

УДК 539.232

DOI: 10.17223/24135542/19/3

**А.А. Волохова^{1,3}, Е.А. Солдатова³, Е.Г. Чурина^{1,2},
О.А. Лапуть¹, С.И. Твердохлебов³**

¹ *Национальный исследовательский Томский государственный университет
(г. Томск, Россия)*

² *Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Россия)*

³ *Национальный исследовательский Томский политехнический университет
(г. Томск, Россия)*

Применение электролитов с растворенными биodeградируемыми полимерами для получения биоактивных кальций-фосфатных покрытий методом микродугового оксидирования

Сегодня металлические имплантаты различного назначения являются неотъемлемой частью хирургической практики в травматологии и ортопедии. Между тем случаи отторжения имплантата обычны, а скорость роста новой кости на необработанной металлической поверхности низка. Темп выздоровления пациента напрямую зависит от скорости регенерации тканей организма, которая определяется поведением клеток в месте операции. Одним из предлагаемых решений является использование биоактивных покрытий, улучшающих биосовместимость имплантатов, а также пролиферацию и адгезию клеток.

Широко распространенный ресурс таких покрытий – фосфаты кальция различного происхождения, например полученные путем микродугового оксидирования. Среди способов получения покрытий большой интерес вызвал метод микродугового оксидирования (МДО). Метод МДО позволяет получить пористое шероховатое покрытие с заданным химическим составом, которое играет важную роль в процессе остеоиндукции. Однако хрупкость полученных покрытий порой значительно отличается от хрупкости имплантата и кости. Таким образом, механические несоответствия могут повлиять на целостность полученного покрытия во время имплантации.

В работе предложен способ формирования гибридных кальций-фосфатных покрытий методом микродугового оксидирования с использованием электролита на основе окиси кальция с примесью диспергированных частиц гидроксиапатита и соразтворенных биodeградируемых полимеров: хитозана, поливинилпирролидона и гиалуроновой кислоты. Предполагается, что полимеры будут действовать как пластификатор. Полученные покрытия являются кальций-дефицитными и высокопористыми. Показано, что введение полимеров в раствор электролита позволяет улучшить эластичность, удельное количество и средний диаметр пор, а также не приводит к ухудшению биосовместимости покрытий.

Ключевые слова: микродуговое оксидирование, биodeградируемые полимеры, кальций-фосфатные покрытия, макрофаги, костные имплантаты.

Введение

Несмотря на бурное развитие отрасли медицинского материаловедения, разработку современных тканеинженерных материалов на основе полимеров, биоактивных стекол и керамики, металлы и изделия на их основе все еще занимают лидирующее положение в сферах регенеративной и восстановительной медицины. Особенный интерес представляют костные имплантаты, а также изделия, обеспечивающие формирование устойчивого каркаса для регенерации тканей – штифты, спицы, пластины и пр. [1–3].

Среди прочих титан и его сплавы, вследствие высокой химической стойкости и доказанной совместимости с тканями организма, являются одними из наиболее распространенных металлических материалов, предназначенных для изготовления имплантатов различного назначения [1, 4–5]. Большинство изделий изготавливается из сплавов ВТ1-0 и ВТ6, однако в последние годы некоторыми исследователями было показано, что использование сплава ВТ6 приводит к накоплению в организме токсичных веществ и негативным эффектам, связанным с наличием в сплаве ванадия [6]. ВТ1-0, представляющий собой чистый титан (99,24–99,7% Ti), этого недостатка лишен.

Улучшение свойств титановых имплантатов предполагает работу по изменению свойств их поверхности: нанесение защитных покрытий, предотвращающих коррозию материала [2], увеличение значения шероховатости поверхности, что обеспечивает лучшую клеточную адгезию и пролиферацию [7], а также нанесение биоактивных керамических покрытий для ускорения формирования костной ткани [8].

