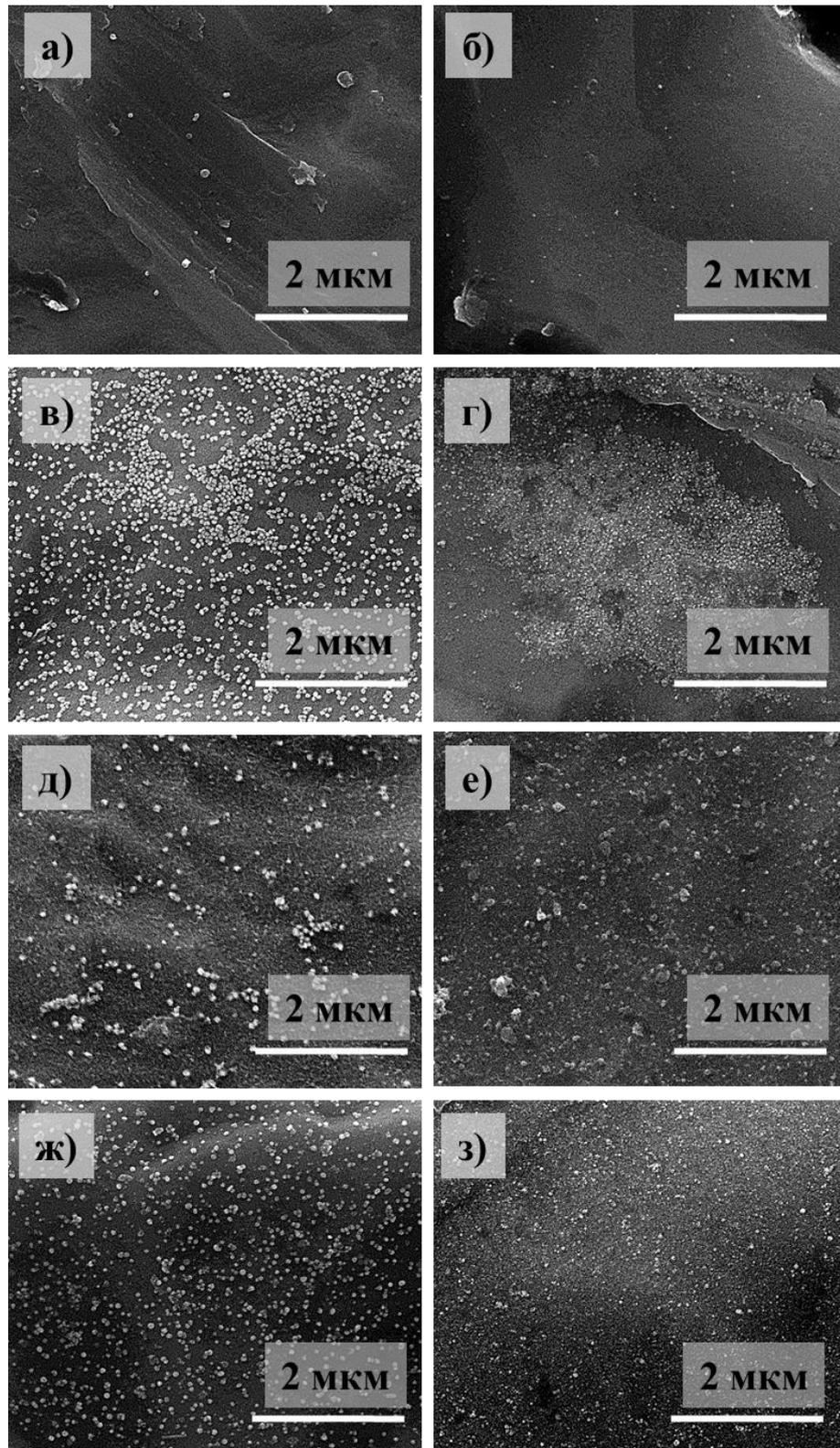


Рисунок 5.4 – Характер размещения серебряных наночастиц, стабилизированных с ПВП 60 мин (а, в, д, ж) и с ПЭИ 60 мин (б, г, е, з), на поверхности титановых образцов: а), б) осаждение из раствора (24 ч), в), г) метод сидячей капли (120 мкл), д), е) ЭФО из водного раствора ж), з) ЭФО из спиртового раствора, концентрация рабочего раствора во всех экспериментах составляла 60

мг/л

Метод сидячей капли имеет характерную особенность, связанную с силой поверхностного натяжения, которая приводит к тому, что образцы частично покрыты наночастицами, что, в случае практического применения исключает возможность формирования равномерного и однородного слоя наночастиц на поверхности имплантатов, имеющих развитый рельеф (пластиночные, винтовые, цилиндрические).

Основываясь на результатах СЭМ изображений, можно заметить, что методы осаждения из водной среды и ЭФО из водной среды являются непригодным для данной задачи по функционализации поверхности AgНЧ в силу минимального осаждения частиц на поверхности титана и наличия островковых агломераций AgНЧ, в случае ЭФО, что в дальнейшем не позволит достичь антибактериальной активности разрабатываемого композита из-за низкой концентрации антибактериального агента в структуре Ag-ГА композита [12, 163].

Как ранее отмечалось частицы, восстановленные с ПЭИ обладают высоким ИПД и неоднородным распределением наночастиц по размеру и заряду, что негативно влияет на формировании равномерного и однородного слоя наночастиц на функционализируемой поверхности. Анализ рисунка 5.4 (б, г, е, з) показал формирование слоя с частицами меньшего размера, по сравнению с ПВП, а также с меньшей площадью заполнения функционализируемой поверхности в случае использования метода ЭФО, в связи с чем дальнейшая работа по функционализации покрытия на основе ГА проводилась частицами, восстановленными в ПВП.

Исходя из анализа приведенных ранее результатов можно сделать заключение о том, что из представленных методик наибольшей перспективной обладает ЭФО из спиртовой среды (подробное исследование технологических возможностей метода ЭФО представлено в главе 5.1.3), которая была выбрана для нанесения частиц на поверхность кальций-фосфатных покрытий.

Результаты предварительного исследования по функционализации поверхности ГА покрытия AgНЧ методом ЭФО (время осаждения 5 мин, напряжение 50 В, концентрация рабочего раствора на основе этанола 60 мг/л, расстояние между анодом и катодом $1,5 \pm 0,5$ мм) представлены на рисунке 5.5.

СЭМ изображения, рисунок 5.5, позволяют наблюдать равномерное распределение AgНЧ по всей рабочей поверхности образца с незначительными островковыми включениями на поверхности ГА покрытия. Следует отметить, что морфология поверхности исходного ГА покрытия не изменялась в ходе процесса осаждения AgНЧ методом ЭФО (5 мин, 50 В), таким образом ГА покрытие остаётся стабильным, без видимых дефектов и сколов, рисунок 5.5 (в).

Анализ представленных экспериментальных данных, позволяет сделать вывод о том, что наибольший интерес представляет использование: 1) метода ЭФО в спиртовой среде, поскольку методика ЭФО позволяет формировать однородные, равномерные слои наночастиц без

разрушения покрытия на основе ГА; 2) AgНЧ восстановленных с ПВП в течении 60 мин имеющих низкое значение ИПД, стабильный заряд, однородное распределение по размеру. Следовательно, с целью функционализации поверхности покрытия на основе ГА, сформированного на титановой подложке, для придания антибактериальных свойств, создания многослойного и функционального композита для медицинского применения были выбраны: 1) методика ЭФО в спиртовой среде; 2) AgНЧ_{ПВП60 мин.}

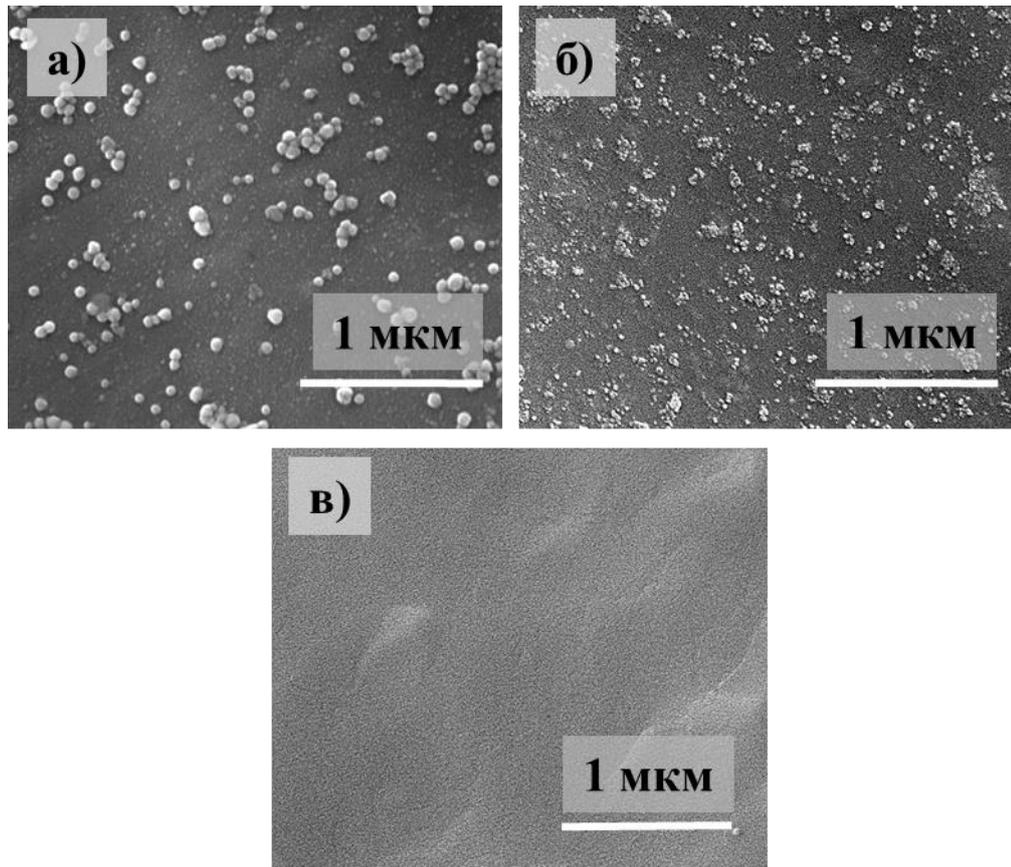


Рисунок 5.5. – Характер размещения серебряных наночастиц, стабилизированных с ПВП 60 мин (а) и с ПЭИ 60 мин (б), на поверхности образцов с ГА_{900±150 нм} покрытием, методом ЭФО (время осаждения 5 мин, напряжение 50 В, концентрация рабочего раствора на основе этанола 60 мг/л, расстояние между анодом и катодом 1,5±0,5 мм), СЭМ изображение поверхности ГА покрытия (в)

5.1.3 Технологические возможности метода ЭФО осаждения, влияние параметров ЭФО осаждения на характер распределения AgНЧ и их концентрацию.

Использование метода ЭФО для функционализации ГА покрытий открывает доступ к широкому спектру варьируемых параметров таких как: время осаждения, рабочее напряжение,

концентрация рабочего раствора, напряженность поля между анодом и катодом, природа электролита. Возможность варьировать параметры в широких пределах позволяет подобрать оптимальный режим для формирования слоя наночастиц с требуемой концентрацией на поверхности ГА покрытия. Оптимальный режим подбирается на основе пересечения технической и фундаментальных задач, учитывая влияние режимов осаждения наночастиц на равномерность распределения и заполнения рабочей поверхности, что как следствие имеет влияние на однородность композита, а также на антибактериальные свойства за счет равномерного высвобождения серебра из композита и биоактивности в следствии эффекта покрытия на основе ГА.

Результаты функционализации ГА покрытия, сформированного на титановой подложке, методом ЭФО в различных условиях представлены на рисунках 5.6–5.10, значения количества серебра были установлены посредством ААС. В ходе эксперимента были получены и представлены зависимости количества серебра, осажденного на рабочей поверхности, от напряжённости электрического поля между анодом и катодом (рисунок 5.6), времени осаждения AgНЧ (рисунок 5.7), концентрации рабочего раствора (рисунок 5.8). Варьируемые параметры изменялись относительно основного режима осаждения AgНЧ: время осаждения 30 мин, концентрация рабочего раствора 60 мг/л, рабочее напряжение 50 В, напряженность поля 25 ± 5 В/мм. Выбор основного режима основан на анализе литературных данных, требованиях предъявляемых для бмокомпозита (однородность, адгезионная прочность, биоактивность и антибактериальные свойства) и экспериментальных результатах.

В первую очередь было проведено исследование зависимости количества осажденного серебра на поверхности ГА покрытия от напряженности поля между анодом и катодом в процессе ЭФО, которая описывается формулой (5.1):

$$E = \frac{U}{d}, \quad (5.1)$$

где E – напряженность поля (В/м), U – напряжение (разность потенциалов) (В), d – расстояние между анодом и катодом (м).

Результаты исследования зависимости количества серебра на поверхности ГА покрытия от напряженности поля между анодом и катодом в процессе ЭФО при изменении рабочего напряжения от 50 до 80 В и расстояния между электродами от 0,5 до 3 мм, а также результаты ЭДРА, СЭМ и ААС исследований представлены на рисунке 5.6.

Так, с увеличением напряженности поля между анодом и катодом за счет роста напряжения от 50 до 80 В и сокращением расстояния между анодом и катодом от 3 до 0,5 мм в процессе ЭФО происходит равномерное увеличение количества серебра на поверхности ГА покрытия в среднем от 3 до 18 мкг/см², рисунка 3.6 (а). В среднем с увеличением напряженности

поля между анодом и катодом в процессе ЭФО от 17 до 100 В/мм AgНЧ формируют слой с площадью покрытия от 25% до 95%, соответственно, рисунок 5.6 (б).

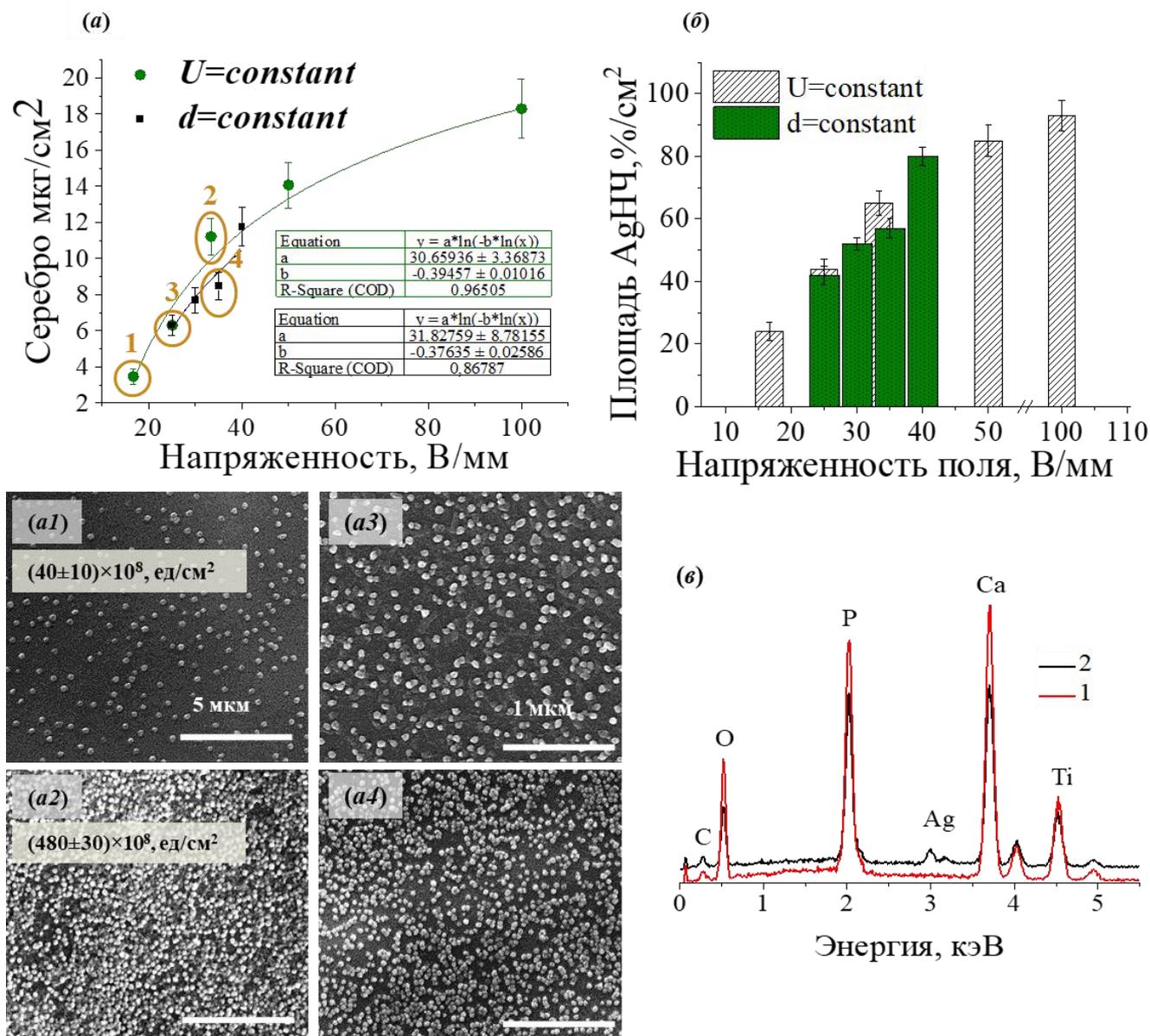


Рисунок 5.6 – Зависимость количества серебра на поверхности ГА покрытия от напряженности поля между анодом и катодом в процессе ЭФО. Результаты ААС (а), диаграммы распределения площади, занимаемой AgНЧ на поверхности ГА покрытия (б), СЭМ изображения функционализированных ГА покрытий (а1), (а2), (а3), (а4), ЭДРА-спектры ГА покрытий функционализированных AgНЧ в процессе ЭФО при постоянном расстоянии между электродами (в)

С увеличением напряженности поля между анодом и катодом от 17 до 100 В/мм за счет сокращения расстояния между электродами от 3 до 0,5 мм в процессе ЭФО, при постоянном значении напряженности поля, происходит равномерное увеличение количества серебра на

поверхности ГА покрытия в среднем от 3 до 18 мкг/см², рисунка 5.6 (а). СЭМ изображения в двух точках, соответствующих 17 и 100 В/мм, рисунок 5.6 (а1) и (а2) соответственно, наглядно демонстрируют численное увеличение AgНЧ в среднем от 40 до 480 ед/см², равномерное распределение частиц по поверхности и формирование однородного слоя AgНЧ, а также сокращение свободной площади ГА покрытия, которое связано с увеличением напряженности поля между анодом и катодом в процессе ЭФО за счет роста напряжения. В ходе ЭДРА экспериментальных образцов с различной напряжённостью поля между анодом и катодом при ЭФО AgНЧ, рисунок 5.6 (в), установлено, что доля серебра в покрытии, рассчитанная по трем значениям, зафиксированным в двух разных областях исследуемого образца, составляет 1,56 и 0,43 ат% при напряженности поля 100 и 17 В/мм, соответственно. Следует отметить, что результаты СЭМ и ААС находятся в корреляции с данными ЭДРА.

С увеличением напряженности поля между анодом и катодом от 25 до 40 В/мм за счет роста напряжения от 50 до 80 В в процессе ЭФО, при постоянном значении расстояния между электродами, происходит равномерное увеличение количества серебра в среднем от 6 до 12 мкг/см². СЭМ изображения в двух точках, соответствующих 25 и 35 В/мм, рисунок 5.6 (а3) и (а4) соответственно, наглядно демонстрируют сокращение свободной площади ГА покрытия, которое связано с увеличением рабочего напряжения в процессе ЭФО. В среднем с увеличением рабочего напряжения в процессе ЭФО от 50 до 80 В, происходит формирование слоя AgНЧ с площадью покрытия от 40% до 80%, соответственно. При этом наблюдается равномерное распределение частиц по поверхности, формируется однородный слой AgНЧ.

Из анализа представленных результатов следует, что причиной увеличения количества серебра на поверхности ГА покрытия является изменение напряженности поля, которое в свою очередь зависит как от рассеяния между анодом и катодом, так и от подаваемого рабочего напряжения. При этом, при постоянном напряжении, чем меньше расстояние между анодом и катодом, тем выше напряженность поля и, тем быстрее НЧ достигают поверхности образца. Здесь необходимо отметить, что варьирование расстояния между анодом и катодом при постоянном напряжении позволило в более широких пределах изменять концентрацию серебра. В случае, когда напряжение постоянно и равно 50 В, расстояние между электродами минимально и составляет 0,5 мм, напряженность поля принимает значение 100 В/мм, что позволяет достигать максимального значения концентрации AgНЧ равное 18 мкг/см².

Однако, следует учитывать граничные условия для варьируемых параметров поскольку, в водных КР увеличение рабочего напряжения приводит к формированию процесса электролиза, что может негативно сказаться на структуре и прочностных характеристиках покрытия на основе ГА, тогда как сокращение расстояния между анодом и катодом может привести к короткому замыканию.

Дальнейшее исследование было сконцентрировано на исследовании влияния времени процесса ЭФО на свойства осаждаемого слоя AgНЧ, рисунок 5.7.