Кальций-фосфатные (КФ) покрытия, получаемые на поверхности титана методом микродугового оксидирования (МДО), удовлетворяют указанным выше требованиям. Метод МДО позволяет получить биоактивные высокопористые покрытия. Показано, что МДО КФ-покрытия способствуют ускорению регенерации костной ткани за счет постепенного растворения керамического слоя и высвобождения ионов Са и Р [1, 2, 9].

Сущность метода МДО заключается в возникновении на поверхности металлического объекта, используемого в качестве анода, помещенного в раствор электролита, микроплазменных разрядов с высокими локальными давлениями и температурами. Причина возникновения разрядов состоит в превышении напряженностью электрического поля на границе раздела металл–электролит ее диэлектрической прочности вследствие пропускания через границу тока большой плотности. Микроплазменные разряды индуцируют химические реакции образования на поверхности металла оксидного слоя, состав которого зависит от металла основы и состава электролита. Варьируя технологические режимы, можно получать покрытия различных толщин, состава, морфологии и с разными физико-механическими свойствами [10].

Между тем у вышеописанных покрытий имеется существенный недостаток в виде пониженной трещиностойкости [11], что способно привести

к отслоению покрытий в процессе установки и последующей эксплуатации. Мелкие частицы покрытия представляют опасность для организма, нарушается геометрия изделия.

Для решения проблемы предлагается, в частности, введение в состав покрытия пластификаторов, которые повышают его эластичность. Свойства пластификатора должны, в свою очередь, соответствовать требованиям к имплантируемым биоматериалам, а также не препятствовать наращению новой ткани и растворению керамического слоя.

В качестве таких пластификаторов с успехом могут быть применены биodeградируемые и биорезорбируемые полимеры. Подобные материалы полностью разлагаются в организме до нетоксичных компонентов, биосовместимы, продукты распада полностью элиминируются из организма (резорбируются) либо материалы выводятся в неизменном виде. Более того, полимеры известны своей пластичностью и эластичностью в силу химического строения молекул.

После того как имплантат с улучшенными физико-химическими и механическими свойствами создан, необходимо оценить его иммунологический потенциал, так как успешная интеграция его в организме возможна только при отсутствии острого воспалительного ответа или аллергической реакции [12, 13]. Первоначально, до тестирования на животных объектах, проводятся иммунологические исследования на клеточных культурах, т.е. *in vitro*.

Среди всех клеток иммунной системы, включающих в себя нейтрофилы, базофилы, натуральные киллеры и прочие, макрофаги первыми вступают во взаимодействие с поверхностью имплантата и поэтому играют ключевую роль в иммунном ответе [14].

В данной работе представлены результаты изучения физико-химических и механических свойств покрытий для титановых имплантатов на основе фосфатов кальция, полученных методом микродугового оксидирования, и водорастворимых полимеров – поливинилпирролидона, гиалуроновой кислоты и хитозана, а также исследованы взаимодействия покрытий с первичными макрофагами человека для оценки иммунной активности.

Материалы и методы исследования

Получение экспериментальных образцов

Объектом исследования являются образцы титана марки ВТ1-0 с кальций-фосфатными покрытиями, сформированными методом микродугового оксидирования.

Для физико-механических исследований были изготовлены образцы из титана ВТ1-0 в виде пластин размером $60 \times 20 \times 0,5$ мм. Подготовка поверхности образцов перед нанесением покрытий включала очистку в ультразвуковой ванне в дистиллированной воде и химическое травление в водном растворе азотной и плавиковой кислот, взятых в объемных отношениях $\text{HN}:\text{HF}:\text{H}_2\text{O}=1:2,5:2,5$, при температуре $15\text{--}20^\circ\text{C}$ в течение $10\text{--}15$ с

с последующей нейтрализацией в 1 мас. %-ном водном растворе гидроксида натрия и многократной промывкой дистиллированной водой.

Формирование кальций-фосфатных покрытий (CaP) методом микродугового окислирования на установке, разработанной в НИ ТПУ, проводилось в насыщенном растворе CaO в 10%-ном H_3PO_4 с дополнением дисперсионной фазой гидроксиапатита с размером частиц до 70 мкм. Дополнительно электролит содержал: 15 мас. % (г/л электролита) хитозана ($M_w = 200$ кДа, производитель «Биопрогресс», Россия) – группа «CaP + X», или 5 мас. % гиалуроновой кислоты ($M_w = 380$ кДа, производитель Sinopharm Chemical Reagent Co., LTD, Китай) – группа «CaP + ГК», или 15 мас. % поливинилпирролидона (среднемолекулярный медицинский, молярная масса $M_w = 35\,000 \pm 5\,000$ г/моль, производитель BASF, Германия) – группа «CaP + ПВП». Покрытие формировали при напряжении 190 В со скоростью подъема напряжения 3 В/с, с частотой следования импульсов 50 Гц и длительностью импульса 9,7 мс в течение 20 мин. Процесс вели при температуре 15°C.

Морфология поверхности, пористость

Исследования морфологии поверхности скаффолдов до и после обработки проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе VEGA 3 (TESCAN, Чехия). Предварительно на образцы был нанесен тонкий (~ 10 нм) слой золота SC7640 (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) для обеспечения контакта с токопроводящей подложкой и избежания накопления заряда на поверхности образцов в процессе исследования.

Измерение шероховатости и толщины покрытий

Исследования шероховатости поверхности имплантатов проводили с применением контактного профилометра Talysurf 5-120 (Taylor-Hobson, Великобритания) в двух перпендикулярных направлениях. По профилограммам рассчитывали значение среднего арифметического из абсолютных значений отклонений профиля в пределах базовой длины (R_a). Расчет параметра R_a проводили в соответствии с рекомендациями ГОСТ 2789–73 «Шероховатость поверхности. Параметры и характеристики». За значение параметра R_a каждой из исследуемых групп принимали среднее арифметическое значение, полученное по результатам шести измерений.

Измерение толщины покрытий проводили с использованием прибора для измерения геометрических параметров Константа К5 (ООО «Константа», Россия) в 10 точках для каждого образца. Толщину покрытий, нанесенных на изделия сложной формы, можно контролировать с помощью вихретокового фазового, вихретокового параметрического и импульсного индукционного методов. Все перечисленные методы заложены в основу прибора Константа К5.

Исследование адгезионных свойств покрытий

Исследование адгезионных свойств полученных покрытий производилось методом контролируемого нанесения царапины на образец при помощи алмазного индентора на приборе Micro-Scratch Tester MST-S-AX-0000 (CSM Instruments SA, Швейцария): нагружение от 0 до 30 Н, три царапины

на каждом образце, по два образца из каждой группы. Определялось нагружение, соответствующее началу деформации покрытия и полному его разрушению. Микрофотография царапин получалась на встроенном оптическом микроскопе.

Энергодисперсионный анализ (EDAX)

Изучение химического состава поверхности образцов проводилось методом энергодисперсионного анализа с помощью сканирующего электронного микроскопа JCM-6000 (JEOL, Япония), оснащенного встроенным энергодисперсионным анализатором. Полуколичественное определение химического состава покрытия проводили методом трех поправок: на средний атомный номер, поглощение и флуоресценцию.

Исследование микротвердости покрытий

Твердость индентирования и модуль Юнга сформированных композиционных покрытий определяли по методу индентирования, предложенному В. Оливером и Г. Фарром [15], на установке Nanoindenter G200 (Agilent's Electronic Measurement, США). Индентирование выполнялось с использованием трехгранной пирамиды Берковича. Расчет модуля Юнга и твердости индентирования на основании диаграммы нагружения проводился в автоматическом режиме согласно ISO14577. В ходе механических испытаний была определена оптимальная величина нагрузки на индентор, позволяющая исключить влияние титановой подложки на механические характеристики тонких композиционных покрытий. При выбранной нагрузке 5 мН индентирование производилось на глубину до 10% от толщины всех испытываемых покрытий. Тем самым, выполняя индентирование на глубину не более 10% от полной толщины покрытия, влияние подложки на механические характеристики покрытий было гарантированно исключено [2].