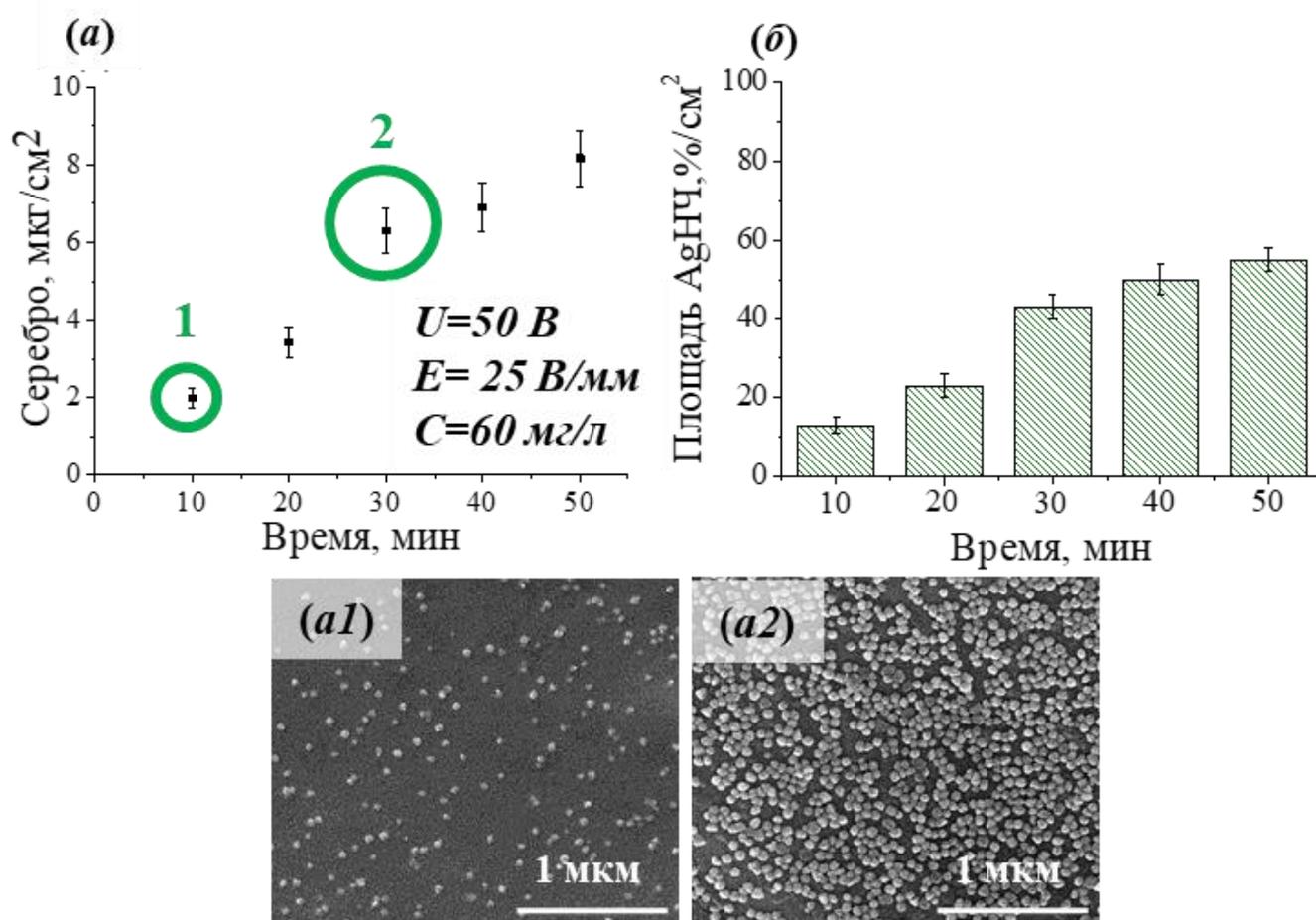


Рисунок 5.7 Зависимость количества серебра на поверхности ГА покрытия от времени ЭФО: результаты ААС (а), СЭМ изображения функционализированных ГА покрытий для времени 10 минут (а1) и 30 минут (а2), диаграммы распределения площади, занимаемой AgНЧ на поверхности ГА покрытия (б)

Анализ рисунка 5.7 позволяет заметить, что с увеличением времени осаждения происходит равномерное увеличение количества серебра на поверхности ГА покрытия в среднем от 2 до 8 мкг/см². СЭМ изображения в двух точках, соответствующих 10 и 30 минутам, рисунок 5.7 (а1) и (а2) соответственно, наглядно демонстрируют сокращение свободной площади ГА покрытия, которое связано с увеличением длительности процесса ЭФО. Также СЭМ изображения позволяют увидеть равномерное распределение частиц по поверхности и формирование однородного слоя AgНЧ. В среднем с увеличением времени ЭФО от 10 до 50 минут AgНЧ формируют слой с площадью покрытия от 15% до 55%, соответственно. Частицы располагаются рядом или на расстоянии друг от друга и формируют одномерный слой. Таким образом представленные результаты позволяют установить зависимость количество серебра на

поверхности ГА покрытия от времени ЭФО, следовательно, с увеличением времени процесса ЭФО происходит равномерный рост AgНЧ на поверхности образца.

Сравнивая зависимость изменения количества серебра от времени и рабочего напряжения рисунок 5.6 (а, $d=\text{constant}$) и рисунок 5.7 (а), соответственно, можно заметить, что значение в 8 мкг/см^2 достигается как за 50 минут при напряжении 50 В, так и за 30 минут при напряжении в 70 В. Таким образом повышение рабочего напряжения в процессе ЭФО приводит к росту скорости миграции и осаждения AgНЧ на рабочую поверхность ГА покрытия и как следствие к сокращению в первую очередь времени воздействия на поверхность ГА покрытия, а также оптимизации по времени технологии создания Ag-ГА композита. Представленные выше зависимости находят подтверждение в литературных данных [167].

Помимо возможностей аппаратного характера, которые были рассмотрены и представлены выше, важную роль играют коллоидные свойства рабочего раствора, во многом определяющие однородность осажденного слоя AgНЧ. Результаты исследования влияния свойств КР на свойства осажденного слоя AgНЧ приведены на рисунке 5.8.

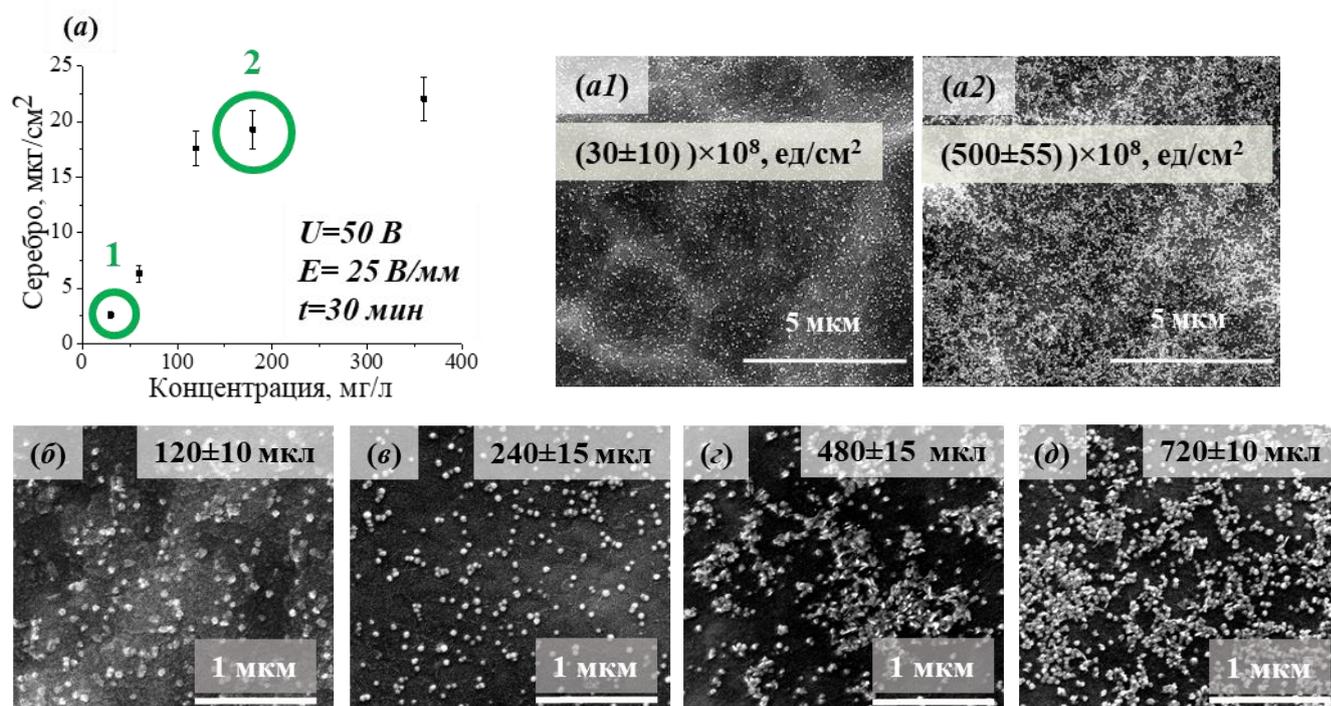


Рисунок 5.8 – Характер распределения AgНЧ по поверхности ГА покрытия, сформированного на титановой подложке, в процессе ЭФО, при изменении аликвоты водного КР AgНЧ: результаты ААС (а), СЭМ изображения функционализированных ГА покрытий, (а1), (а2), (б), (в), (г), (д). Характер распределения AgНЧ, при изменении аликвоты водного КР AgНЧ (б,в,г,д)

Анализ рисунка 5.8 показывает влияние изменения концентрации AgНЧ в рабочем растворе на количество серебра осажденного на поверхности ГА покрытия. Увеличение

аликвоты водного КР AgНЧ от 120 до 720 мкл приводит к изменению концентрации AgНЧ в электролите на основе этанола от 30 до 180 мг/л и увеличению количества серебра на поверхности ГА покрытия в процессе ЭФО в среднем от 2,5 до 22,5 мкг/см². СЭМ изображения в двух точках, соответствующих 30 и 480 мг/л, рисунок 5.8 (a1) и (a2) соответственно, наглядно демонстрируют сокращение свободной площади ГА покрытия. Также СЭМ изображения, рисунок 5.8 (б, в, г, д), позволяют увидеть изменение характера распределения AgНЧ по поверхности ГА покрытия, сформированного на титановой подложке, с равномерного на коагуляционный в процессе ЭФО и формирование островков частиц на поверхности ГА покрытия.

Увеличение концентрации рабочего раствора приводит к росту числа НЧ на поверхности ГА покрытия. Однако, изменение данного параметра со временем достигает предела, раствор становится насыщенным и дальнейшее увеличение концентрации AgНЧ не приведет к желаемому результату, напротив может приводить систему в нестабильное состояние и частицы начинают коагулировать и выпадать в осадок, также следует учитывать электрофоретическую подвижность, на которую влияет как концентрация НЧ, так и среда, в которой проводится ЭФО.

Поскольку на однородность осажденного слоя AgНЧ влияют коллоидные свойства суспензии следует принимать во внимание вязкость, диэлектрическую проницаемость и проводимость рабочего раствора, основные характеристики компонент рабочего КР приведены в таблице 5.2 [167, 169, 170].

Таблица.5.2. Основные характеристики компонент рабочего коллоидного раствора

Вещество	Свойства			
	Полярность	Вязкость, Па·с	Диэлектрическая проницаемость	Проводимость, мкСм/м
Вода	полярный	1,0	80,0	0,63
Этанол	слабо полярный	1,2	20,7	0,13

Для ЭФО процесса является важным влияние параметров рабочего раствора на процесс формирования слоя AgНЧ, одним из важных параметров является электрофоретическая подвижность, которая имеет состава рабочего раствора. Так на основании уравнения Смолуховского электрофоретическая подвижность определяется в среде этанола (уравнение 5.2) и водного раствора (уравнение 5.3).

$$\mu = \frac{\zeta \varepsilon_0 \varepsilon_r}{\eta}, \quad (5.2)$$

$$\mu = \frac{\zeta \varepsilon_0 \varepsilon_r}{1,5\eta}, \quad (5.3)$$

где μ – электрофоретическая подвижность рабочего раствора, ζ – дзета потенциал, ϵ_0 – диэлектрическая постоянная вакуума, ϵ_r – диэлектрическая проницаемость рабочего раствора, η – вязкость рабочего раствора.

Следовательно, с увеличением аликвоты водного раствора в электролите на основе этанола происходит перераспределение основных параметров, возрастает диэлектрическая проницаемость раствора, а также его проводимость, возрастает электрофоретическая подвижность в 3 раза и, как следствие, происходит изменение характера распределения наночастиц по поверхности ГА покрытия с равномерного на коагуляционный, характер распределения AgНЧ по поверхности ГА покрытия, сформированного на титановой подложке, в процессе ЭФО, представлено на рисунке 3.9. Характер распределения AgНЧ по поверхности ГА покрытия в зависимости от природы электролита приведен на рисунке 5.9.

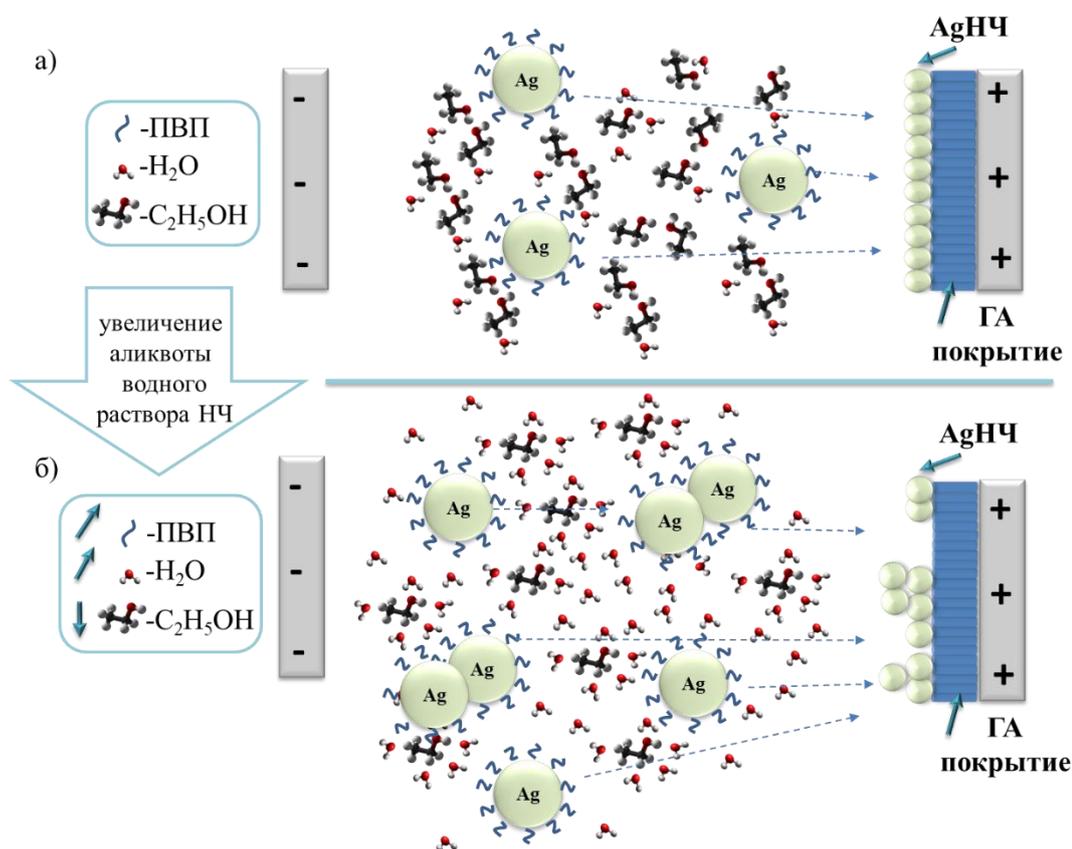


Рисунок 5.9 – Схематическое представление распределения AgНЧ по поверхности ГА покрытия, сформированного на титановой подложке, в процессе ЭФО: а) в растворе на основе этанола, б) в растворе на основе этанола и воды

На рисунке 5.9 (а) частицы в среде этанола мигрируют к аноду и равномерно распределяются по развитой поверхности образца, формируя одномерную систему AgНЧ. На

рисунке 5.10 (б) частицы в среде этанола и воды мигрируют к аноду и как ранее уже отмечалось увеличение количества аликвоты водного рабочего раствора приводит к увеличению их электрофоретической мобильности и концентрации AgНЧ , в это становится нестабильным и коагулирует частицы слабо связаны друг с другом что характерно для флокулированного состояния частиц.

Показано, что наибольшая степень заполнения поверхности подложек наночастицами достигается при увеличении концентрации и аликвоты водной составляющей рабочего раствора, то есть при проведении сорбции в условиях нарушенной агрегативной устойчивости рабочего раствора.

Следовательно, анализ экспериментальных результатов методики функционализации ГА покрытий, сформированных на поверхности титановых образцов, методом ЭФО показал перспективу использования высокой напряженности между анодом и катодом, а также высокого напряжения, что являются наиболее эффективным режимом для формирования монослоя наночастиц серебра на поверхности ГА покрытия.

5.2 ГА покрытие

Подробная технология и режимы формирования ГА покрытия методом ВЧ-магнетронного распыления представлены в главе 4.4.

5.2.1 Исследование толщины и оптических констант ГА покрытий

Процесс напыления покрытий осуществлялся следующим образом: вначале рабочий объем вакуумной камеры откачивался до предельного давления 10^{-6} мм.рт.ст., затем осуществлялась подача рабочего газа (аргон). Для формирования покрытий использовалось две модели: 1) статическая и 2) динамическая, где в процессе напыления происходило качание и вращение системы подложкодержателей. Расположение образцов на подложке в процессе напыления «в зоне эрозии» (Зона В) и «вне зоны эрозии» мишени (Зона А) представлены на рисунке 4.3.

Исследование состава, микроструктуры, скорости роста, отношения Ca/P и морфологии ГА покрытий проводилось методами СЭМ, ЭДРА, РФА, ИК-спектроскопии и спектральной эллипсометрии.

Эллипсометрические измерения проводились при фиксированном угле падения светового луча 70° в диапазоне длин волн $\lambda = (250 - 1000)$ нм. Для расчета показателя преломления использовалась однослойная модель, подразумевающая однородный диэлектрический слой, с

постоянным по толщине комплексным показателем преломления. Измеренные эллипсометрические параметры, ψ -амплитудный и Δ -фазосдвигающий, использовались для расчетов толщины и показателя преломления исследуемого ГА покрытия [148].

Эллипсометрические исследования ГА покрытий, сформированных методом ВЧ-магнетронного напыления в течение 480 минут на подложку кремния, позволили выявить влияние геометрии расположения образцов на эллипсометрические параметры: толщину и оптические константы при статическом процессе распыления материала мишени. Результаты исследований представлены на рисунке 5.10 и рисунке 5.11.

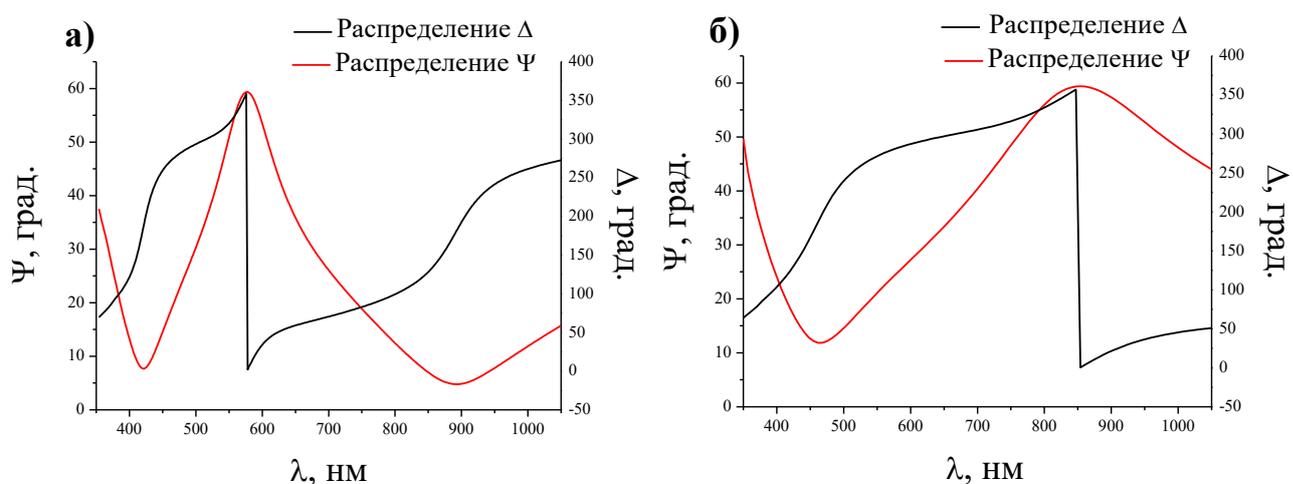


Рисунок 5.10 – Спектры эллипсометрических параметров для системы «ГА покрытие на кремнии», сформированного при статическом методе ВЧ-магнетронного распыления в течении 480 мин, а) зона А, б) зона В

При переходе из зоны А в зону В происходит изменение амплитудного ψ и фазосдвигающего Δ эллипсометрических параметров. Вследствие изменения толщины и структуры исследуемых ГА покрытий относительно геометрии расположения образцов в процессе напыления, в распределении оптических параметров происходит увеличение количества пиков с ростом толщины покрытий в интервале длин волн 350-1050 нм и рост значений показателя преломления с увеличением значений углов эллипсометрических спектров. Подобные модификации эллипсометрических спектров характерны для структурных или химических превращений в тонких пленках [171].

Из анализа экспериментальных результатов, статической модели осаждения ГА покрытия, представленных на рисунке 5.11 и описанных выше эллипсометрических спектров, рисунок 5.10, прослеживается слабая зависимость показателя преломления и толщины исследуемых ГА покрытий от области расположения образцов на подложке относительно зоны эрозии мишени. Средняя толщина покрытия в зоне В составляет 550 ± 150 нм и 790 ± 90 нм – в зоне А. Такое

распределение толщины между зонами соответствует наложению потоков материала в зоне А (в области центра подложкодержателя), что связано с процессом переноса вещества на подложку, при ионной бомбардировке по нормали к поверхности аморфных и поликристаллических мишеней пространственное распределение распыленных частиц подчиняется закону косинуса (5.4):

$$J(\theta) = J(0)\cos\theta \quad (5.4)$$

где $J(\theta)$ – интенсивность потока распыленных частиц, $J(0)$ – интенсивность потока распыленных частиц в направлении нормали к поверхности, θ - угол вылета частиц, отсчитываемый от нормали к поверхности [172].

Измеренные значения ψ и Δ были использованы для автоматического расчета показателя преломления (n) в программном пакете Spectr по формуле Коши:

$$n = A + B/\lambda^2 + C/\lambda^4, \quad (5.5)$$

где значения коэффициентов A , B , C – экспериментально полученные постоянные, определенные по стационарной диэлектрической функции Коши, которая позволяет рассчитать показатели преломления для определенной длины волны [148, 173]. В свою очередь показатель преломления принимает следующие средние значения в зоне А $1,69\pm 0,23$ и в зоне В $1,65\pm 0,21$, для длины волны $\lambda=632,8$ нм.