Иммунологические исследования

Первичные моноциты человека были выделены из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы индивидуальных здоровых доноров. Каждому донору был присвоен уникальный идентификационный номер. Выделение и культивирование CD14⁺ моноцитов и исследование жизнеспособности моноцитов были проведены согласно протоколу, опубликованному нами ранее [16]. Для оценки иммунной активности материалов исследовали их влияние на секрецию цитокинов: провоспалительных – TNF α (фактор некроза опухоли α), интерлейкин IL-6, и противовоспалительных – интерлейкинов IL-1 β и IL-10. В работе представлены результаты анализа для трех индивидуальных доноров.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния состава электролита на морфологию и состав кальций-фосфатных покрытий

Анализ изображений поверхности образцов с покрытиями, сформированными в электролитах различного состава, полученных с помощью СЭМ (рис. 1), и данных контактной профилометрии выявил, что наиболь-

шей шероховатостью (по параметру R_a) обладают покрытия, сформированные в кальций-фосфатном электролите с добавлением хитозана (табл. 1). Наименьшие значения шероховатости (по параметру R_a) показали покрытия, сформированные электролите с добавлением гиалуроновой кислоты.

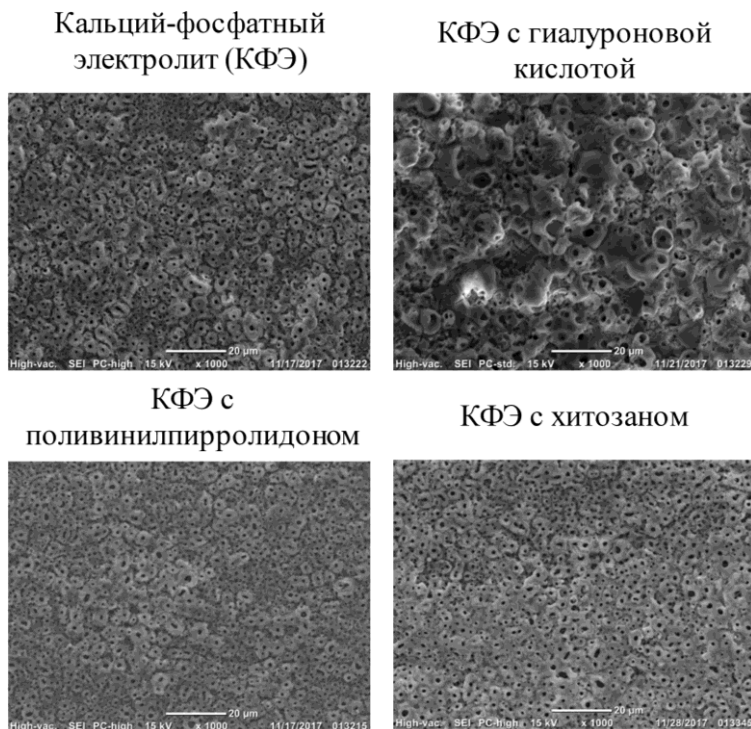


Рис. 1. СЭМ поверхности образцов титана с кальций-фосфатным покрытием, сформированным методом МДО

Таблица 1

Шероховатость поверхности образцов с покрытиями, сформированными в электролитах различного состава, до и после микродугового оксидирования

Образец	До МДО (подложка Ti)		После МДО	
	R_a , мкм	R_z , мкм	R_a , мкм	R_z , мкм
CaP	$0,55 \pm 0,20$	$3,48 \pm 0,20$	$0,68 \pm 0,30$	$3,89 \pm 0,10$
CaP + ГК	$0,67 \pm 0,10$	$4,69 \pm 0,10$	<u>$0,45 \pm 0,20$</u>	$2,83 \pm 0,20$
CaP + ПВП	$0,40 \pm 0,10$	$3,07 \pm 0,10$	$0,51 \pm 0,20$	$3,46 \pm 0,20$
CaP + X	$0,55 \pm 0,40$	$3,14 \pm 0,70$	$0,75 \pm 0,20$	$3,50 \pm 0,30$

Проведенное количественное исследование морфологических характеристик сформированных на поверхности титановых пластин покрытий (количество пор, средний диаметр пор) показало, что наиболее пористой поверхностью из всех исследуемых покрытий обладают покрытия, сформированные в кальций-фосфатном электролите с добавлением хитозана и ПВП (табл. 2).

Таблица 2

Количество и диаметр пор на поверхности образцов

Образец	Толщина покрытия, мкм	Количество пор на 1 500 мкм ² , шт.	Диаметр пор, мкм
CaP	3,2 ± 0,3	570 ± 127	1,18 ± 0,54
CaP+ ГК	17,7 ± 1,1	916 ± 32	2,51 ± 0,91
CaP + ПВП	3,1 ± 0,2	1 330 ± 152	1,44 ± 0,91
CaP + X	2,4 ± 0,5	2 817 ± 319	1,60 ± 0,50

В свою очередь, наименьшим удельным количеством пор характеризуются покрытия, сформированные в кальций-фосфатном электролите без добавления полимеров. Таким образом, поры присутствуют на 70% поверхности покрытий, сформированных в кальций-фосфатном электролите, и на 94–99% поверхности покрытий, сформированных в кальций-фосфатном электролите с добавлением различных полимеров. При этом следует отметить, что размер пор в покрытиях, сформированных в кальций-фосфатном электролите с добавлением гиалуроновой кислоты, превышает соответствующие значения для покрытий, сформированных с использованием остальных электролитов.

Данные элементного анализа исследуемых покрытий, полученные методом EDAX, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Элементный состав покрытий, сформированных в различных электролитах

Образец	C, ат. %	O, ат. %	Al, ат. %	P, ат. %	Ca, ат. %	Ti, т. %	Ca/P
CaP	9,9 ± 1,7	68,5 ± 1,2*	0,6 ± 0,6*	9,3 ± 0,2*	1,5 ± 0,2*	11,3 ± 0,6*	0,16
CaP+ ГК	14,0 ± 2,3	63,9 ± 1,4*	2,2 ± 0,1*	11,4 ± 0,2*	4,5 ± 0,2*	3,6 ± 0,3*	0,41
CaP + ПВП	10,5 ± 0,5	66,9 ± 0,4	1,10 ± 0,04	8,7 ± 0,2*	1,5 ± 0,2	11,3 ± 0,4	0,17
CaP + X	12,4 ± 0,5	65,2 ± 0,3*	0,97 ± 0,02	9,3 ± 0,2*	2,4 ± 0,2*	9,7 ± 0,4*	0,25

* p < 0,05.

Особое внимание необходимо уделить содержанию таких элементов, как Ca и P. Эталонное значение соотношения этих элементов соответствует стехиометрическому соотношению в гидроксиапатите. Отношение кальция к фосфору в природном гидроксиапатите – 1,67.

Все полученные покрытия являются кальций-дефицитными. Содержание кальция в покрытиях, сформированных в электролитах с добавлением гиалуроновой кислоты и хитозана, превышает содержание этого элемента в покрытиях, сформированных с использованием других электролитов. Подобная тенденция наблюдается и по отношению к фосфору. Увеличенное содержание Ca и P, наблюдаемое в случаях использования электролитов, содержащих гиалуроновую кислоту и хитозан, может быть обусловлено несколькими причинами. Одной из них может являться изменение толщины формируемых кальций-фосфатных покрытий при использовании различных полимеров.