Для минимизации распределения толщины и структурных параметров покрытий в рабочей установке была усовершенствована система фиксации образцов в процессе напыления, а именно, разработана система вращения подложкодержателя и независимого качания, схематическое представление движения образца представлено на рисунке 3.11

Анализ экспериментальных результатов спектральной эллипсометрии представленных на рисунке 5.11 для динамической модели осаждения ГА покрытия показал, что средняя толщина покрытия в зоне В составляет 850 ± 150 нм и 540 ± 120 нм – в зоне А. Показатель преломления для обеих зон А и В равен $1,68\pm 0,04$, для длины волны $\lambda=632,8$ нм. Следовательно, как и ранее в случае статической модели осаждения покрытия, зависимость толщины исследуемых ГА покрытий от области расположения образцов на подложке относительно зоны эрозии мишени остается неизменной в следствии специфики процесса ВЧ-магнетронного распыления и малого радиуса движения-качения. В работе Ивановой А.А. [136] показано, что предложенная в настоящей работе система вращения и качения не в полной мере позволяет менять положение образцов относительно зоны эрозии.

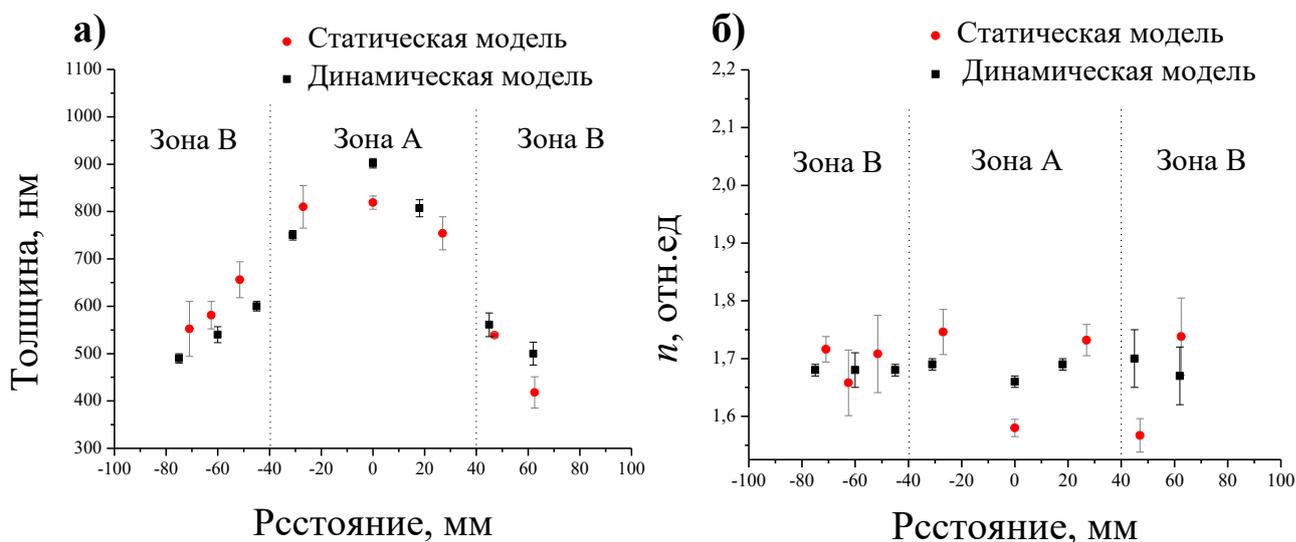


Рисунок 5.11 – Распределение а) толщины и б) показателя преломления ГА покрытия, сформированного при статическом/динамическом модели ВЧ-магнетронного осаждения в течении 480 мин на Si подложке, относительно геометрии расположения образцов, где значения в нуле соответствует центру подложки

В свою очередь установлено, что в отличие от статической модели ВЧ-магнетронного распыления динамическая модель позволяет формировать однородные по оптическим параметрам, а следовательно, и структурным свойствам ГА покрытия, поскольку при переходе от зоны А к зоне В не наблюдается значимых отклонений показателя преломления.

В работе Сурменевой М.А. [82] было показано, что изменение показателя преломления (n) Si-ГА покрытий свидетельствует о качественном изменении структуры покрытий. В частности, было установлено, что для покрытия высокодисперсной аморфно-нанокристаллической структуры характерны повышенные значения n в сравнении с исходным ГА. Основываясь на результатах работы [174], следует, что постоянное значение показателя преломления при изменении толщины покрытия свидетельствует о сохранении его структуры. Изменение показателя преломления свидетельствует о формировании новой структуры покрытия. Основываясь на литературных данных, n апатитов составляет $n_e = 1,633 - 1,653$, $n_o = 1,629 - 1,658$, $n_e - n_o = 0,003 - 0,005$, у ГА – до 0,007, где n_e – необыкновенный показатель преломления, n_o – обыкновенный показатель преломления [175]. Известно, что показатель преломления покрытий зависит от таких параметров, как химическая связь в материале (показатель преломления возрастает с увеличением атомного веса элемента), кристаллическая структура, размером зерен а также плотность покрытия [176]. Так, например, в соединениях с преимущественно ионными связями показатель преломления ниже, чем у соединений с ковалентной связью. Результаты эллипсометрических измерений показали, что покрытия на основе ГА, сформированные в условиях проведенных экспериментов (см таблицу 4.1), имеют показатель преломления в

интервале 1,65 – 1,69. Отличие полученных значений показателя преломления от значений, соответствующих исходному ГА, может указывать на степень дефектности ГА покрытий, которая вызывает возникновение оптической неоднородности [82].

5.2.2. Исследование морфологии и структуры ГА покрытий

Исследование фазового состава и структуры ГА покрытий, проводилось методом рентгеновской дифракции, полученные экспериментальные данные представлены на рисунке 5.12. Геометрия расположения образцов в процессе ВЧМР приведена на рисунке 4.3.

На рисунке 5.12 приведены дифракционные спектры, которые иллюстрируют формирование, характерных для ГА, рефлексов. Из работы Сурменева Р.А. [8] следует, что наличие рефлексов при углах $25,9^\circ$ (002), $31,8^\circ$ (211), $32,9^\circ$ (300), $53,1^\circ$ (004) характерно для кристаллического ГА. Установлено, что средний размер ОКР составляет 27 ± 2 нм для покрытий, сформированных в зоне В, и 21 ± 2 нм – в зоне А

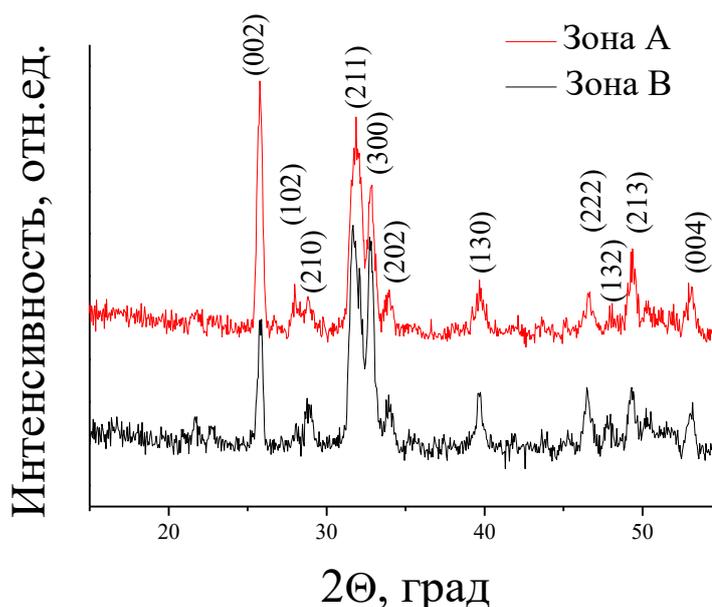


Рисунок 5.12 – Рентгенограммы ГА покрытий, сформированных на кремниевой подложке при статической модели ВЧ-магнетронного распыления в течение 480 минут, при различной геометрии расположения образцов

Дальнейшее исследование ГА покрытий заключалось в установлении химических связей и рассмотрении ИК-спектров поглощения, экспериментальные результаты которых представлены на рисунке 5.13. На основании результатов работ [82,177,178], фиксируемые на спектрах полосы связаны с различными физическими типами колебаний компонент ГА

(ортофосфатных групп PO_4^{3-} , OH^- -групп). На рисунке 5.13 можно заметить изменение четырех основных полос ИК-поглощения: $564, 604 \text{ см}^{-1}$ – трижды вырожденное деформационное колебание ν_4 O-P-O в PO_4^{3-} , 960 см^{-1} – полностью симметричное валентное колебание P-O в PO_4^{3-} , 1081 см^{-1} – асимметричное валентное колебание P-O в PO_4^{3-} [179]. По результатам ИК-спектроскопии, видно, что геометрия расположения образцов влияет на изменение интенсивности полос поглощения групп фосфатов. Не обнаружено значительное уширение полос поглощения и уменьшение их интенсивности, что в свою очередь позволяет сделать вывод о формировании однородной кристаллической структуры в зоне А и В, что подтверждается результатами РФА.

Как показано в работах [177, 180] изменения степени кристалличности приводят к изменению значения параметра инфракрасного расщепления (IRSF-IR splitting factor, $\text{IRSF} = I(564 \text{ см}^{-1}) + I(604 \text{ см}^{-1}) / I(584 \text{ см}^{-1})$). С использованием параметра IRSF на качественном уровне была установлена степень кристалличности ГА покрытий относительно расположения образцов в зоне (Зона В)/вне зоны (Зона А) эрозии мишени, которая составляет в зоне А $2,20 \pm 0,02$ и $2,35 \pm 0,04$ в зоне В. Согласно IRSF, степень кристалличности исследуемых образцов варьируется от 2,20 до 2,35, в то время как для зубной ткани этот параметр выше и находится в интервале от 2,88 до 3,51 [177].

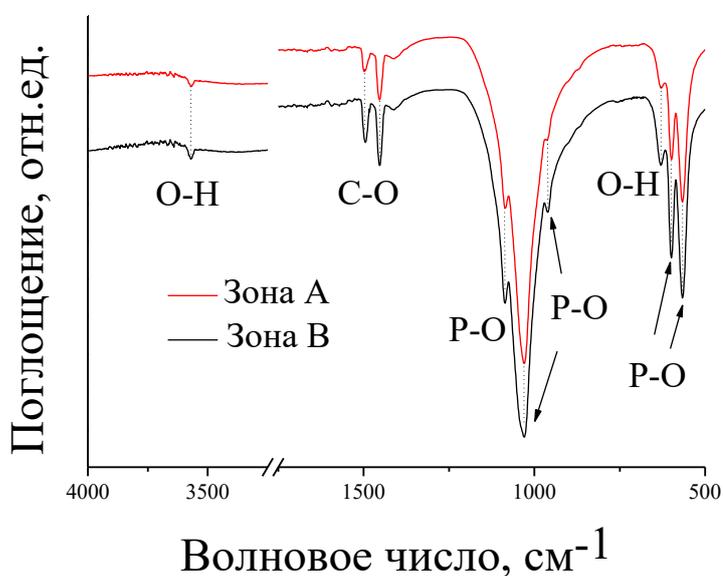


Рисунок 5.13 – ИК-спектры поглощения ГА покрытий, сформированных при статической модели ВЧ-магнетронного распыления в течение 480 минут, полученных все зоны эрозии (Зона А) и в зоне эрозии (Зона В) мишени

Структура и морфология ГА покрытий, сформированных ВЧ-магнетронным распылением на кремниевой подложке в течение 480 мин, представлена на рисунке 5.14.

Морфологические исследования свидетельствуют о формировании плотного покрытия, не имеющего трещин и других видимых дефектов. На СЭМ изображениях поперечного скола покрытия на кремнии можно наблюдать формирование столбчатой структуры ГА покрытия на образцах, находящийся в зоне А и В в процессе ВЧ-магнетронного распыления [82].

Для создания Ag-ГА композита с покрытием, сформированным ВЧ-магнетронным распылением мишени, приготовленной из механосинтезированного чистого ГА и его функционализации антибактериальным агентом необходимо провести ряд действий. Для формирования антибактериального слоя наночастиц произведен предварительный отжиг покрытия при температуре 600°C в течение 3 часов. Отжиг был использован для увеличения степени кристалличности покрытия, что позволяет снизить скорость резорбции в водных и спиртовых растворах.

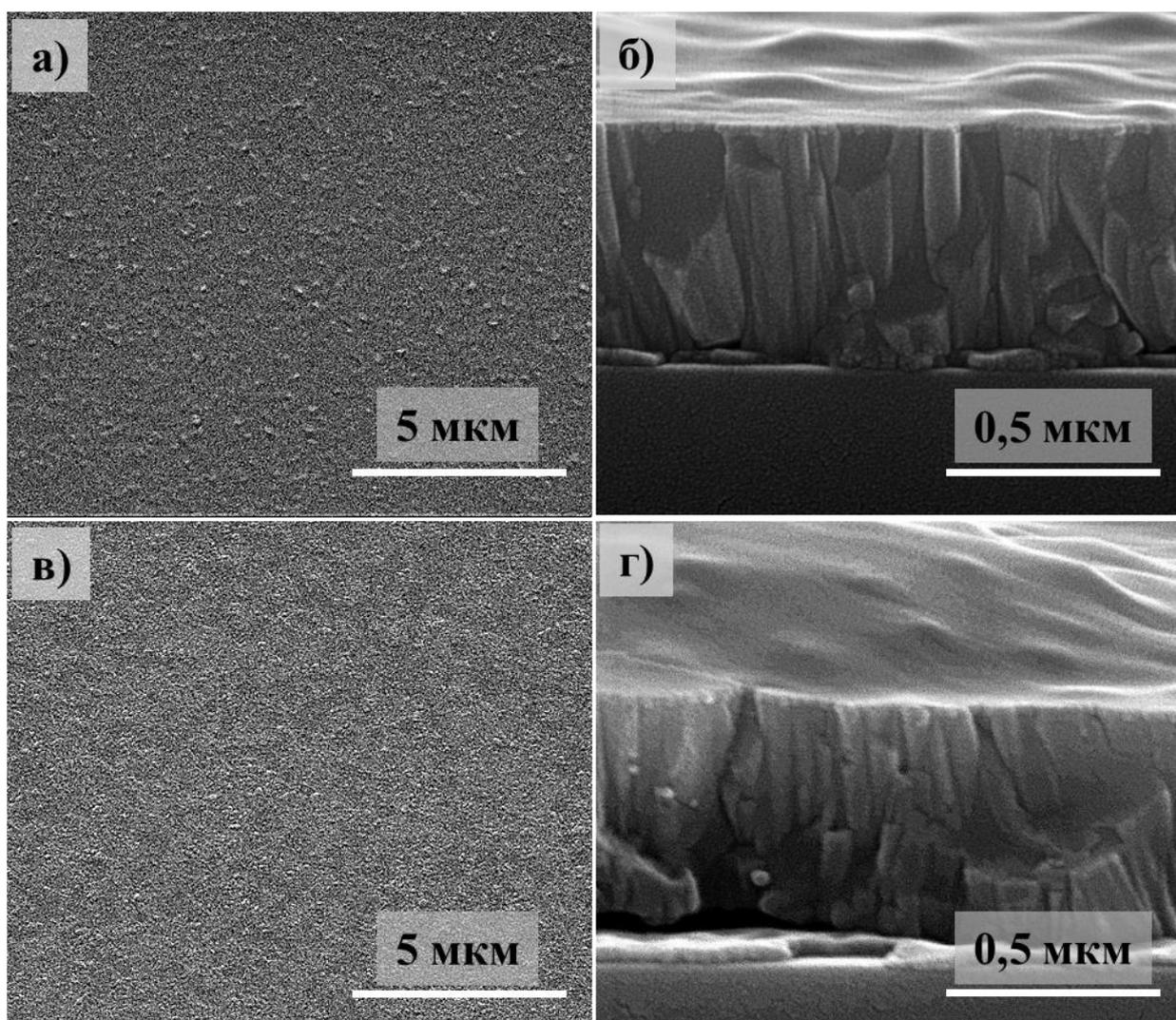


Рисунок 5.14 – СЭМ-изображения морфологии а), в) и поперечных сколов б), г) ГА покрытий, сформированных на кремниевой подложке в течение 480 мин методом ВЧ-магнетронного напыления при отсутствии вращения и качания подложкодержателя

В многочисленных исследованиях сообщалось о влиянии кристаллических и аморфных кальций-фосфатных покрытий, полученных различными методами на адгезию, пролиферацию и рост клеток, костной ткани. Так, ГА покрытия с кристаллической структурой обладают более низкой скоростью растворения, в то время как, скорость растворения и высвобождения ионов кальция из структуры аморфных ГА покрытий намного выше [181-188]. Размещение наночастиц серебра проводилось на поверхности покрытия, подвергнутого термическому отжигу. На поверхность покрытия размещались наночастицы серебра методом ЭФО в выбранных ранее условиях: из спиртовой среды при постоянной мощности 50 В и времени осаждения 30 минут, с расстоянием между анодом и катодом $1,5 \pm 0,5$ мм, концентрация рабочего раствора 60 мг/л.

Морфология ГА покрытий до и после отжига представлены на рисунке 5.15.

Результаты СЭМ (рисунок 5.15 а-г) показали плотные, без видимых трещин и пор покрытия. Наблюдается наличие неровностей поверхности ГА покрытия до отжига. После отжига не наблюдается наличие трещин и дефектов, однако можно заметить наличие неправильной формы островков, равномерно распределенных по всей поверхности покрытия. Таким образом, при отжиге покрытие остается стабильным.

На рентгенограммах, рисунок 5.15 (д), покрытий до и после отжига, сформированных при вращении и качании подложек в процессе напыления, в области углов 2θ , равных $31-33^\circ$, наблюдаются интенсивные, четко разрешенные дифракционные максимумы, что указывает на формирование выраженной кристаллической структуры ГА покрытий.

Анализ стехиометрии ГА покрытий методом энергодисперсионного рентгеновского анализа позволил установить, что в зоне В отношение Са/Р принимает значения от 1,52 до 1,6, в зоне А – от 1,69 до 2,13, в то время как для стехиометрического ГА отношение Са/Р имеет значение 1,67. Нарушение стехиометрии может возникнуть вследствие различия скоростей адсорбции-десорбции атомов кальция и фосфоросодержащих групп на подложку [9].

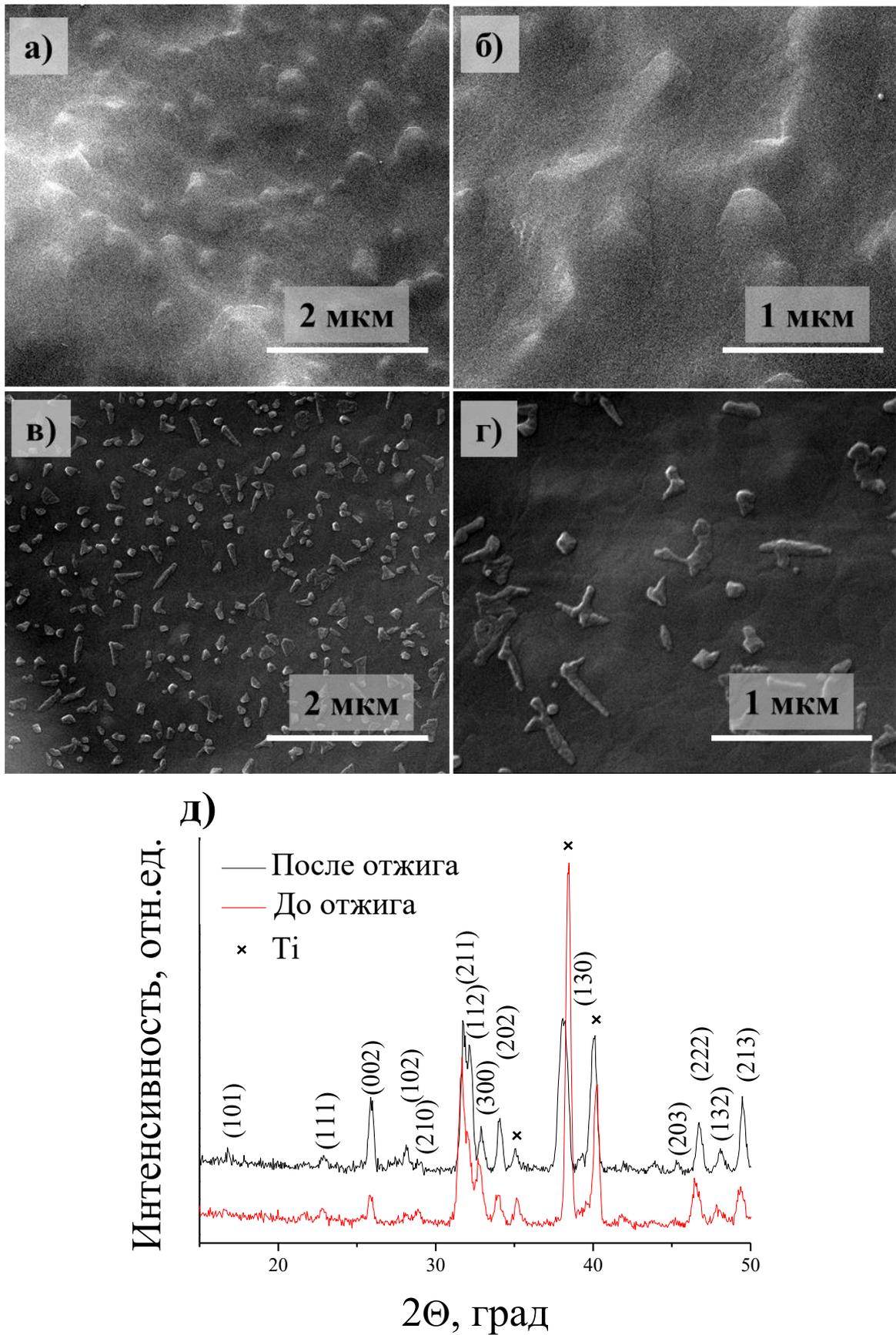


Рисунок 5.15 – Морфология ГА покрытий, сформированных при динамическом методе ВЧ-магнетронного распыления в течение 480 мин на Ti подложке а), б) до отжига, в), г) после отжига при температуре 600 °С в течение 3 часов, д) рентгенограммы ГА покрытий

5.3 Ag-ГА биокompозит

5.3.1 Структура и свойства Ag-ГА биокompозита

Структурные и морфологические особенности сформированного Ag-ГА биокompозита исследовались как методом сканирующей электронной микроскопии, так и рентгенофазовым анализом.