Таким образом, убедительно показано, что добавление к исходному кальций-фосфатному электролиту ПВП и хитозана приводит к формированию кальций-фосфатных покрытий с пористостью выше 90%. Высокая

собственная пористость покрытия обеспечивает увеличение площади контакта с тканями организма и биологическими жидкостями.

Исследование влияния состава электролита на механические свойства кальций-фосфатных покрытий

Для изучения механических свойств полученных покрытий был проведен скретч-тест, позволяющий оценить адгезию полученных покрытий к титановой подложке. Результаты теста представлены в табл. 4 и на рис. 2.

Таблица 4

Результаты определения критических значений нагрузки царапания

Тип материала	Нагрузка, Н	
	Начало деформации	Разрушение
CaP	$1,51 \pm 1,05$	$2,84 \pm 0,95$
CaP + ГК	$2,44 \pm 0,33$	$5,46 \pm 1,31$
CaP + ПВП	$1,91 \pm 0,92$	$3,47 \pm 0,91$
CaP + X	$2,1 \pm 0,40$	$2,9 \pm 0,59$

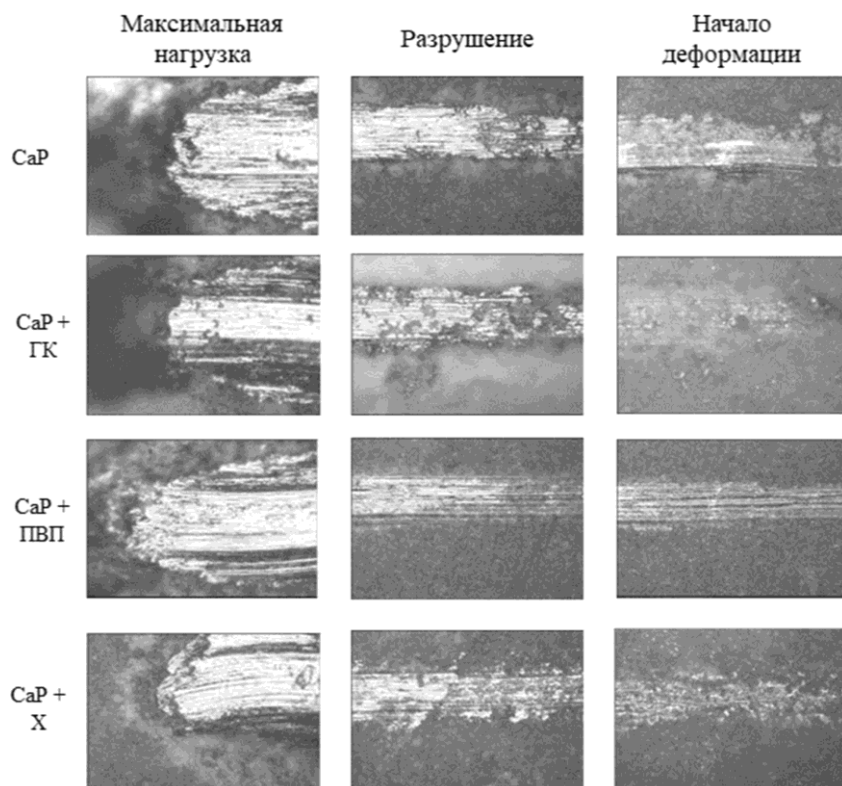


Рис. 2. Результаты скретч-теста образцов титана с кальций-фосфатными покрытиями и полимер / кальций-фосфатными покрытиями

Из рис. 2 видно, что для каждой группы образцов производилась постепенная деформация покрытия с постепенным увеличением нагрузки до его полного разрушения.

Для всех полученных образцов нагрузка, необходимая для начала деформации покрытия, повышается при пропитке МДО-покрытия полимерным раствором. При этом наибольшее увеличение наблюдается для образцов типа CaP + ГК, что однозначно связано с большей толщиной полученного покрытия. Величина, соответствующая началу деформации, характеризует сопротивление покрытия истирающей нагрузке. Таким образом, введение в раствор электролитов полимеров увеличивает эластичность покрытий и может положительно сказаться на эксплуатационных характеристиках медицинских изделий, изготовленных из предлагаемых к рассмотрению композитных материалов.

Помимо адгезионных свойств полученных покрытий, в данной работе также исследовалась микротвердость покрытий. Результаты наноиндентирования представлены в табл. 5.

Таблица 5

Механические характеристики композиционных покрытий

Образец	Ет, ГПа	Нт, ГПа
CaP	57,3 ± 18,2	2,7 ± 1,4
CaP + ГК	20,2 ± 11,7	0,6 ± 0,2
CaP + X	61,4 ± 17,4	2,3 ± 1,3
CaP + ПВП	51,3 ± 16	1,9 ± 0,6

Как видно из табл. 5, модуль Юнга получаемых покрытий не меняется в пределах погрешности измерений при введении в состав электролита хитозана и поливинилпирролидона, однако введение гиалуроновой кислоты снижает как модуль Юнга, так и твердость индентирования, причем в большей мере снижается твердость индентирования. Полученные результаты коррелируют с результатами скретч-теста: покрытие с ГК оказалось более толстым, эластичным и, соответственно, более упругим.

Исследование жизнеспособности клеток

Результаты исследования жизнеспособности M0, M1 и M2 макрофагов, сокультивированных с исследуемыми материалами, представлены на рис. 3.

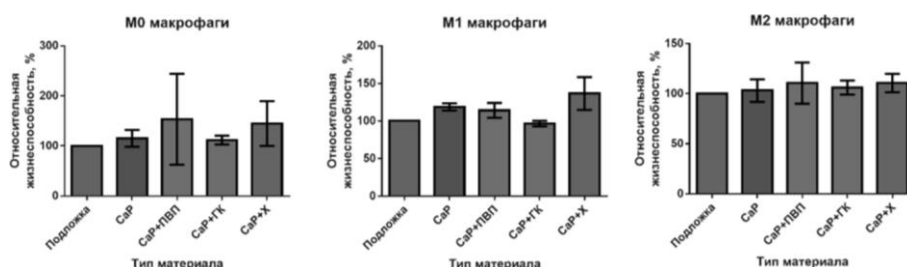


Рис. 3. Результаты исследования жизнеспособности M0, M1 и M2 макрофагов, сокультивированных с исследуемыми материалами: CaP – кальций-фосфатное покрытие, CaP + ПВП – кальций-фосфатное покрытие с добавлением поливинилпирролидона, CaP + X – кальций-фосфатное покрытие с добавлением хитозана, CaP + ГК – кальций-фосфатное покрытие с добавлением гиалуроновой кислоты, * – $p < 0,05$ по сравнению с подложкой

Значение жизнеспособности M0, M1 и M2 макрофагов, сокультивированных с исследуемыми материалами, рассчитанное согласно методике [17], составило более 90% для всех типов материалов. Таким образом, исследуемые материалы не цитотоксичны.

Нанесение кальций-фосфатных покрытий на титановую подложку не приводит к снижению жизнеспособности M0, M1 и M2 человеческих макрофагов. Таким образом, нанесение кальций-фосфатных покрытий не снижает биосовместимость материалов. Биосовместимость же чистого титана марки BT1-0 подтверждена множеством работ [18, 19].

Исследование влияния материалов на продукцию макрофагами M1 и M2 ассоциированных цитокинов

Результаты исследования влияния гибридных кальций-фосфатных покрытий, полученных методом микродугового оксидирования, на секрецию провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-1 β первичными макрофагами человека показаны на рис. 4, 5.