Процесс формирования трёхслойного Ag-ГА биокompозита заключался в следующем. В первую очередь была проведена пробоподготовка экспериментальных образцов, которая заключалась в химическом травлении титановых пластин (10×10 мм) и последующей промывке, затем проводилось формирование первого слоя $\text{ГА}_{850\pm 150\text{нм}}$ покрытия с использованием динамической модели ВЧ-магнетронного распыления в течение 480 мин, с последующей термической обработкой (3 часа при 600 °С, нагрев 5°/мин). Вторым слоем Ag-ГА биокompозита формировался методом ЭФО серебряных наночастиц, стабилизированных с ПВП_{60 мин} (рабочий режим: время осаждения 30 мин, рабочее напряжение 50 В, концентрация рабочего раствора 60 мг/л, расстояние между анодом и катодом 1,5±0,5 мм, среда на основе этанола). Третий – верхний слой ГА покрытия на поверхности плотного слоя наночастиц был сформирован посредством динамической модели метода ВЧ-магнетронного распыления в течение 480/180 мин.

Подложки на основе кремния использовались в качестве модельных, поскольку основные пики серебра и титана расположены очень близко, $2\theta^\circ$ равно 38,12 и 38,42 для серебра и титана, соответственно. На рисунке 5.16 (а) приведены рентгенограммы ГА покрытий, подвергнутых термической обработке, сформированных на кремниевой подложке с использованием динамической модели ВЧ-магнетронного распыления в течение 480 минут, а также ГА покрытий функционализированных наночастицами серебра посредством метода ЭФО.

Сравнительный анализ двух дифракционных спектров показал наличие четырёх основных рефлексов серебра при углах $2\theta^\circ$ равных 38,12; 44,28; 64,43 и 77,48, с которыми можно соотнести кристаллографические плоскости (111), (200), (220) и (311), соответственно, также результаты ЭДРА подтверждают наличие серебра в двуслойной структуре ($\text{Ti/ГА}_{850\pm 150\text{нм}}/\text{AgНЧ}_{\text{ПВП60мин}}$). Представленные рефлексы указывают на формирование гранцентрированной кубической решетки металлической структуры наночастиц серебра. В тоже время, приведенные дифракционные спектры иллюстрируют формирование интенсивных рефлексов характерных для ГА. Наличие интенсивных максимумов при углах $2\theta^\circ$ равных 25,88 (002), 31,74 (211), 32,12 (112), 32,87 (300), 53,20 (004) характерно для гексагональной кристаллической структуры ГА.

Результаты энергодисперсионного рентгеновского анализа, рисунок 5.16 (б), так же показали наличие пиков серебра (Ag) при энергиях порядка 3 кэВ, кальция (Ca) в интервале энергий 3,5-4,3 кэВ и фосфора (P) при энергиях порядка 2 кэВ, для двуслойной системы, ГА слоя функционализированного наночастицами серебра.

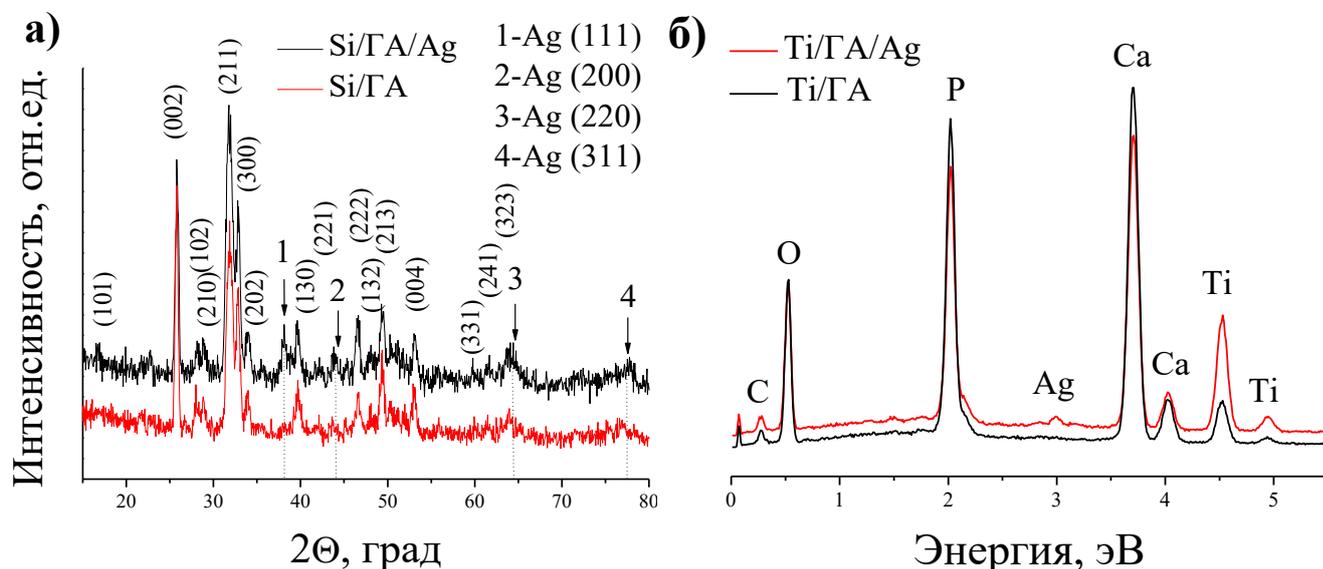


Рисунок. 5.16 –а) Рентгенограммы исследуемых структур, сформированных на кремниевой подложке, б) ЭДРА спектры исследуемых структур, сформированных на титановой подложке.

Исследовались однослойная, ГА_{850±150нм} и двуслойная структура на основе ГА_{850±150нм}, функционализированного AgНЧ методом ЭФО в рабочем режиме. Во всех системах покрытия были подвергнуты термической обработке (600 °С, 3 часа)

На рисунке 5.17 представлены микрофотографии СЭМ в режим дифракции обратного рассеяния электронов, которые представляют поперечное сечение трехслойной системы Ag-ГА биокompозита, сформированного на кремниевой (рисунок 5.17 а, б) и титановой (рисунок 5.17 в, г) подложке.

В данном режиме тяжелые элементы, такие как серебро или титан, приводят к более сильному обратному рассеянию электронов, чем более легкие элементы и, как следствие, ярче отображаются на микрофотографиях. Представленные результаты СЭМ изображений, подтвердили формирование многослойной структуры, наночастицы серебра отчетливо видны между слоями ГА покрытия.

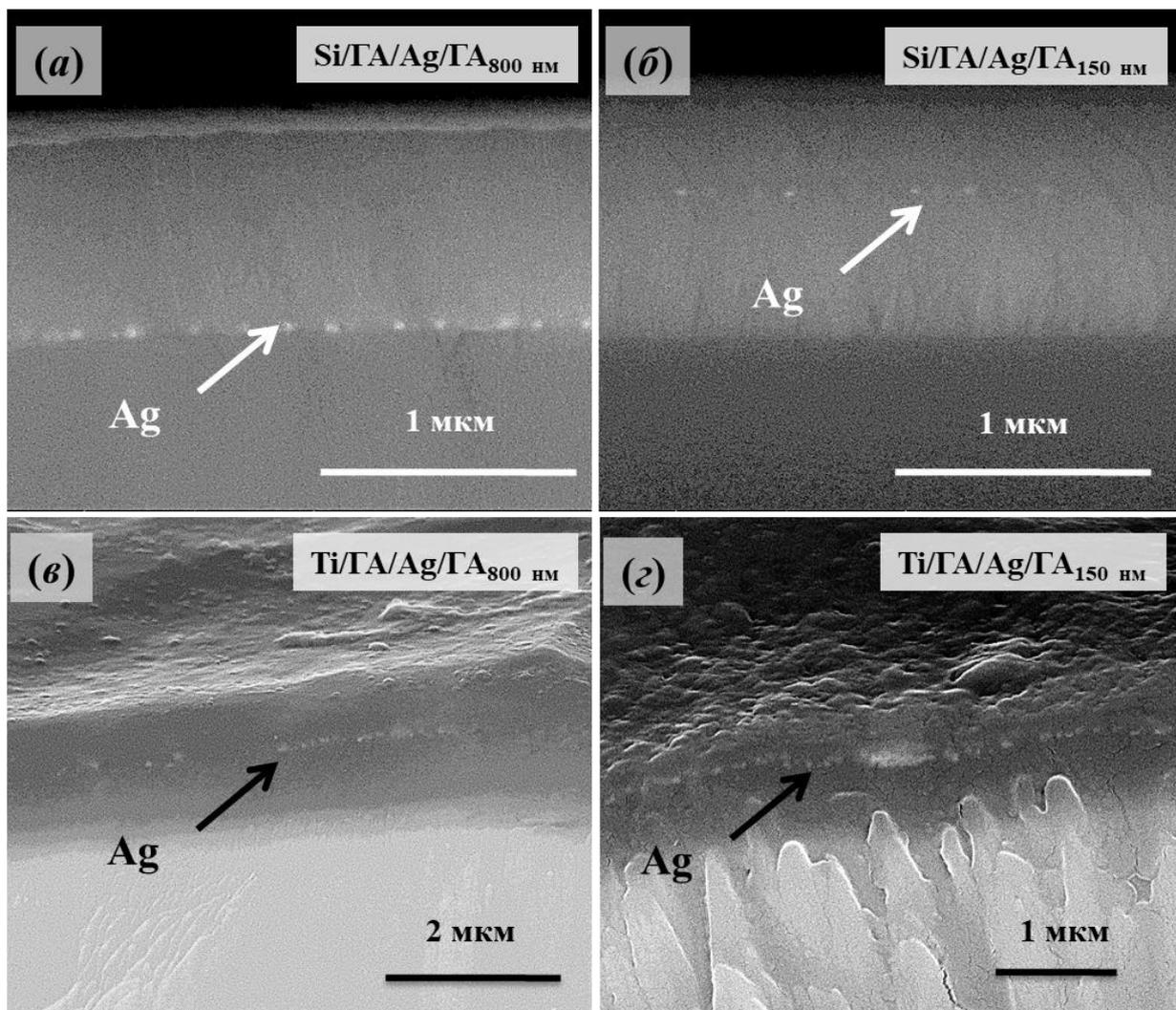


Рисунок. 5.17 – СЭМ изображения, поперечного сечения трехслойного Ag-ГА биокompозита: в режиме дифракции обратного рассеяния электронов: (а, б) многослойное покрытие, сформированное на кремниевой подложке, (в, г) многослойное покрытие, сформированное на титановой подложке, во всех экспериментах первый слой ГА составлял 850 ± 150 нм, для функционализации ГА покрытия использовались AgНЧ стабилизированные с ПВП_{60мин}

Также наличие серебра в структуре Ag-ГА биокompозита доказывается РФА, рисунок 5.18. На рентгенограммах, рисунок 3.18, представлено исследование структуры трехслойного Ag-ГА биокompозита, наблюдается наличие интенсивных пиков ГА и серебра. В случае использования титановой подложки рефлекс серебра детектируются при углах 2θ 44,3, 64,4 и 77,3 и имеют направление (200), (220) и (311), соответственно. Использование модельной подложки кремния, позволяет детектировать основной рефлекс серебра для биокompозита при $2\theta = 38,12^\circ$, в направлении кристаллографической плоскости (111). Результаты исследования структурных параметров Ag-ГА биокompозита на титановой подложке методом Ритвельда, представлены в таблице 5.3.

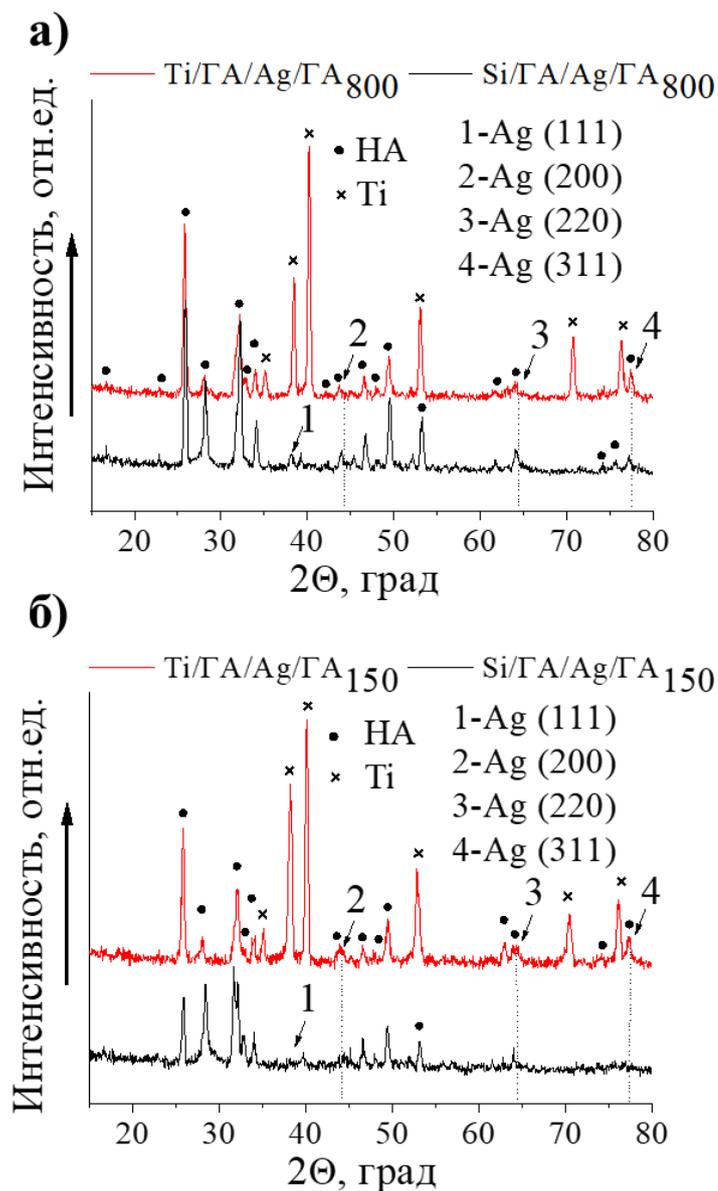


Рисунок 5.18 – Рентгенограммы при $\varphi = 2,0^\circ$ полной, трехслойной структуры Ag-ГА биокompозита: а) верхнее ГА_{800±50нм} покрытие, б) верхнее ГА_{150±30нм}

Таблица 5.3. Структурные параметры Ag-ГА биокompозита на Ti подложке

Толщина верхнего ГА покрытия, нм	Кристаллические фазы	Фаза, мас. %	ОКР, нм	Плотность, г/см ³	Параметры элементарной ячейки		
					<i>a</i> , Å	<i>c</i> , Å	<i>V</i> , Å ³
800	ГА	96	58	3,13	9,443(3)	6,885(1)	531,7(3)
	Ag	4	16	10,40	4,099(4)	4,099(4)	68,9(2)
150	ГА	92	58	3,14	9,432(4)	6,881 (1)	530,2(5)
	Ag	8	18	10,40	4,099(2)	4,099(2)	68,9(1)

Результаты атомно-абсорбционной спектроскопии после полного растворения в концентрированной азотной кислоте трёхслойного Ag-ГА биокompозита показали среднее содержание серебра 8 ± 2 мкг/см².

5.3.2. Физико-механические свойства Ag-ГА биокompозита

Адгезия покрытия к поверхности имплантата является важным фактором, обеспечивающим надежность и долговременную работу системы имплантат-покрытие.

В диссертационной работе для оценки адгезионной прочности многослойного композитного покрытия к титановой подложке был проведен скретч-тест (склерометрия), результаты работы представлены на рисунке 5.19. Для эксперимента были выбраны следующие параметры: величина линейно-растущей нагрузки на индентор составляла от 0,01 до 7 Н, скорость нормального давления индентора 7 Н/мин, радиус алмазного индентора составлял 100 мкм, длина царапины – 6 мм. Достоверность полученных результатов достигалась за счет нанесения серии из трех царапин на разных образцах. Толщина верхнего ГА слоя Ag-ГА биокompозита составляла 150 нм.

В ходе проникновения индентора в многослойное композитное покрытие, оно оказывает сопротивление и в области нагрузок до 1 Н наблюдаются незначительные колебания коэффициента трения, обусловленные шероховатостью поверхности Ag-ГА композита, рисунок 5.19 (ж). Морфология поверхности Ag-ГА биокompозита после проведения скретч-тестов с тремя различными нагрузками: 2,8 Н, 5,6 Н и 7 Н приведена на микрофотографиях оптической и СЭМ, рисунок 5.19 (а-е). На рисунке 5.19 (ж) можно наблюдать колебания коэффициента трения при нагрузках до 5,6 Н, данные колебания связаны с образованием завалов на краях царапины и вдавливанием материала покрытия в подложку, в свою очередь при нагрузке в 5,6 Н наблюдается резкий скачок коэффициента трения до 0,6, связанный с проникновением индентора в подложку, рисунок 5.19 (б, д).

Образование адгезионных трещины в диапазоне нагрузок 5,3 – 5,6 Н и отсутствие отслаивания покрытия указывает на его когезионный механизм разрушения [189]. Также вдоль кромки канавки царапины наблюдались локальные завалы покрытия, свидетельствующие о его пластичности. При дальнейшем увеличении нагрузки наступает адгезионное разрушение и истирание многослойного композитного покрытия. В работе [190] сообщается, что адгезионная прочность ВЧМР ГА покрытия к титановой подложке зависит от толщины покрытия и уменьшается при толщине свыше 1,6 мкм, а также не наблюдалось эксфолиации покрытия до максимальной нагрузки 2 Н.

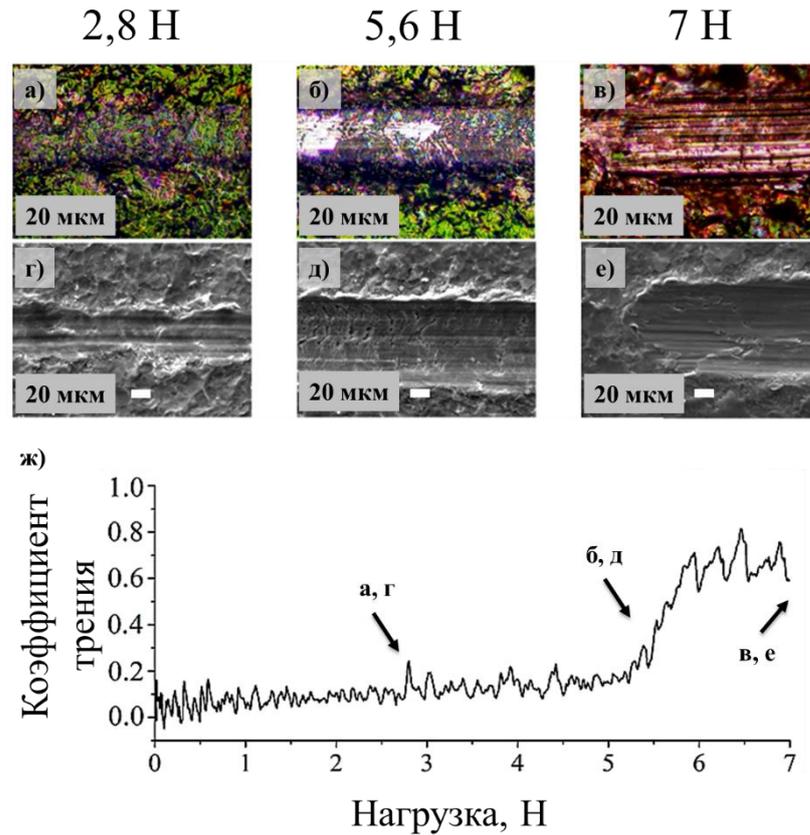


Рисунок. 5.19 – Оптические фотографии (а, б, в) и СЭМ-изображения (г, д, е) треков царапин, соответствующих приложенным нагрузкам 2,8, 5,6 и 7 Н, ж) зависимость коэффициента трения от приложенной нагрузки, определяемой с помощью скретч-теста на трехслойной системе Ag-ГА биокompозита, осажденной на титановой подложке с толщиной верхнего (третьего) слоя ГА покрытия порядка 150 нм

Авторы работы [191] показали, что ГА покрытие толщиной 700 нм сформированное на титановой подложке методом ВЧМР, адгезионно разрушалось и истиралось до подложки при максимальной нагрузка равной 5,85 Н. Таким образом, результаты изучения адгезионной прочности трехслойного композитного покрытия к поверхности титановой подложки, в сравнении с литературными данными [190,191] указывают на перспективность использования Ag-ГА композита в медицинской практике.

6 *In vitro* – исследование

In-vitro анализ является неотъемлемой частью исследования биоматериалов для применения в медицинской практике. Авторы работы [16] показали, что наночастицы серебра препятствуют бактериальной адгезии путем непрерывного высвобождения ионов серебра. С целью оценки антибактериальной активности Ag-ГА биокompозита в условиях *in vitro*, было изучено выделение ионов серебра. Количество выделяемого серебра контролировалось методом атомно-абсорбционной спектроскопии для трехслойных покрытий Ag-ГА биокompозита с различной толщиной верхнего слоя ГА.

6.1 Исследование поведения Ag-ГА биокompозита в модельной биологической среде натрий-фосфатного буфера

Исследования по растворению и высвобождению серебра из трехслойной системы Ag-ГА биокompозита с верхним слоем ГА покрытия толщиной 800 ± 50 нм и 150 ± 30 нм, проводились путем погружения 1 образца в 5 мл раствора натрий-фосфатного буфера, контроль количества высвободившегося серебра был проведен спустя 3 дня растворения методом атомно-абсорбционной спектроскопии. На рисунке 6.1 приведены энергодисперсионные спектры образцов до и после растворения в среде натрий-фосфатного буфера в течение 3 и 7 дней. Можно заметить, что при использовании верхнего ГА покрытия толщиной 150 ± 30 нм, рисунок 6.1 (б) с увеличением времени растворения, происходит уменьшение интенсивности пика серебра, а также кальция и фосфора, что в свою очередь указывает на растворение верхнего ГА покрытия и выхода серебра в раствор натрий-фосфатного буфера. На рисунке 6.1 (а) при использовании верхнего ГА покрытия толщиной порядка 800 ± 50 нм, с увеличением времени растворения, главный пик серебра практически не изменяется, тогда, как второстепенная его часть имеет минимальную интенсивность на 7 сутки.

Результаты ААС исследования показали, что из трехслойной системы покрытий Ag-ГА биокompозита с верхним слоем ГА покрытия толщиной 800 ± 50 нм, через 3 дня количество серебра в растворе натрий-фосфатного буфера достигало $2,2\pm 0,4$ мкг, что составляет $27\pm 3\%$ от исходного содержания серебра. Количество серебра, высвобождаемое из многослойного покрытия с верхним ГА слоем толщиной 150 ± 30 нм, при тех же условиях растворения, достигает $3,6\pm 0,5$ мкг, что составляет $45\pm 3\%$ от исходного содержания серебра.

Следует отметить, что растворение в чистой воде не полностью отражает реальные условия в биологических средах, поскольку биологические среды намного сложнее по своему

химическому составу, и многие компоненты будут действовать одновременно на наночастицы серебра и ГА покрытия, было принято решение снизить сложность системы, используя среду натрий-фосфатного буфера для растворения [192-194].

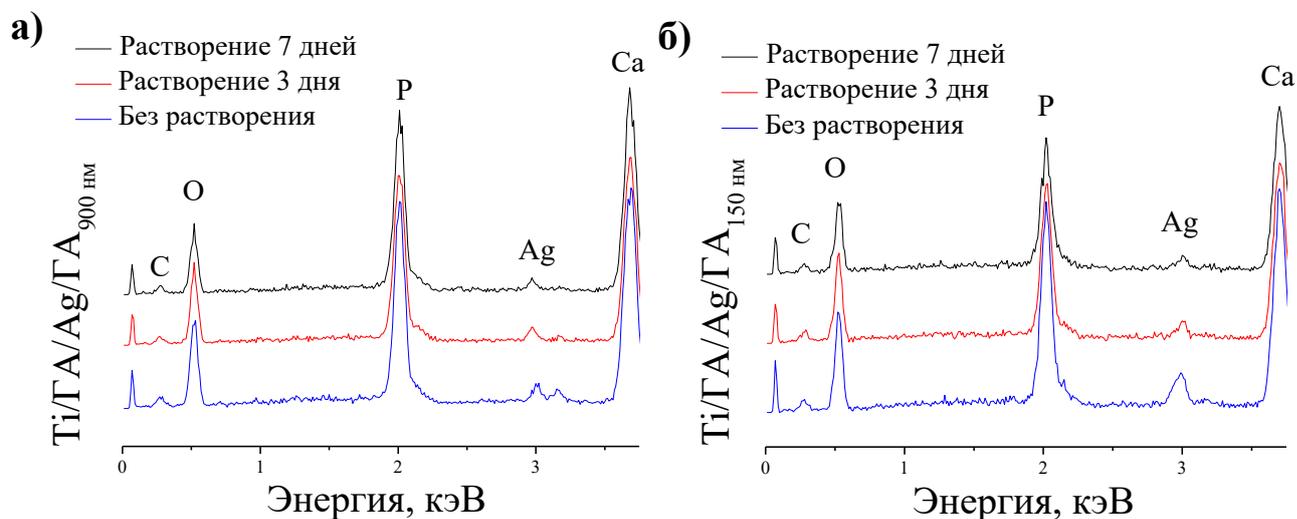


Рисунок. 6.1 – ЭДРА спектры растворения трехслойной системы Ag-ГА биокompозита в среде натрий-фосфатного буфера в течение 3 и 7 дней: верхнее ГА покрытие составляет 800 ± 50 нм (а), верхнее ГА покрытие составляет 150 ± 30 нм (б)

На рисунке 6.2 приведены СЭМ изображения трехслойных системы покрытий Ag-ГА биокompозита, после растворения в среде натрий-фосфатного буфера в течение 3 дней, где можно наблюдать однородные покрытия без микротрещин на поверхности, что указывает на высокую физиологическую и механическую стабильность композитных покрытий в физиологической среде. Хотя прочностные свойства ГА покрытия могут уменьшаться за счет химического растворения, следовательно, микроструктура покрытия будет ослаблена [193]. Кроме того, на поверхности многослойного покрытия могут возникать трещины в следствии продолжительного химического растворения и реакции между поверхностью покрытия и раствором.

Анализ представленных результатов показал, что спустя 3 дня высвобождается порядка 30% исходного содержания серебра, следовательно, можно предположить, что продолжительность выделения серебра будет происходить на протяжении нескольких недель. Данный факт делает Ag-ГА биокompозит эффективным для предотвращения первоначальной бактериальной инфекции и не приводит к длительному выделению серебра, которое может оказаться губительным для окружающих тканей, кроме того учитывая, что серебро будет испускаться в непосредственной близости от покрытия и препятствовать адгезии бактерий, следовательно, не потребуется применение большого количества серебра. После этого этапа

остеокондуктивные свойства оставшегося, первого слоя, ГА покрытия будут стимулировать рост костной ткани.

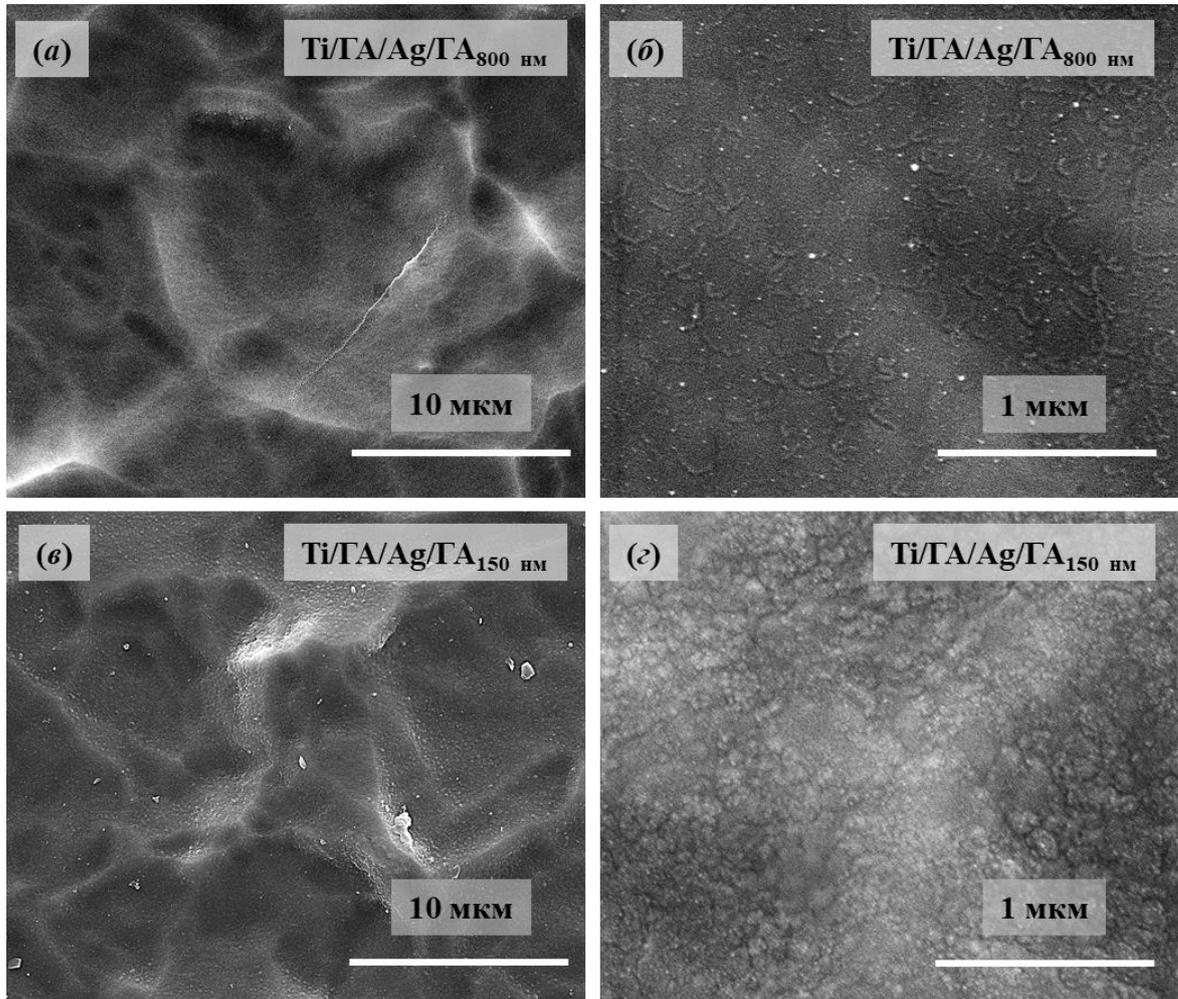


Рисунок 6.2 – Морфология поверхности трехслойных покрытий Ag-ГА биокompозита после 3 дней погружения в натрий-фосфатного буфера: верхнее ГА покрытие составляет 800 ± 50 нм (а), (б), верхнее ГА покрытие составляет 150 ± 30 нм (в), (г)

6.2 Антибактериальное исследование Ag-ГА биокompозита

Изучение антибактериальных свойств Ag-ГА биокompозита проведено с использованием полуколичественного анализа, путем определения оптической плотности исследуемой бактериальной среды. Антибактериальные тесты проведены с бактериями штамма кишечной палочки *E. coli*. Подробное описание схемы антибактериальных экспериментов приведено в главе 4.14. На рисунке 6.3 представлены результаты определения оптической плотности при длине волны 600 нм ($ОП_{600\text{нм}}$) в бактериальной культуре, где происходит планктонный рост свободно плавающих бактерий в богатой питательными веществами среде.

Методом ААС было установлено, что после растворения системы Ag-ГА биокompозитов с верхним ГА покрытием толщиной 150 ± 30 нм, концентрация серебра в среде натрий-фосфатного буфера составила $2,5\pm 0,3$ мг/л. Тогда как при использовании верхнего ГА покрытия с толщиной 800 ± 50 нм, концентрация серебра в среде натрий-фосфатного буфера составила $0,71\pm 0,15$ мг/л.

Анализ представленных результатов показал, что трехслойные покрытия Ag-ГА биокompозита с различной толщины верхнего слоя ГА показали явные различия в их способности ингибировать рост бактерий. Экспериментальные образцы с тонким верхним слоем ГА (150 ± 30 нм) показали гораздо более сильное антибактериальное действие, чем образцы с слоем ГА толщиной 800 ± 50 нм (рисунок 6.3, таблица 6.1). В настоящее время нельзя однозначно объяснить данное несоответствие, но оно является воспроизводимым. Поскольку высвобождение серебра в растворе натрий-фосфатного буфера является лишь приближением ситуации *in vivo*, эти результаты могут служить только первым приближением антибактериального эффекта после имплантации в организм, поскольку другие бактериальные штаммы (такие как адгезивные бактерии, включая биопленки) являются наиболее важными в случае имплантационных инфекций.

Авторы работы [195] установили, что минимальная ингибирующая концентрация серебра для защиты от составляет приблизительно $0,5-2,5$ мг/л. Этот результат свидетельствует о том, что для Ag-ГА биокompозита инкубируемого в натрий-фосфатном буфере, в течение 3 дней, концентрация серебра в среде находится оптимальных пределах для угнетения роста бактерий штамма *E. coli*.

Кроме того, более низкий уровень pH, в случае воспаления, увеличит высвобождение ионов серебра за счет более быстрого растворения ГА покрытия. Данный процесс может привести к быстрому выходу наночастиц, а также ионов серебра. В работе Necula B.S. [196] подтверждается, что на выход ионов серебра влияет инкубационная среда, условия эксперимента, а также отмечены четкие различия, наблюдаемые при тестировании AgНЧ, суспендированных в культивируемых средах, и AgНЧ, включенных / прикрепленных к твердой подложке.

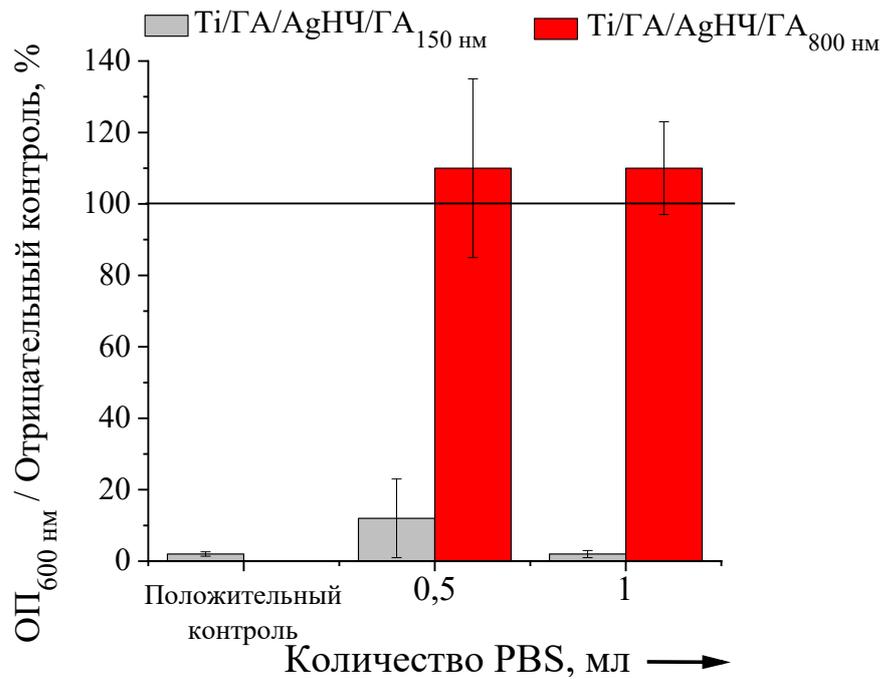


Рисунок 6.3 – Результаты исследования оптической плотности среды с бактериями штамма *E. coli* с добавлением инкубационного раствора натрий-фосфатного буфера после растворения Ag-ГА биокompозита в течение 3 дней. Измерения ОП_{600нм}, нормированы на отрицательный контроль, 100%. В качестве положительного контроля добавляли антибиотик ампициллин

Таблица 6.1 – Характерные примеры бактериальных суспензий *E. coli* в контакте с инкубационными средами из разных систем Ag-ГА биокompозита, после растворения в течение 3 дней. Мутность указывает на активный рост бактерий

Отрицательный контроль	Положительный контроль	Образцы с верхним ГА покрытием			
		800±50 нм		150±30 нм	
		Количество натрий-фосфатного буфера, мл			
		0,5	1	0,5	1

Выделенное серебро также может оказаться вредным для окружающей ткани, потому что терапевтическое окно для действия серебра между бактериями и клетками является сильно ограниченным [197, 163]. Следовательно, контроль дозировки AgНЧ и обеспечение согласованных терапевтических результатов по-прежнему сложны, а механизмы высвобождения ионов серебра являются принципиально важными для контролируемого антибактериального эффекта. Ранее сообщалось, что тонкие ГА покрытия, нанесенные методом ВЧ-магнетронного распыления, представляют собой нанометровые кристаллы с низкой кристаллической структурой, встроенными в аморфную матрицу [42, 198, 199]. Также в работе Сурменевоy М.А. [49] было показано, что ГА покрытия состоят из смеси аморфных областей и нанокристаллических колонн, выращенных перпендикулярно поверхности подложки. Таким образом в ходе деградации пленки ГА в жидких средах, в том числе биологических, наблюдается процесс одновременного растворения и осаждения [165]. Следовательно, есть предположение, что быстро растворяющиеся фракции аморфных областей ГА покрытия контролируют высвобождение ионов серебра.

6.3 Биологическая активность Ag-ГА биокompозита

Поскольку ранее было показано, что Ag-ГА биокompозит с тонким верхним слоем ГА покрытия 150 ± 30 нм, показал высокие антибактериальные свойства, стало целесообразным изучить биологические свойства *in-vitro*, а именно его влияние на цитотоксичность по отношению к подобным остеобластам клеткам человека.

С этой целью была измерена митохондриальная активность остеобластов, используя МТТ-анализ для образцов: титана (Ti); титана с ГА покрытием толщиной 850 ± 150 нм (Ti-ГА); титана с ГА покрытием толщиной 800 ± 50 нм и слоем AgНЧ (Ti-ГА-Ag); титана с трехслойной системой покрытий Ag-ГА биокompозита с толщиной верхнего слоя ГА 150 ± 30 нм (Ti-ГА-Ag-ГА). Анализ результатов МТТ-теста, рисунок 6.4, показал, что клетки, которые были выращены на всех композитных поверхностях, показали значительное снижение активности митохондрий в первый и третий день инкубации по сравнению с чистой титановой подложкой.

Однако средняя активность митохондриальных клеток была увеличена для трехслойной системы покрытий Ag-ГА биокompозита с толщиной верхнего слоя ГА 150 ± 30 нм по сравнению со средними значениями активности митохондриальных клеток для систем: Ti-ГА и Ti-ГА-Ag, что указывает на то, что тонкий верхний слой ГА, без термической обработки, снижает токсическое действие серебра на костные клетки.

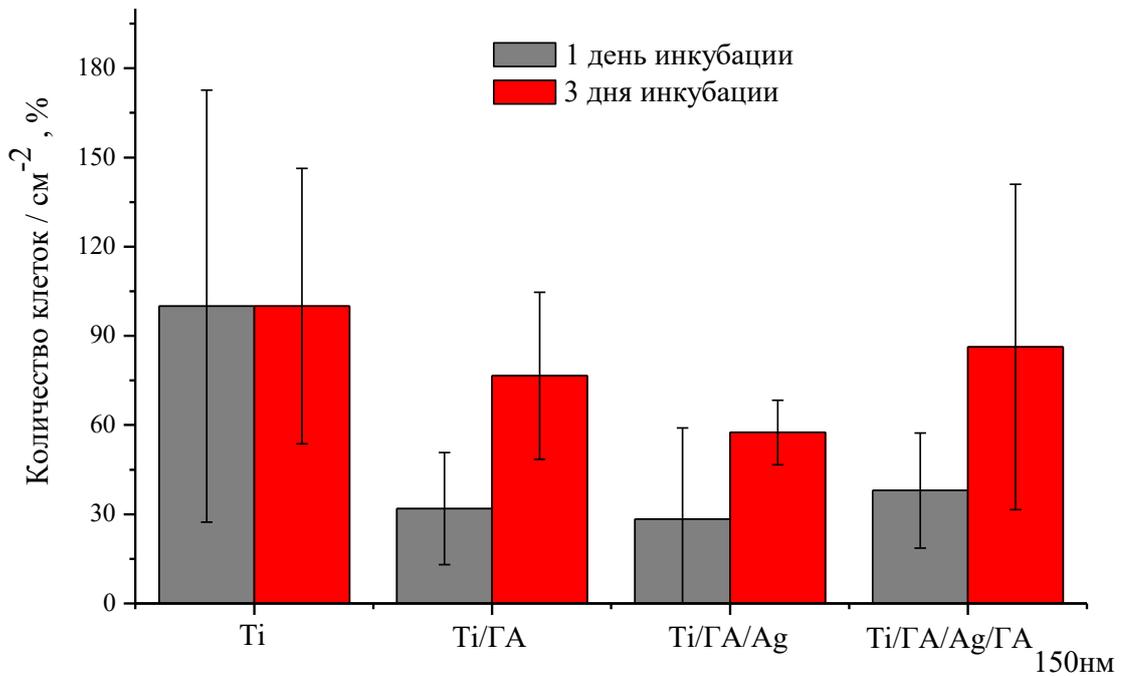


Рисунок. 6.4 – МТТ-тест. Гистограмма оценки жизнеспособности клеток линии MG-63 на 1 и 3 сутки культивации

Результаты флуоресцентной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии, рисунок 6.5 и рисунок 6.6, соответственно, показывают, что клетки равномерно распределяются по всем экспериментальным поверхностям с типичной для остеобластов формой. Однако на поверхности титана с ГА покрытием толщиной 850 ± 150 нм и слоем AgНЧ было обнаружено минимальное количество клеток, в свою очередь на трехслойном покрытии Ag-ГА биокомпозита сформированного на титановой подложке было обнаружено максимальное количество клеток, что указывает на положительный эффект осажденного верхнего слоя ГА 150 ± 30 нм, на поверхности AgНЧ по отношению к биологическим свойствам, а именно происходит активный рост и увеличение пролиферативной активности клеток MG-63.

В ряде работ было показано, что биоматериалы, содержащие надлежащее количество серебра, совместимы с клетками млекопитающих, включая остеобласты [200- 202], и даже усиливают их пролиферативную активность [203, 204].

Согласно литературным данным, ГА покрытие увеличивает остеопроводимость титановых подложек в процессе инкубации более 14 дней [197, 205, 206]. Основываясь на представленных результатах и литературных данных, можно сделать вывод о том, что тонкий слой ГА покрытия, без термической обработки, обладает высокой способностью поддерживать пролиферацию костных клеток (остеобластов). В то же время равномерное растворение многослойных покрытий является доминирующей причиной деградации без расслоения. В антибактериальных тестах наблюдалось ингибирующее действие на планктонный рост бактерий *E.coli* с верхним гидроксиапатитным слоем толщиной 150 ± 30 нм.

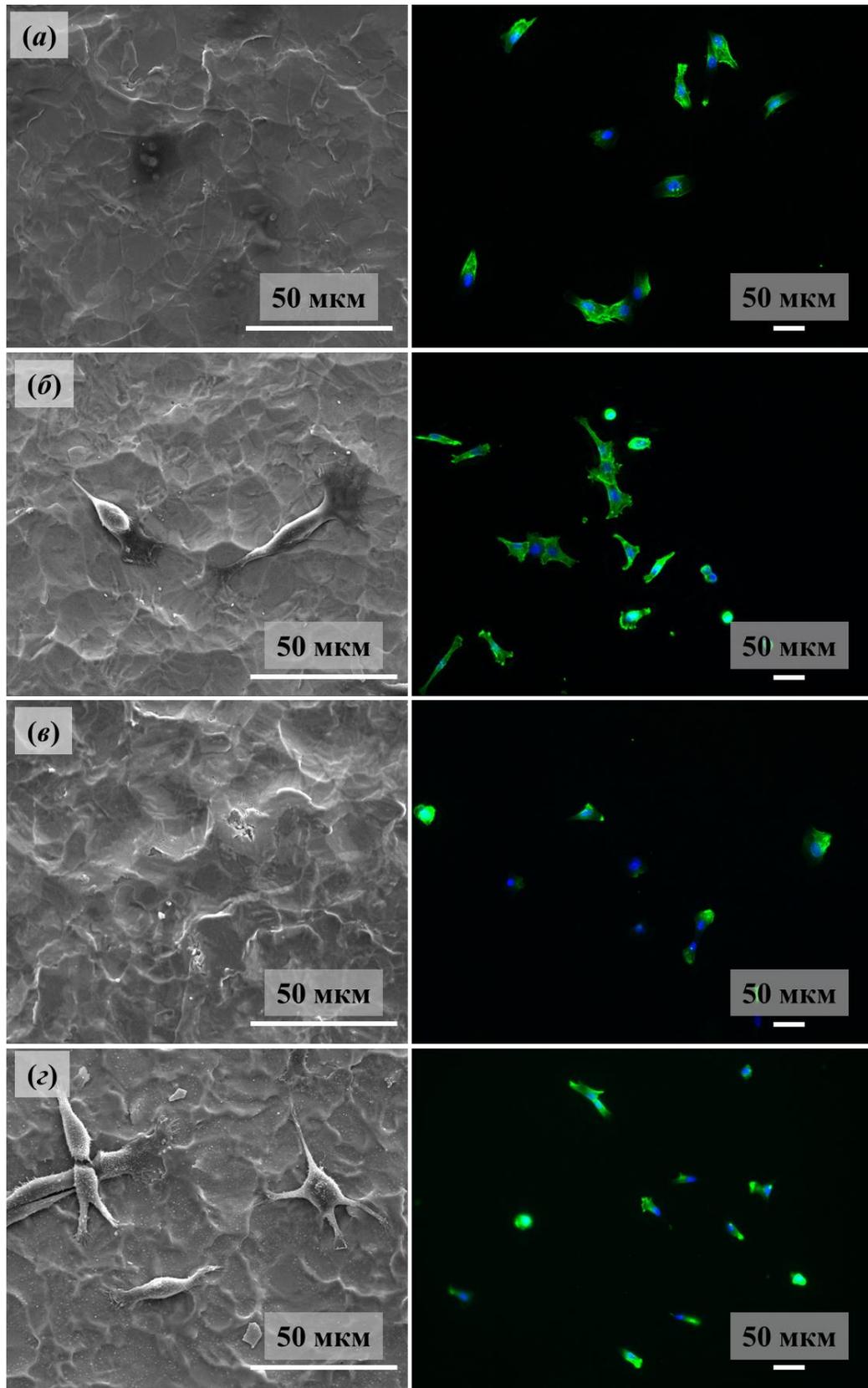


Рисунок. 6.5 – Флуоресцентные микрофотографии (слева) и СЭМ изображения (справа) клеток MG63 культивируемые в течение 1 дня на следующий образцах: Ti (а), Ti- $\text{GA}_{850\pm 150\text{nm}}$ (б), Ti- $\text{GA}_{850\pm 150\text{nm}}$ -Ag (в), Ti- $\text{GA}_{850\pm 150\text{nm}}$ -Ag- $\text{GA}_{800\pm 50\text{nm}}$ (г). Ядра клеток окрашивались в синий цвет с помощью DAPI, клеточная мембрана окрашивалась в зеленый цвет с помощью Phalloidin-Alexa488

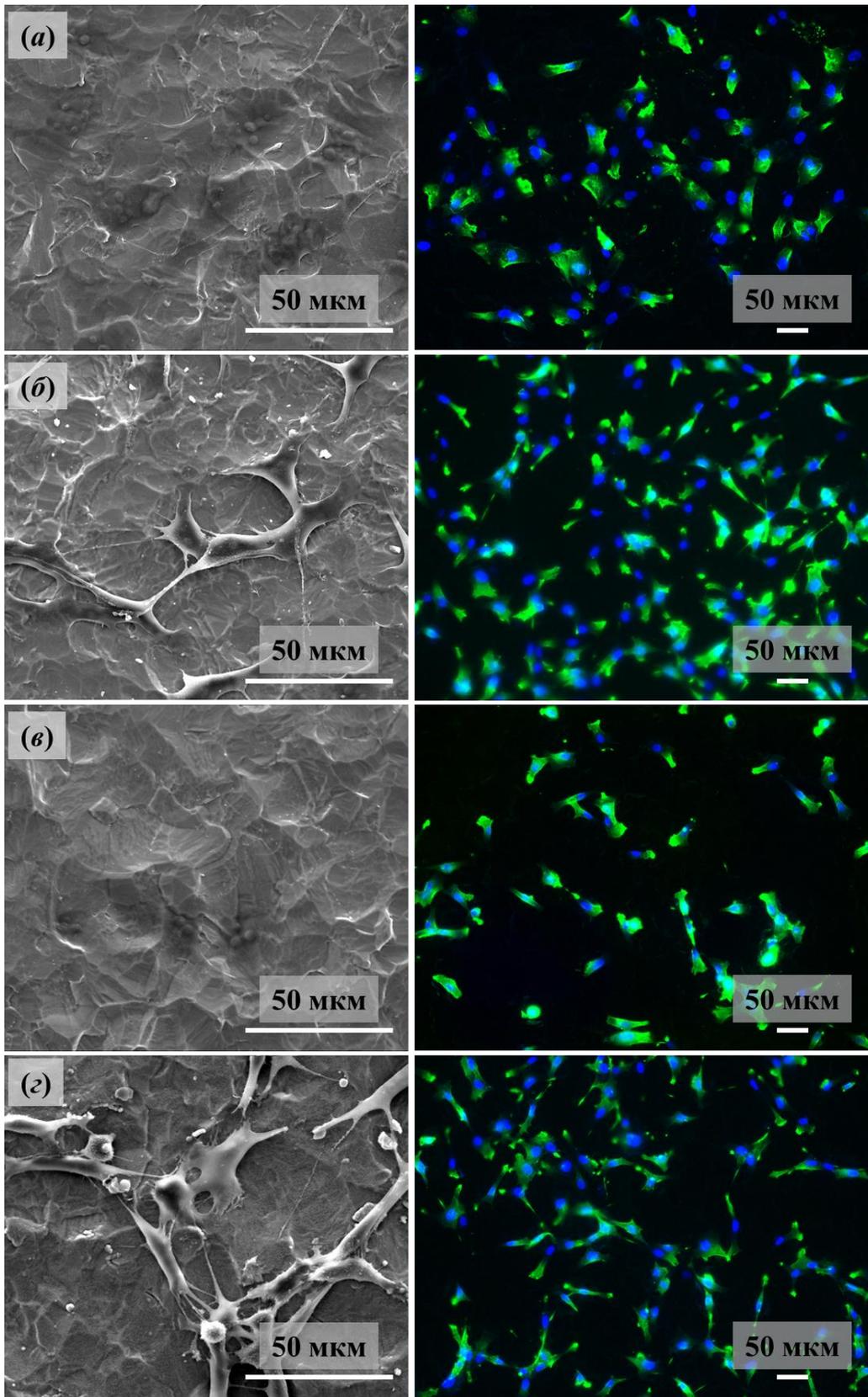


Рисунок. 6.6 – Флуоресцентные микрофотографии (слева) и СЭМ изображения (справа) клеток MG63 культивируемые в течение 3 дней на следующий образцах: Ti (а), Ti-ГА_{850±150нм} (б), Ti-ГА_{850±150нм}-Ag (в), Ti-ГА_{850±150нм}-Ag-ГА_{800±50нм} (г). Ядра клеток окрашивались в синий цвет с помощью DAPI, клеточная мембрана окрашивалась в зеленый цвет с помощью Phalloidin-Alexa488

Эти результаты указывают на возможность применения предложенной многослойной системы покрытий в качестве биосовместимого имплантационного покрытия с отсроченным высвобождением серебра, например, в случае воспаления при более низком рН, но его необходимо изучать более подробно, также принимая во внимание влияние серебра на окружающую ткань и высвобождение серебра в физиологических условиях.

ВЫВОДЫ

1. Методом ВЧМР сформированы ГА покрытия, средняя толщина покрытий составляет от 500 ± 70 нм до 900 ± 50 нм, с показателем преломления равным $1,68\pm 0,04$ при осаждении в течение 480 мин. Средняя толщина покрытия составляет от 150 ± 30 нм до 200 ± 20 нм, с показателем преломления равным $1,65\pm 0,02$ при осаждении в течение 180 мин. Показано, что наличие рефлексов при углах 2θ равных $25,9^\circ$ (002), $31,8^\circ$ (211), $32,9^\circ$ (300), $53,1^\circ$ (004) характерно для кристаллического ГА. Морфологические исследования свидетельствуют о формировании плотного со столбчатой структурой покрытия, не имеющего трещин, сколов и других видимых дефектов.
2. Установлено, что термическая обработка ГА покрытия (480 мин) при температуре 600°C приводит к росту средних размеров ОКР от 38 ± 3 до 89 ± 5 нм и текстурного коэффициента от 0,69 до 1 в направлении [002].
3. Методом химического восстановления в течение 5 и 60 минут синтезированы AgНЧ в присутствии стабилизаторов ПВП и ПЭИ. Установлена зависимость процесса синтеза от времени на размер и заряд AgНЧ. Синтез в течение 60 мин позволяет формировать AgНЧпвп с размером 70 ± 20 нм, зарядом $-22,5\pm 8,1$ мВ (ИПД= $0,19\pm 0,01$ отн. ед.), AgНЧпэи с размером 40 ± 20 нм и зарядом $54,1\pm 14,8$ мВ (ИПД= $0,40\pm 0,03$ отн. ед.), тогда как синтез в течение 5 минут позволяет получать AgНЧпвп с размером 25 ± 15 нм и зарядом $0,3\pm 15,6$ мВ (ИПД= $0,49\pm 0,04$ отн. ед.). На основе экспериментальных результатов Ag НЧ, стабилизированные с ПВП в течение 60 мин, выбраны для функционализации ГА покрытий. Исследования РФА AgНЧпвп восстановленных в течении 60 мин, показали присутствие рефлексов серебра с размером ОКР 14 ± 1 нм.
4. Выявлено, что установленные условия осаждения методом ЭФО в среде этанола с рабочими параметрами: время осаждения от 10 до 50 мин, напряженность электрического поля от 17 до 100 В/мм, концентрация КР от 30 до 350 мг/л позволяют формировать равномерный слой наночастиц с содержанием серебра от 2 до 23 мкг/см². В процессе ЭФО увеличение aliquоты водного КР AgНЧпвп от 120 до 720 мкл, приводит к росту концентрации AgНЧ в электролите на основе этанола от 30 до 180 мг/л и изменению характера распределения AgНЧ по поверхности ГА покрытия, сформированного на титановой подложке, с равномерного на коагуляционный.
5. Анализ механических свойств многослойного Ag-ГА композита на поверхности титановой подложки с верхним слоем ГА толщиной 150 ± 30 нм, показал, что разрушение происходит по когезионному механизму, связанному с пластической деформацией.
6. Установлено, что толщина верхнего слоя на основе ГА, осажденного на слой наночастиц серебра, оказывает влияние на выход серебра из композита в модельную биологическую среду. После растворения в течение 3 дней Ag-ГА биокompозитов с верхним ГА слоем толщиной 150 ± 30

нм концентрация серебра в среде натрий-фосфатного буфера составила $2,5 \pm 0,3$ мг/л, в то время как при использовании верхнего ГА слоя с толщиной 800 ± 50 нм концентрация серебра в среде натрий-фосфатного буфера составила $0,71 \pm 0,15$ мг/л.

7. Установлено, что растворение в течение 3 дней многослойного Ag-ГА биокompозита с верхним ГА слоем толщиной 150 ± 30 нм, обеспечивает концентрацию серебра в среде натрий-фосфатного буфера равную $2,5 \pm 0,3$ мг/л, оказывающую ингибирующее действие на планктонный рост бактерий штамма *E.coli*, без цитотоксичности для клеток *MG-63*.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГА – гидроксиапатит;

Ag-ГА – серебросодержащий композит;

AgНЧ – наночастицы серебра;

ВЧМР – метод высокочастотного магнетронного распыления;

ЭФО – электрофоретическое осаждение;

ПВП – поливинилпирролидон;

ПЭИ – полиэтиленимин;

КС – коллоидная система;

КР – коллоидный раствор;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

РФА – рентгенофазовый анализ;

ЭДРА – энергодисперсионный рентгеновский анализ;

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия;

НТА – метод анализа треков наночастиц;

ДРС – метод динамического рассеяния света;

ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия;

ОКР – область когерентного рассеяния;

ИПД – индекс полидисперсности

E. coli – штамм кишечной палочки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Берт, М. Устранение осложнений имплантологического лечения: монография / М. Берт, П. Миссика, Ж. Л. Джованьоли. – М.: Азбука стоматолога, 2007. – 355 с.
2. Самарцев, В. А. Послеоперационные осложнения металлоостеосинтеза конечностей / В. А. Самарцев, И. В. Кадынцев, Е. Г. Волуженков // Пермский медицинский журнал. – 2018. – Т. 35. – №. 3. – С. 5-8.
3. Яременко, А. И. Анализ осложнений дентальной имплантации / А. И. Яременко, М. В. Котенко, С. Н. Мейснер, В. В. Раздорский // Институт стоматологии. – 2015. – №. 2. – С. 46-49.
4. Перинская, И. В. Влияние ионно-лучевой обработки на механические, морфологические и биосовместимые свойства медицинских изделий из титана / И. В. Перинская, И. В. Родионов, Л. Е. Куц // Физика и химия обработки материалов. – 2017. – №. 6. – С. 26-33.
5. Котов, С. А. Влияние метода модифицирования поверхности на электрохимические свойства титана / С. А. Котов, Л. П. Батурова, А. Н. Бурлова, Е. Д. Зверева // Научно-технические ведомости СПбПУ. Естественные и инженерные науки. – 2018. – Т. 24. – №. 1. – С. 95-103.
6. Safavi, M. S. A review on the prevalent fabrication methods, microstructural, mechanical properties, and corrosion resistance of nanostructured hydroxyapatite containing bilayer and multilayer coatings used in biomedical applications / M. S. Safavi, M. Etminanfar // Journal of Ultrafine Grained and Nanostructured Materials. – 2019. – Vol. 52. – №. 1. – P. 1-17.
7. Kharapudchenko, E. Hybrid Calcium Phosphate Coatings for Titanium Implants / E. Kharapudchenko, V. Ignatov, V. Ivanov, S. Tverdokhlebov // Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing. – 2017. – Vol. 789. – №. 1. – P. 012025.
8. Сурменев, Р. А. ВЧ-магнетронные кальций-фосфатные покрытия на материалах медицинских имплантатов / Р. А. Сурменев, М. А. Сурменева, В. Ф. Пичугин, М. Эппле // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. – 2009. – Т. 315. – №. 2. – С. 138-141.
9. Шаркеев, Ю. П. Электрический потенциал и топография поверхности кальций-фосфатного покрытия, полученного в плазме ВЧ-разряда / Ю. П. Шаркеев, К. С. Попова, К. А. Просолов, И. А. Хлусов // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2020. – №. 2. – С. 95-102.
10. Wang, H. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method / H. Wang, X. Qiao, J. Chen, S. Ding // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2005. – Vol. 256. – №. 2-3. – P. 111-115.
11. Banerjee, S. Structural evolution of silver nanoparticles during wet-chemical synthesis / S. Banerjee, K. Loza, W. Meyer-Zaika, O. Prymak, M. Epple // Chemistry of Materials. – 2014. – Vol. 26. – №. 2. – P. 951-957.
12. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Surgical implants and other foreign bodies // Lyon, France. – 1999. – V. 74. – P. 427.
13. Lilja, M. Bioactive Surgical Implant Coatings with Optional Antibacterial Function: Dissertation of doctoral degree: 1091 / Lilia Mirjam. – Uppsala, 2013. – 60 p.
14. Farooq, I. Bioactive glass: a material for the future / I. Farooq, Z. Imran, U. Farooq, A. Leghari, H. Ali // World Journal of dentistry. – 2012. – Vol. 3. – №. 2. – P. 199-201.

15. Грицанов, А.И. О коррозии металлических конструкций и металлозов тканей при лечении переломов костей / А.И. Грицанов, Ю.Ф. Станчиц // Вестник хирургии. –1977. – № 2. – С. 105–109.
16. Loza, K. The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media / K. Loza, J. Diendorf, C. Sengstock, L. Ruiz-Gonzalez, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Köller, M. Epple // Journal of Materials Chemistry B. – 2014. – Vol. 2. – №. 12. – P. 1634-1643.
17. Römer, I. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests / I. Römer, T. A. White, M. Baalousha, K. Chipman, M. R. Viant, J. R. Lead // Journal of Chromatography A. – 2011. – Vol. 1218. – №. 27. – P. 4226-4233.
18. Эппле, М. Биоматериалы и биоминерализация / М. Эппле. – Томск: Ветер, 2007. – 144 с.
19. Петровская, Т. С. Биоматериалы и имплантаты для травматологии и ортопедии: монография / Т. С. Петровская, В. П. Шахов, В. И. Верещагин, В. П. Игнатов. – Томск: ТПУ, 2011. – 307 с.
20. Surmenev, R. A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—a review / Surmenev R. A., Surmeneva M. A., Ivanova A. A. // Acta biomaterialia. – 2014. – Vol. 10. – №. 2. – P. 557-579.
21. Tao, Z. S. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats / Z. S. Tao, W. S. Zhou, X. W. He, W. Liu, B. L. Bai, Q. Zhou, Z. L. Huang, K. K. Tu, H. Li, T. Sun, Y. X. Lv, W. Cui, L. Yanga // Materials Science and Engineering: C. – 2016. – Vol. 62. – P. 226-232.
22. Voccaccini, A. R. Electrophoretic deposition of biomaterials / A. R. Voccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky // Journal of the Royal Society Interface. – 2010. – Vol. 7. – №. 5. – P. S581-S613.
23. Eom, H. Electrodeposition of silver-nickel thin films with a galvanostatic method / H. Eom, B. Jeon, D. Kim, B. Yoo // Materials transactions. – 2010. – Vol. 51. – №. 10. – P. 1842-1846.
24. ГОСТ Р 51148-98 Изделия медицинские. Требования к образцам и документации, предоставляемым на токсикологические, санитарно-химические испытания, испытания на стерильность и пирогенность. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 1998. – 13 с.
25. МУ 1.1.037-95. Методические указания. Биотестирование продукции из полимерных и других материалов. – М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1996. – 5 с.
26. Ratner, B. D. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine / B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons. – Elsevier, 2004. – 864 p.
27. Ducheyne, P. Comprehensive biomaterials / P. Ducheyne, K. Healy, D. W. Hutmacher, D. W. Grainger, C. J. Kirkpatrick. – Elsevier, 2015. – Vol. 1. – 744 p.
28. Saini, M. Implant biomaterials: A comprehensive review / M. Saini, Y. Singh, P. Arora, V. Arora, K. Jain // World Journal of Clinical Cases. – 2015. – Vol. 3. – №. 1. – P. 52-57.
29. Paital, S. R. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies / S. R. Paital, N. B. Dahotre N. B. // Materials Science and Engineering: R: Reports. – 2009. – Vol. 66. – №. 1-3. – P. 1-70.
30. Heimann, R. B. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings / R. B. Heimann // Surface and Coatings Technology. – 2013. – Vol. 233. – P. 27-38.
31. Tulyaganov, D. U. Synthesis, processing and characterization of a bioactive glass composition for bone regeneration / D.U. Tulyaganov, M.E. Makhkamov, A. Urazbaev, A. Goel, J. M. Ferreira // Ceramics International. – 2013. – Vol. 39. – №. 3. – P. 2519-2526.

32. Li, N. Novel magnesium alloys developed for biomedical application: a review / N. Li, Y. Zheng // *Journal of Materials Science & Technology*. – 2013. – Vol. 29. – №. 6. – P. 489-502.
33. Geetha, M. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review / M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia // *Progress in materials science*. – 2009. – Vol. 54. – №. 3. – P. 397-425.
34. Niinomi, M. Biologically and mechanically biocompatible titanium alloys / M. Niinomi // *Materials transactions*. – 2008. – Vol. 49. – №. 10. – P. 2170-2178.
35. Yoon, I. K. Natural bone-like biomimetic surface modification of titanium / I. Yoon, J. Hwang, W. Jang, H. Kim, U.S. Shin // *Applied surface science*. – 2014. – Vol. 301. – P. 401-409.
36. Terleeva, O. P. Effect of microplasma modes and electrolyte composition on micro-arc oxidation coatings on titanium for medical applications / O. P. Terleeva, Y. P. Sharkeev, A. I. Slonova, I. V. Mironov, E. V. Legostaeva, I. A. Khlusov, E. Matykina, P. Skeldon, G. E. Thompson // *Surface and Coatings Technology*. – 2010. – Vol. 205. – №. 6. – P. 1723-1729.
37. Le Guéhennec L. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration / L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq // *Dental materials*. – 2007. – Vol. 23. – №. 7. – P. 844-854.
38. Carlsson, L. Osseointegration of titanium implants / L. Carlsson, T. Röstlund, B. Albrektsson, T. Albrektsson, P. I. Branemark // *Acta Orthopaedica Scandinavica*. – 1986. – Vol. 57. – №. 4. – P. 285-289.
39. Salou, L. Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: an experimental study in rabbits / L. Salou, A. Hoornaert, G. Louarn, P. Layrolle // *Acta biomaterialia*. – 2015. – Vol. 11. – P. 494-502.
40. Bosshardt, D. D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions / D. D. Bosshardt, V. Chappuis, D. Buser // *Periodontology 2000*. – 2017. – Vol. 73. – №. 1. – P. 22-40.
41. Puleo, D. A. Understanding and controlling the bone–implant interface / D. A. Puleo, A. Nanci // *Biomaterials*. – 1999. – Vol. 20. – №. 23-24. – P. 2311-2321.
42. Ponche, A. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: physico-chemical effects / A. Ponche, M. Bigerelle, K. Anselme // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. – 2010. – Vol. 224. – №. 12. – P. 1471-1486.
43. Jayaraj, K. Biocompatible coatings for metallic biomaterials / K. Jayaraj, A. Pius // *Fundamental Biomaterials: Metals*. – Woodhead Publishing, 2018. – P. 323-354.
44. Williams, D. F. *The Williams Dictionary of Biomaterials* / D. F. Williams. - Liverpool: Liverpool University Press, 1999. – 343 p.
45. Williams, D.F. On the mechanism of biocompatibility /D. F. Williams // *Biomaterials*. – 2008.– Vol. 29. – P. 2941-2953.
46. Минина, А. Н. Основы дентальной имплантации: Учебно-методическое пособие / А. Н. Минина, Т. Н. Чернина. - Витебск: ВГМУ, 2013. – 76 с.
47. Whitlow, J. *Bioactive Materials: Definitions and Application in Tissue Engineering and Regeneration Therapy* / J. Whitlow, A. Paul, A. Polini // *Biocompatible Glasses*. – Springer, Cham. – 2016. – P. 1-17.
48. Баринов, С. М. Биокерамика на основе фосфатов кальция: монография / С. М. Баринов, В. С. Комлев. – М.: Наука, 2005. – 204 с.
49. Сурменова, М. А. Закономерности формирования, структурные особенности и свойства покрытий на основе фосфатов кальция, полученных вч-магнетронным осаждением:

- Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук: 01.04.07 / Сурменева Мария Александровна. – Томск, 2012. – 158 с.
50. ГОСТ ISO 10993-1-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка исследования. – Введ. 2013-01-01. – М.: Стандартиформ, 2014. – 15 с.
 51. Шестериков, Е. В. Методы и оборудование для формирования гибридных биологически совместимых покрытий на имплантатах для хирургии осадением: Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук: 05.11.17 / Шестериков Евгений Викторович. – Томск – 2012. – 189 с.
 52. Леонова, Л. А. Синтез гидроксиапатита и формирование биоактивных покрытий из композиционных материалов на его основе и сверхвысокомолекулярного полиэтилена на титане: Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук: 05.17.02 / Леонова Лилия Александровна. – Томск – 2010. – 176 с.
 53. Civantos, A. Titanium coatings and surface modifications: toward clinically useful bioactive implants / A. Civantos, E. Martinez-Campos, V. Ramos, Elvira, C., A. Gallardo, A. Abarategi // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2017. – Vol. 3. – №. 7. – P. 1245-1261.
 54. Mahapatro, A. Bio-functional nano-coatings on metallic biomaterials / A. Mahapatro // Materials Science and Engineering: C. – 2015. – Vol. 55. – P. 227-251.
 55. Raphel, J. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants / J. Raphel, M. Holodniy, S. B. Goodman, S. C. Heilshorn // Biomaterials. – 2016. – Vol. 84. – P. 301-314.
 56. Puppi, D. Polymeric materials for bone and cartilage repair / D. Puppi, F. Chiellini, A. Piras, E. Chiellini // Progress in Polymer Science. – 2010. – Vol. 35. – №. 4. – P. 403-440.
 57. Mishra, S. K. Development, mechanical evaluation and surface characteristics of chitosan/polyvinyl alcohol based polymer composite coatings on titanium metal / S. K. Mishra, S. Kannan // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2014. – Vol. 40. – P. 314-324.
 58. Pyo, S. W. Bone formation on biomimetic calcium phosphate-coated and zoledronate-immobilized titanium implants in osteoporotic rat tibiae / S. W. Pyo, Y. M. Kim, C. S. Kim, I. S., J. U. Park // International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. – 2014. – Vol. 29. – №. 2. – P. 478-484.
 59. Vichery, C. Bioactive glass nanoparticles: from synthesis to materials design for biomedical applications / Vichery C., Nedelec J. M. // Materials. – 2016. – Vol. 9. – №. 4. – P. 288 (17).
 60. Prosolov, K. A. RF magnetron-sputtered coatings deposited from biphasic calcium phosphate targets for biomedical implant applications / K. A. Prosolov, K. S. Popova, O. A. Belyavskaya, J. V. Rau, K. A. Gross, A. Ubelis, Y. P. Sharkeev // Bioactive materials. – 2017. – Vol. 2. – №. 3. – P. 170-176.
 61. Rautray, T. R. Ion implantation of titanium based biomaterials / T. R. Rautray, R. Narayanan, K. H. Kim // Progress in Materials Science. – 2011. – Vol. 56. – №. 8. – P. 1137-1177.
 62. Бутовский, К. Г. Электроплазменное напыление в производстве внутрикостных имплантатов / К. Г. Бутовский, А. В. Лясникова, А. В. Лепилин, Р. В. Пенкин, В. Н. Лясников. – Саратов: Саратовский государственный технический университет, 2006. – 200 с.
 63. Bogyu, E. S. Atmospheric plasma sprayed silica–hydroxyapatite coatings on magnesium alloy substrates / E. S. Bogyu, Z. Károly, R. Barabás // Ceramics International. – 2015. – Vol. 41. – №. 4. – P. 6005-6012.

64. Hidalgo-Robatto, B. M. Pulsed laser deposition of copper and zinc doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications / B. M. Hidalgo-Robatto, M. López-Álvarez, A. S. Azevedo, J. Dorado, J. Serra, N. F. Azevedo, P. González // *Surface and Coatings Technology*. – 2018. – Vol. 333. – P. 168-177.
65. Duta, L. Comparative physical, chemical and biological assessment of simple and titanium-doped ovine dentine-derived hydroxyapatite coatings fabricated by pulsed laser deposition / L. Duta, N. Mihailescu, A. C. Popescu, C. R. Luculescu, I. N. Mihailescu, G.Çetin, O. Gunduz, F. N. Oktarbc, A. C. Popae, A. Kuncser, C. Besleaga, G. E. Stane // *Applied Surface Science*. – 2017. – Vol. 413. – P. 129-139.
66. Hwang I. J. Electrochemical characteristics of Ti-6Al-4V after plasma electrolytic oxidation in solutions containing Ca, P, and Zn ions / I. J. Hwang, H. C. Choe, W. A. Brantley // *Surface and Coatings Technology*. – 2017. – Vol. 320. – P. 458-466.
67. Yerokhin, A. In situ impedance spectroscopy of the plasma electrolytic oxidation process for deposition of Ca-and P-containing coatings on Ti / A. Yerokhin, E. V. Parfenov, A. Matthews // *Surface and Coatings Technology*. – 2016. – Vol. 301. – P. 54-62.
68. Wang, Y. Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys / Y. Wang, H. Yu, C. Chen, Z. Zhao // *Materials & Design*. – 2015. – Vol. 85. – P. 640-652.
69. Bersa, L. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD) / L. Bersa, M. Liu // *Progress in materials science*. – 2007. – Vol. 52. – P. 1–61.
70. He, D. H. HA coating fabricated by electrochemical deposition on modified Ti6Al4V alloy / D. H. He, P. Wang, P. Liu, X. K. Liu, F. C. Ma, J. Zhao // *Surface and Coatings Technology*. – 2016. – Vol. 301. – P. 6-12.
71. Domínguez-Trujillo, C. Sol-gel deposition of hydroxyapatite coatings on porous titanium for biomedical applications / C. Domínguez-Trujillo, C. Peón, E. Chicardi, E. Pérez, H. Rodríguez-Ortiz, J. A. Pavón, J. J. Pavón, J. García-Couce, J. C. Galván, F. García-Moreno, Y. Torres // *Surface and Coatings Technology*. – 2018. – Vol. 333. – P. 158-162.
72. Niu, B. Preparation and characterization of HA sol–gel coating on MAO coated AZ31 alloy / B. Niu, P. Shi, E. Shanshan, D. Wei, Q. Li, Y. Chen // *Surface and Coatings Technology*. – 2016. – Vol. 286. – P. 42-48.
73. Park, K. H. Biomimetic fabrication of calcium phosphate/chitosan nanohybrid composite in modified simulated body fluids / K. H. Park, S. J. Kim, M. J. Hwang, H. J. Song, Y. J. Park // *eXPRESS Polymer Letters*. – 2017. – Vol. 11. – №. 1. – P. 14-20.
74. Koju, N. Biomimetic coating technology for orthopedic implants / N. Koju, P. Sikder, Y. Ren, H. Zhou, S. B. Bhaduri, // *Current opinion in chemical engineering*. – 2017. – Vol. 15. – P. 49-55.
75. Твердохлебов, С. И. Гибридный метод формирования биоконпозитов на поверхности имплантатов из нержавеющей стали / С. И. Твердохлебов, В. П. Игнатов, И. Б. Степанов, Д. О. Сивин, Д. Г. Петлин // *Биотехносфера*. – 2012. – № 5-6 (23-24). – С. 62-68.
76. Li, Z. Two-Level Antibacterial Coating with Both Release-Killing and Contact-Killing Capabilities / D. Lee, X. Sheng, R. E. Cohen, M. F. Rubner // *Langmuir*. – 2006. – №. 22. – P. 9820-9823.
77. Суетенков, Д. Е. Модификация поверхности ортодонтических имплантатов наноконпозитными покрытиями на основе хитозана и металлов / Д. Е. Суетенков, Д. А. Горин, С. А. Портнов, А. Л. Карагайчев, Г. С. Терентюк, А. М. Захаревич, Б. Н. Хлебцов, И. В. Фирсова // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2013. – Т. 9. – № 3. – С. 472-477.

78. Szaraniec, B. Multifunctional polymer coatings for titanium implants / B.Szaraniec, K. Pielichowska, E. Pac, E. Menaszek // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – Vol. 93. – P. 950-957.
79. Chernozem, R. V. Hybrid biocomposites based on titania nanotubes and a hydroxyapatite coating deposited by RF-magnetron sputtering: Surface topography, structure, and mechanical properties / R. V.Chernozem, M. A. Surmeneva, B. Krause, T. Baumbachb, V. P. Ignatov, A. I. Tyurin, K. Loza, M. Epple, R. A. Surmenev // *Applied Surface Science*. – 2017. – Vol. 426. – P. 229-237.
80. Ельцов, С. В. Физическая и коллоидная химия: Учебное пособие / С. В. Ельцов, Н. А. Водолазкая. – Харьков: Изд-во Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, 2005. – 100 с.
81. Pichugin, V. F. Study of physicochemical and biological properties of calcium phosphate coatings prepared by RF magnetron sputtering of silicon-substituted hydroxyapatite / Pichugin, V. F., Surmeneva, M. A., Surmenev, R. A., Khlusov, I. A., Epple, M. // *Journal of surface investigation. X-ray, synchrotron and neutron techniques*. – 2011. – Vol. 5. – №. 5. – P. 863.
82. Surmeneva, M. A. Preparation of a silicate-containing hydroxyapatite-based coating by magnetron sputtering: structure and osteoblast-like MG63 cells in vitro study / M. A. Surmeneva, A. Kovtun, A. Peetsch, S. N. Goroja, A. A. Sharonova, V. F. Pichugin, I. Y. Grubova, A. A. Ivanova, A. D. Teresov, N. N. Koval, V. Buck, A. Wittmar, M. Ulbricht, O. Prymak, M. Epple, R. A. Surmenev // *RSC advances*. – 2013. – Vol. 3. – №. 28. – P. 11240-11246.
83. Surmeneva, M. A. The structure of an RF-magnetron sputter-deposited silicate-containing hydroxyapatite-based coating investigated by high-resolution techniques / M. A. Surmeneva, M. V. Chaikina, V. I. Zaikovskiy, V. F. Pichugin, V. Buck, O. Prymak, R. A. Surmenev // *Surface and Coatings Technology*. – 2013. – Vol. 218. – P. 39-46.
84. Surmeneva, M. A. Effect of silicate doping on the structure and mechanical properties of thin nanostructured RF magnetron sputter-deposited hydroxyapatite films / M. A. Surmeneva, T. M. Mukhametkaliyev, A. I. Tyurin, A. D. Teresov, N. N. Koval, T. S. Pirozhkova, R. A. Surmenev // *Surface and Coatings Technology*. – 2015. – Vol. 275. – P. 176-184.
85. Malakauskaite-Petruleviciene, M. Synthesis and characterization of sol-gel derived calcium hydroxyapatite thin films spin-coated on silicon substrate / M. Malakauskaite-Petruleviciene, Z. Stankeviciute, G. Niaura, A. Prichodko, A. Kareiva // *Ceramics International*. – 2015. – Vol. 41. – №. 6. – P. 7421-7428.
86. Furkó, M. Comparative study on preparation and characterization of bioactive coatings for biomedical applications—A review on recent patents and literature / M. Furkó, K. Balázs, C. Balázs // *Rev. Adv. Mater. Sci.* – 2017. – Vol. 48. – P. 25-51.
87. Уласевич, С. А. Электрохимическое осаждение биоактивных кальцийфосфатных композиционных покрытий / С. А. Уласевич, С. К. Позняк, А. И. Кулак, О. Н. Мусская, С. А. Карпушенков, В. К. Крутько, Л. А. Лесникович. // *Свиридовские чтения*. – 2012. – Vol. 8. – С. 168-176.
88. Aparicio, C. Variation of roughness and adhesion strength of deposited apatite layers on titanium dental implants / C. Aparicio, D. Rodriguez, F. J. Gil // *Materials Science and Engineering: C*. – 2011. – Vol. 31. – №. 2. – P. 320-324.
89. Ntsoane, T. P. Near-surface in vitro studies of plasma sprayed hydroxyapatite coatings / T. P. Ntsoane, R. Bucher // *Powder Diffraction*. – 2011. – Vol. 26. – №. 2. – P. 138-143.
90. Zhao, G. L. Near surface martensitic transformation and recrystallization in a Ti-24Nb-4Zr-7.9 Sn alloy substrate after application of a HA coating by plasma spraying / G. L. Zhao, G. Wen, Y. Song, K. Wu // *Materials Science and Engineering: C*. – 2011. – Vol. 31. – №. 2. – P. 106-113.

91. Man, H. C. Adhesion study of pulsed laser deposited hydroxyapatite coating on laser surface nitrided titanium / H. C. Man, K. Y. Chiu, F. T. Cheng, K. H. Wong // *Thin Solid Films*. – 2009. – Vol. 517. – №. 18. – P. 5496-5501.
92. Boyd, A. R. Sputter deposited bioceramic coatings: surface characterisation and initial protein adsorption studies using surface-MALDI-MS / A. R. Boyd, G. A. Burke, H. Duffy, M. Holmberg, C. O’Kane, B. J. Meenan, P. Kingshott // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2011. – Vol. 22. – №. 1. – P. 71-84.
93. Y. Chen, Silver release from silver-containing hydroxyapatite coatings / Y. Chen, X. Zheng, Y. Xie, H. Ji, C. Ding, H. Li, K. Dai // *Surface and coatings technology*. – 2010. – Vol. 205. – №. 7. – P. 1892-1896.
94. Surmenev, R. A. The release of nickel from nickel–titanium (NiTi) is strongly reduced by a sub-micrometer thin layer of calcium phosphate deposited by rf-magnetron sputtering / K. Ueda, Y. Kawasaki, T. Narushima, T. Goto, J. Kurihara, H. Nakagawa, K. Hiroshi M. Taira // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2010. – Vol. 21. – №. 4. – P. 1233-1239.
95. Ueda, K. Calcium phosphate films with/without heat treatments fabricated using RF magnetron sputtering // *Journal of Biomechanical Science and Engineering*. – 2009. – Vol. 4. – №. 3. – P. 392-403.
96. Coelho, P. G. Corrosion resistance evaluation of a Ca-and P-based bioceramic thin coating in Ti-6Al-4V / P. G. Coelho, S. L. De Assis, I. Costa, V. P. Thompson // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2009. – Vol. 20. – №. 1. – P. 215-222.
97. Huang, Y. In vivo biological responses of plasma sprayed hydroxyapatite coatings with an electric polarized treatment in alkaline solution / Y. Huang, Y. Qu, B. Yang, W. Li, B. Zhang, X. Zhang // *Materials Science and Engineering: C*. – 2009. – Vol. 29. – №. 8. – P. 2411-2416.
98. Cooper, L. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces / L. F. Cooper, T. Masuda, S. W. Whitson, P. Yliheikkilä, D. A. Felton // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. – 1999. – Vol.14. – P. 37-47.
99. Brunette D. M. In Vitro Models of Biological Responses to Implants // *Advances in Dental Research*. – 1999. – Vol. 13. – №1. – P. 35-37.
100. Lazzara, R. J. A human histologic analysis of Osseotite and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces / R. J. Lazzara, T. Testori, P. Trisi, S. S. Porter, R. L. Weinstein // *Int. J. Periodont. Restor. Dent*. – 1999. – Vol.19. – P. 117-129.
101. Параскевич В. Л. Дентальная имплантология: Основы теории и практики // Минск: Юнипресс, 2002. – 368 с.
102. Baschong, W. Surface-induced modulation of human mesenchymal progenitor cells. An in vitro model for early implant integration / W. Baschong, C. Jaquier, I. Martin, T. J. Lambrecht // *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. – 2007. – Vol. 117. – №9. – P. 906-910.
103. Krutyakov, Y. A. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects / Y. A. Krutyakov, A. A. Kudrinskiy, A. Y. Olenin, G. V. Lisichkin // *Russian Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 77. – №. 3. – P. 233.
104. Станишевская, И. Е. Наночастицы серебра: получение и применение в медицинских целях // И. Е. Станишевская, А. М. Стойнова, А. И. Марахова, Я. М. Станишевский // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2016. – №. 1. – С. 66-69.
105. Zhao, L. Antibacterial coatings on titanium implants/ L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu, // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2009. – Vol. 91. – №. 1. – P. 470-480.

106. Iravani, S. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods / S. Iravani, H. Korbekandi, S. V Mirmohammadi, B. Zolfaghari // *Research in pharmaceutical sciences*. – 2014. – Vol. 9. – №. 6. – P. 385.
107. Hong, X. Shape effect on the antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized via a microwave-assisted method / X. Hong, J. Wen, X. Xiong, Y. Hu // *Environmental science and pollution research*. – 2016. – Vol. 23. – №. 5. – P. 4489-4497.
108. Van Dong, P. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles / P. Van Dong, C. H. Ha, J. Kasbohm // *International Nano Letters*. – 2012. – Vol. 2. – №. 1. – P. 9.
109. Morones, J. R. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, M. J. Yacaman // *Nanotechnology*. – 2005. – Vol. 16. – №. 10. – P. 2346.
110. Pal, S. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli* / S. Pal, Y. K Tak, J. M. Song, // *Applied and environmental microbiology*. – 2007. – Vol. 73. – №. 6. – P. 1712-1720.
111. Физическая и коллоидная химия: Учебное пособие / С. В. Ельцов, Н. А. Водолазкая. – Харьков: Изд-во Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, 2005. – 100 с.
112. Физическая и коллоидная химия: Учебное пособие / Б. Э. Крисяк. – М.: Изд-во Рос. экон. акад., 2007. – 150 с.
113. Электрокинетические явления: Учебное пособие / В. Я. Баранов, В. И. Фролов. – М.: Изд-во ФГУП «Нефть и газ», РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина, 2007. – 54 с.
114. Adamczyk, Z. Application of the DLVO theory for particle deposition problems / Z. Adamczyk, P. Weronki // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 1999. – Vol. 83. – №. 1-3. – P. 137-226.
115. Wallat K. Elektrophoretische Abscheidung von thermochromen und bioaktiven Nanopartikeln: Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften / Wallat Katrin. – Essen, 2014. – P. 201.
116. Dörfler, H. D. Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie / H. D. Dörfler. – Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer, 2002. – 989 p.
117. Песков, Н. П. Курс коллоидной химии: Учебник для вузов / Н. П. Песков. – М.: Изд-во Ленинград: Госхимиздат, 1948. – 384 с.
118. Geddes, C. D. Luminescent blinking from silver nanostructures / C. D. Geddes A. Parfenov, I. Gryczynski, J. R. Lakowicz // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2003. – Vol. 107. – №. 37. – P. 9989-9993.
119. Counio, G. CdS: Mn nanocrystals in transparent xerogel matrices: synthesis and luminescence properties / G. Counio, S. Esnouf, T. Gacoin // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1996. – Vol. 100. – №. 51. – P. 20021-20026.
120. Немцева, М. П. Реологические свойства систем: Методические указания к лабораторному практикуму по курсам "Поверхностные явления и дисперсные системы" и "Коллоидная химия" / М.П. Немцева, Д.В. Филиппов. – Иваново: Изд-во ГОУ ВПО Иван. гос. хим.-технол. ун-т, 2006. – 32 с.
121. Connor, E. E. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity / E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, M. D. Wyatt // *Small*. – 2005. – Vol. 1. – №. 3. – P. 325-327.

122. Derfus, A. M. Bhatia, Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots / A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia // *Nano Letters*. – 2004. – Vol. 4. – № 1. – P.11-18.
123. Bosi, S. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications / S. Bosi, T. da Ros, G. Spalluto, M. Prato // *European journal of medicinal chemistry*. – 2003. – Vol. 38. – № 11-12. – P. 913-923.
124. Schubert, D. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective / D. Schubert, R. Dargusch, J. Raitano, S. W. Chan // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2006.-Vol.342. – № 1. – P. 86-91
125. Sakamoto, M. Light as a construction tool of metal nanoparticles: Synthesis and mechanism / M. Sakamoto, M. Fujistuka, T. Majima // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. – 2009. – Vol. 10. – № 1. – P. 33-56.
126. Nguyen, T. B. Silver nanoparticles prepared by laser ablation and their optical characteristics / T. B. Nguyen, T. L. Do, T. H. Nguyen, T. Q. Le // *VNU Journal of Science. Mathematics – Physics*. – 2008. – Vol. 24. – № 1. – P. 1-5.
127. Tsujia, T. Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in polyvinylpyrrolidone solutions / T. Tsujia, D. H. Thanga, Y. Okazakib, M. Nakanishib, Y. Tsuboic, M. Tsujia // *Applied Surface Science*. – 2008. – Vol. 254. – № 16. – P. 5224–5230.
128. Sergeev, B. M. Cryochemical synthesis of bimetallic nanoparticles in the silver–lead–methylacrylate system / B. M. Sergeev, G. B. Sergeev, Y. J. Lee, A. N. Prusov, V. A. Polyakov // *Mendeleev communications*. – 1998. – Vol. 8. – № 1. – P. 1–2.
129. Buzea, C., Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity / C. Buzea, I. I. Pacheco, K. Robbie // *Biointerphases*. – 2007. – Vol. 2. – № 4. – P. MR17 - MR71.
130. Mohanraj, V.J. Nanoparticles – A Review / V.J. Mohanraj, Y. Chen // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. – 2006. – V. 5. – № 1. – P. 561-573.
131. El-Nour, K. M. A. Synthesis and applications of silver nanoparticles / K. M. A. El-Nour, A. A. Eftaiha, A. Al-Warthan, R. A. Ammar // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2010. – Vol. 3. – № 3. – P.135–140.
132. Surmenev, R.A. The influence of the deposition parameters on the properties of an rf-magnetron-deposited nanostructured calcium phosphate coating and a possible growth mechanism / R.A. Surmenev, M.A. Surmeneva, K.E. Evdokimov, V.F. Pichugin, T. Peitsch, M. Epple // *Surface & Coatings Technology*. – 2011. – Vol. 205. – P. 3600–3606.
133. Surmeneva, M. A. Phase and Elemental Composition of Silicon-Containing Hydroxyapatite-Based Coatings Fabricated by RF-Magnetron Sputtering for Medical Implants / M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev, M. V. Chaikina, A. A. Kachaev, V. F. Pichugin, M. Epple // *Inorganic Materials: Applied Research*. – 2013. – Vol. 4. – №3. – P. 227–235.
134. Сурменев, Р. А. Формирование биосовместимых кальций-фосфатных покрытий методом высокочастотного магнетронного распыления: Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук: 01.04.07 / Сурменев Роман Анатольевич. – Томск, 2008. – 164 с.
135. Ivanova, A. A. Influence of deposition conditions on the composition, texture and microstructure of RF-magnetron sputter-deposited hydroxyapatite thin films /A. A. Ivanova, M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev, D. Depla // *Thin Solid Films*. – 2015. – Vol. 591. – P. 368–374.
136. Иванова, А. А. Закономерности формирования текстуры и микроструктуры покрытий на основе гидроксиапатита при осаждении методом высокочастотного магнетронного распыления: Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук: 01.04.07 / Иванова Анна Александровна. – Томск, 2016. – 132 с.

137. Sahoo, P.K. Synthesis of Silver Nanoparticles using Facile Wet Chemical Route / P.K. Sahoo, S.S. Kalyan Kamal, T. Jagadeesh Kumar, B. Sreedhar, A.K. Singh, S.K. Srivastava // *Defence Science Journal*. – 2009. – Vol.59. – №4. – P. 447–455.
138. Boccaccini, A. R. Electrophoretic deposition of carbon nanotubes / A. R. Boccaccini, J. Cho, J. A., Roether, B. J. Thomas, E. J. Minay, M. S. Shaffer // *Carbon*. – 2006. – Vol. 44. – P. 3149-3160.
139. Van der Biest, O.O. Electrophoretic deposition of materials / O.O. Van der Biest, L.J. Vandeperre // *Annu Rev Mater Sci*. – 1999. – Vol. 29. – P. 327-52.
140. Sarkar, P. Electrophoretic deposition (EPD): mechanisms, kinetics, and application to ceramics / P. Sarkar, P.S. Nicholson // *J Am Ceram Soc*. – 1996. – Vol. 79. – №8. – P.1987-2002.
141. Boccaccini, A.R. Application of electrophoretic and electrolytic deposition techniques in ceramics processing / A.R. Boccaccini, I. Zhitomirsky // *Current Opin Solid State Mater Sci*. – 2002. – Vol. 6. – № 3. – P. 251-260.
142. Flegler, S. L. J. W. Heckman, K. L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. – Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1995. – 279 p.
143. Reimer, L. *Raster-Elektronenmikroskopie* / L. Reimer, G. Pfefferkorn. – Berlin: Springer-Verlag, 1977. – 284 p.
144. Goodhew, P. J. *Elektronenmikroskopie: Grundlagen und Anwendung* / P. J. Goodhew, F. J. Humphreys. – Maidenhead: McGraw-Hill, 1994. – 244 p.
145. Atkins, P. W. *Physikalische Chemie* / P. W. Atkins, C. A. Trapp, A. Höpfner. – Weinheim: Wiley-VCH, 2001. – 1106 p.
146. Fujiwara, H. *Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications*. – Tokyo, Japan: John Wiley & Sons Inc, 2007. – 388 p.
147. Miao, L. Spectroscopic ellipsometry analysis of multilayered TiO₂-Ag thin films for photochromic application / L. Miao, T. Jiang, S. Tanemura, M. Tanemura, N. Nabatova-Gabain, G. Xu // *Physica status solidi C*. – 2008. – Vol. 5. – №. 5. – P. 1125-1128.
148. Швец, В.А. Эллипсометрия прецизионный метод контроля тонкопленочных структур с субнанометровым разрешением / В. А. Швец, Е. В. Спесивцев, С. В. Рыхлицкий, Н. Н. Михайле // *Российские нанотехнологии*. – 2009. – Т. 4. – № 3. – С. 72-85.
149. Лупанова, Т.Н. Измерение размеров наночастиц методом динамического рассеяния света: учебное пособие / Т. Н. Лупанова, под ред. Георгиева П. Г. – М.: Центр коллективного пользования ИБГ РАН, 2013. – 60 с.
150. *Zetasizer Nano Series*. – Worcestershire: Malvern Instruments Ltd. – 2004. – 250 p.
151. Михеева, Е. В. Определение электрокинетического потенциала методом электрофореза: методические указания к выполнению лабораторных работ по дисциплинам «Поверхностные явления и дисперсные системы» и «Коллоидная химия», для студентов ХТФ, ФТФ, ЭЛТИ, ИГНД. / Е. В. Михеева, Н. П. Пикула. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2009. – 16 с.
152. *Коллоидная химия: строение двойного электрического слоя, получение и устойчивость дисперсных систем: пособие для студентов химического факультета* / Т. А. Савицкая. – Минск: БГУ, 2011. – 82 с.
153. Domingos, R. F. et al. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes / R. F. Domingos, M. A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. R. Lead, G. G. Leppard, K. J. Wilkinson // *Environmental science & technology*. – 2009. – Vol. 43. – №. 19. – P. 7277-7284.

154. Carr, B. Applications of nanoparticle tracking analysis in nanoparticle research-A mini-review / B.Carr, P. Hole, A. Malloy, P. Nelson, J. Smith // *European Journal of Parenteral Sciences and Pharmaceutical Sciences*. – 2009. – Vol. 14. – №. 2. – P. 45-50.
155. Filipe, V. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates / V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot // *Pharmaceutical research*. – 2010. – Vol. 27. – №. 5. – P. 796-810.
156. Mehrabi, K. Improvements in nanoparticle tracking analysis to measure particle aggregation and mass distribution: a case study on engineered nanomaterial stability in incineration landfill leachates / K. Mehrabi, B. Nowack, Y. Arroyo Rojas Dasilva, D. M. Mitrano // *Environmental science & technology*. – 2017. – Vol. 51. – №10. – P. 5611-5621.
157. Latscha, H. P. *Analytische Chemie: Chemie—Basiswissen III* / H. P. Latscha, H. A. Klein. – Springer-Verlag, 2013. – 476 p.
158. Брицке, М. Э. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ (Методы аналитической химии). – Москва: Изд-во. Химия, 1982. – 224 с.
159. Van Loon, A. J. T. *Analytical atomic absorption spectroscopy: selected methods*. – London: Elsevier, 2012. – 348 p.
160. Dyrda, K. M. *Adhesion Characterization of Hard Ceramic Coatings by the Scratch test*. – Ontario: Queen's University at Kingston, 1999. – 131 p.
161. Sanderson, M. J. *Fluorescence Microscopy* / M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M. D. Bootman // *Cold Spring Harb Protoc*. – 2014. – Vol. 10. – P. 1-36.
162. Derrick, M. R. *Infrared spectroscopy in conservation science* / M. R. Derrick, D. J. M. Stulik. – Los Angeles: Getty Publications, 2000. – 248 p.
163. Chernousova, S. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal / S. Chernousova, M. Epple // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2013. – Vol. 52. – №. 6. – P. 1636-1653.
164. Ahlberg, S. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments / S. Ahlberg, A. Antonopulos, J. Diendorf, R. Dringen, M. Epple, R. Flöck, R. Zellner // *Beilstein journal of nanotechnology*. – 2014. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1944-1965.
165. Pathak, P. Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery / P. Pathak, M. Nagarsenker // *Aaps Pharmscitech*. – 2009. – Vol. 10. – №. 3. – P. 985-992.
166. Kashanian, S. New surface-modified solid lipid nanoparticles using N-glutaryl phosphatidylethanolamine as the outer shell / S. Kashanian, A. H. Azandaryani, K. Derakhshandeh // *International journal of nanomedicine*. – 2011. – Vol. 6. – P. 2393-2401.
167. Besra L. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD) / Besra, M. Liu // *Progress in materials science*. – 2007. – Vol. 52. – №. 1. – P. 1-61.
168. Amrollahi P. *Electrophoretic deposition (EPD): Fundamentals and applications from nano-to micro-scale structures* / P. Amrollahi, J. S. Krasinski, R. Vaidyanathan, L. Tayebi, D. Vashae. – *Handbook of Nanoelectrochemistry*, Springer International Publishing Switzerland. – 2015. – 2000 p.
169. Moreno R. Nanoparticles dispersion and the effect of related parameters in the EPD kinetics / R. Moreno, B. Ferrari // *Electrophoretic deposition of nanomaterials*. – 2011. – P. 73-128.
170. Тепанов, А. А. – Адсорбционная иммобилизация наночастиц серебра: закономерности и применение в химическом анализе: Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук: 02.00.04 / Тепанов Александр Александрович, Москва – 2015. – 141 с.

171. Литвинова, В. А. Оптические свойства наноразмерных стекловидных пленок оксидов кремния и тантала: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук : 01.04.04 / Литвинова Виктория Александровна. – Томск, 2010. – 24 с.
172. Григорьев, Ф. И. Осаждение тонких пленок из низкотемпературной плазмы и ионных пучков в технологии микроэлектроники: учебное пособие / Ф.И. Григорьев. – М. : Гос. ин-т электроники и математики. – 2006. – 35 с.
173. Tompkins, H. Handbook of ellipsometry / H. Tompkins, E. A. Irene. – NY: William Andrew, 2005. – 886 p.
174. Гончаров, А. А. Синтез нанокристаллических пленок диоксида титана в цилиндрическом газовом разряде магнетронного типа и их оптическая характеристика / А. А. Гончаров, А. Н. Евсюков, Е. Г. Костин, Б. В. Стеценко, Е. К. Фролова, А. И. Щуренко // Журнал технической физики. – 2010. – Т. 80. – №. 8. – С. 127-135.
175. Маракушев, А. А. Петрология. I. Основы кристаллооптики и породообразующие минералы / А. А. Маракушев, А. В. Бобров, Н. Н. Перцев, А. Н. Феногенов. – М.: Научный Мир. – 2000. – 316 с.
176. Риттер, Э. Пленочные диэлектрические материалы для оптических применений / Э. Риттер // Физика тонких пленок. – 1978. – Т. 2. – С. 7-60.
177. Киселева Д. В. Особенности структуры неорганической компоненты ископаемых и современных костных остатков по данным ИК-спектроскопии и микроскопии // Труды Института геологии и геохимии им. академика АН Заварицкого. – 2009. – №. 156. – С. 312-317.
178. Киселева, Д. В. Особенности состава, структуры и свойств ряда фосфатных и карбонатных биоминеральных образований: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата геолого-минералогических наук: 25.00.05 / Киселева Дарья Владимировна. – Екатеринбург, 2007. – 28 с.
179. Сурменев, Р. А. Зависимость свойств магнетронных Ca-P покрытий, сформированных из плазмы ВЧ-разряда, от параметров напыления / Р. А. Сурменев, М. А. Сурменева, К. Е. Евдокимов, В. Ф. Пичугин, М. Эппле // Физика и химия обработки материалов – 2010. – № 4 – С.57–65
180. Smith, C. I. Diagenesis and survival of osteocalcin in archaeological bone / C. I. Smith, O. E. Craig, R. V. Prigodich, C. M. Nielsen-Marsh, M. M. E. Jans, C. Vermeer, M. J. Collins // Journal of Archaeological Science. – 2005. – Vol. 32. – №. 1. – P. 105-113.
181. Surmeneva, M. A. Fabrication, ultra-structure characterization and in vitro studies of RF magnetron sputter deposited nano-hydroxyapatite thin films for biomedical applications / M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev, Y. A. Nikonova, I. I. Selezneva, A. A. Ivanova, V. I. Putlyayev, O. Prymak, M. Epple, // Applied Surface Science. – 2014. – Vol. 317. – P. 172-180.
182. Sadat-Shojai, M. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures / M. Sadat-Shojai, M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi // Acta biomaterialia. – 2013. – Vol. 9. – №. 8. – P. 7591-7621.
183. Siebers, M. C. The influence of the crystallinity of electrostatic spray deposition-derived coatings on osteoblast-like cell behavior, in vitro / M. C. Siebers, X. F. Walboomers, S. C. G. Leeuwenburgh, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen // 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. – 2006. – Vol. 78. – №. 2. – P. 258-267.

184. Chang, Y. L. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: Implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation / Y. L. Chang, C. M. Stanford, J. C. Keller // *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. 52. – №. 2. – P. 270-278.
185. Hu, Q. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells / Q. Hu, Z. Tan, Y. Liu, J. Tao, Y. Cai, M. Zhang, H. Pan, X. Xu, R. Tang // *Journal of Materials Chemistry.* – 2007. – Vol. 17. – №. 44. – P. 4690-4698.
186. Ter Brugge, P. J. Effect of calcium phosphate coating composition and crystallinity on the response of osteogenic cells in vitro / P. J. Ter Brugge, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen // *Clinical oral implants research.* – 2003. – Vol. 14. – №. 4. – P. 472-480.
187. Chou, L. Effects of hydroxylapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro / L. Chou, B. Marek, W. R. Wagner // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20. – №. 10. – P. 977-985.
188. Berube, P. The effect of sputtered calcium phosphate coatings of different crystallinity on osteoblast differentiation / P. Berube, Y. Yang, D. L. Carnes, R. E. Stover, E. J. Boland, J. L. Ong // *Journal of periodontology.* – 2005. – Vol. 76. – №. 10. – P. 1697-1709.
189. Иванова, Е. С. Адгезионная прочность ВЧ-магнетронного кремний-содержащего кальций фосфатного покрытия / Е. С. Иванова, А. А. Иванова, М. А. Сурменова // *Перспективы развития фундаментальных наук: сборник научных трудов X Международной конференция студентов и молодых ученых (23–26 апреля 2013, Томск, Россия) –2013.–С. 77–79.*
190. Pichugin, V. F. The preparation of calcium phosphate coatings on titanium and nickel–titanium by rf-magnetron-sputtered deposition: composition, structure and micromechanical properties / V. F. Pichugin, R. A. Surmenev, E. V. Shesterikov, M. A. Ryabtseva, E. V. Eshenko, S. I. Tverdokhlebov, O. Prymak, M. Epple // *Surface and Coatings Technology.* – 2008. – Vol. 202. – №. 16. – P. 3913-3920.
191. Surmeneva, M. A. Effect of silicate doping on the structure and mechanical properties of thin nanostructured RF magnetron sputter-deposited hydroxyapatite films / M. A. Surmeneva, T. M. Mukhametkaliyev, A. I. Tyurin, A. D. Teresov, N. N. Koval, T. S. Pirozhkova, I. A. Shuvarin, A. V. Shuklinov, A. O. Zhigachev, C. Oehr, R. A. Surmenev // *Surface and Coatings Technology.* – 2015. – Vol. 275. – P. 176-184.
192. Loza, K. The predominant species of ionic silver in biological media is colloiddally dispersed nanoparticulate silver chloride / K. Loza, C. Sengstock, S. Chernousova, M. Köller, M. Epple // *RSC Advances.* – 2014. – Vol. 4. – №. 67. – P. 35290-35297.
193. Ivanova, A. A. Hybrid biocomposite with a tunable antibacterial activity and bioactivity based on RF magnetron sputter deposited coating and silver nanoparticles / A. A. Ivanova, R. A. Surmenev, M. A. Surmeneva, T. Mukhametkaliyev, K. Loza, O. Prymak, M. Epple, // *Applied Surface Science.* – 2015. – Vol. 329. – P. 212-218.
194. Iskandar, M. E. The effects of nanostructured hydroxyapatite coating on the biodegradation and cytocompatibility of magnesium implants / M. E. Iskandar, A. Aslani, H. Liu // *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* – 2013. – Vol. 101. – №. 8. – P. 2340-2354.
195. Greulich, C. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range / C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Epple, M. Köller // *RSC advances.* – 2012. – Vol. 2. – №. 17. – P. 6981-6987.

196. Necula, B. S. In vitro cytotoxicity evaluation of porous TiO₂-Ag antibacterial coatings for human fetal osteoblasts / B. S. Necula, J. P. T. M. Van Leeuwen, L. E. Fratila-Apachitei, S. A. J. Zaat, I. Apachitei, J. Duszczuk // *Acta biomaterialia*. – 2012. – Vol. 8. – №. 11. – P. 4191-4197.
197. Yan, Y. Growth behavior of rat bone marrow cells on RF magnetron sputtered hydroxyapatite and dicalcium pyrophosphate coatings / Y. Yan, J. G. C. Wolke, A. De Ruijter, L. Yubao, J. A. Jansen // *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*. – 2006. – Vol. 78. – №. 1. – P. 42-49.
198. Tosun, B. S. Sputter deposition of semicrystalline tin dioxide films / B. S. Tosun, R. K. Feist, A. Gunawan, K. A. Mkhoyan, S. A. Campbell, E. S. Aydil // *Thin Solid Films*. – 2012. – Vol. 520. – №. 7. – P. 2554-2561.
199. Zhang, M. A study of the microstructure evolution of hard Zr-B-C-N films by high-resolution transmission electron microscopy / M. Zhang, J. Jiang, J. Houška, J. Kohout, J. Vlček, E. I. Meletis // *Acta materialia*. – 2014. – Vol. 77. – P. 212-222.
200. Harges, J. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans / J. Harges, H. Ahrens, C. Gebert, A. Streitbuerger, H. Buerger, M. Erren, A. Günsel, C. Wedemeyer, G. Saxler, W. Winkelmann, G. Gosheger // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28. – №. 18. – P. 2869-2875.
201. Alt, V. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement / V. Alt, T. Bechert, P. Steinrucke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25. – №. 18. – P. 4383-4391.
202. Agarwal, A. Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells / A. Agarwal, T.L. Weis, M.J. Schurr, N.G. Faith, C.J. Czuprynski, J.F. McAnulty, C.J. Murthy, N.L. // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – №. 4. – P. 680-690.
203. Bosetti, M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity / M. Bosetti, A. Masse, E. Tobin, M. // *Biomaterials*. – 2002. – Vol. 23. – №. 3. – P. 887-892.
204. Vernè, E. Surface characterization of silver-doped bioactive glass / E. Verne, S.D. Nunzio, M. Bosetti, P. Appendino, C.V. Brovarone, G. Maina, M. // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – №. 25. – P. 5111-5119.
205. Hulshoff, J. E. G. Biological evaluation of the effect of magnetron sputtered Ca/P coatings on osteoblast-like cells in vitro / J.E.G. Hulshoff, K. van Dijk, J.P.C.M. van Der Waerden, J.G.C. Wolke, L.A. Ginsel, J.A. Jansen // *Journal of biomedical materials research*. – 1995. – Vol. 29. – №. 8. – P. 967-975.
206. Ter Brugge, P. J. Effect of calcium phosphate coating composition and crystallinity on the response of osteogenic cells in vitro / P.J. Ter Brugge, J.G.C. Wolke, J.A. Jansen // *Clinical oral implants research*. – 2003. – Vol. 14. – №. 4. – P. 472-480.

ПРИЛОЖЕНИЕ А АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КАНДИДАТСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ В УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИШХБМТ
М.Е. Трусова
2023 г.

АКТ внедрения результатов кандидатской диссертации Шароновой Анны Александровны в учебный процесс

Настоящим подтверждается, что результаты диссертационной работы Шароновой Анны Александровны на тему «Формирование функционального многослойного биокompозита на основе наночастиц серебра и гидроксипатита на поверхности титана для медицинского применения», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по научным специальностям 1.3.8 «Физика конденсированного состояния» и 2.2.12 «Приборы, системы и изделия медицинского назначения», используются в учебном процессе в Инженерной школе химических и биомедицинских технологий Национального исследовательского Томского политехнического университета при изучении дисциплины «Материалы и покрытия биомедицинского назначения» для магистров по направлению 18.04.01 «Химическая технология».

Координатор ОД
д.х.н., Профессор

С.В. Романенко

д.т.н., Профессор ИШХБМТ

Р.А. Сурменев

ПРИЛОЖЕНИЕ Б АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ В НАУЧНО -ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИШХБМТ
М.Е. Трусова
2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Шароновой Анны Александровны на тему «Формирование функционального многослойного биокompозита на основе наночастиц серебра и гидроксипатита на поверхности титана для медицинского применения» на соискание степени кандидата технических наук по научным специальностям 1.3.8 «Физика конденсированного состояния» и 2.2.12 «Приборы, системы и изделия медицинского назначения»

Настоящим актом удостоверяется, что результаты диссертационной работы, научной статьи (Surface functionalization of titanium with silver nanoparticles, A Sharonova et al 2019 J. Phys.: Conf. Ser. 1145 012032) Шароновой Анны Александровны, были использованы в научно-исследовательской деятельности ИШХБМТ для выполнения работ по проекту ГЗ НАУКА № 11.7293.2017/8.9 «Фундаментальные основы новых высокотехнологичных способов детерминированного микро- и наноструктурирования поверхностных свойств “умных” 2D-подложек и 3D-скэффолдов следующего поколения для медицинской практики».

Руководитель проекта

к.ф.-м.н.

М.А. Сурменова