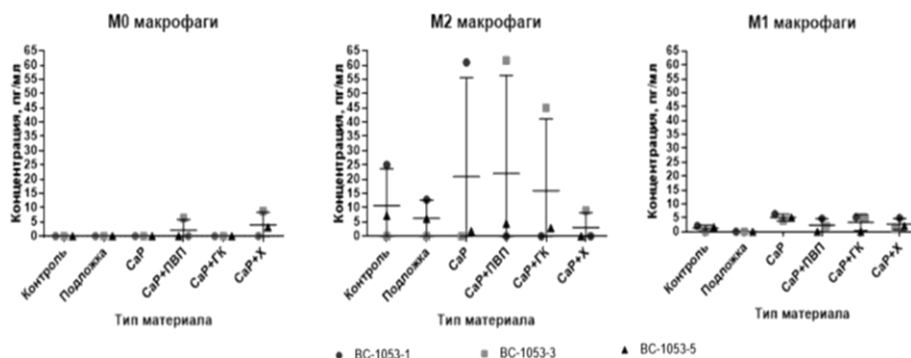


Рис. 4. Концентрация IL-1 β в супернатантах на 6-й день сокультивирования первичных человеческих макрофагов с исследуемыми материалами, измеренная методом ИФА. ВС – обозначение номера индивидуального донора

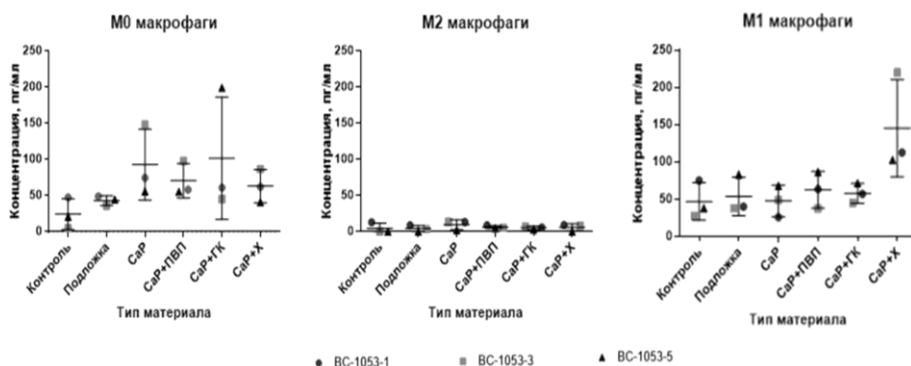


Рис. 5. Концентрация IL-6 в супернатантах на 6-й день сокультивирования первичных человеческих макрофагов с исследуемыми материалами, измеренная методом ИФА. ВС – обозначение номера индивидуального донора

Цитокин IL-1 β принадлежит к группе провоспалительных цитокинов, которой придают особое значение в патогенезе воспалительных заболеваний. У человека IL-1 β является главной формой секреторного IL-1 [20]. IL-1 β связывается со специфическими мембранными рецепторами, которые экспрессируются на различных клетках-мишенях, реализуя таким образом большую часть своих биологических эффектов. Кроме того, IL-1 β стимулирует метаболизм соединительной ткани и пролиферацию фибробластов и увеличивает продукцию ими простагландинов, ростовых факторов и ряда цитокинов [21].

Полученные данные показывают, что с учетом вариативности по индивидуальным донорам общая секреция цитокина невелика во всех пробах. Рост концентрации цитокина в пробах, содержащих M2 макрофаги, является донор-специфичным и связан, скорее всего, с наличием в пробах эндотоксина.

IL-6 секретируется активированными моноцитами или макрофагами, эндотелиальными клетками, фибробластами, активированными Т-клетками, а также рядом клеток, не являющихся клетками иммунной системы [22]. В целом, IL-6 является одним из наиболее активных цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа и воспалительной реакции. В данной работе цитокин рассматривается как маркер воспалительного процесса.

Наблюдаемые реакции первичных макрофагов человека являются донор-специфичными. Уровни секреции IL-6 при сокультивировании со всеми материалами одинаковы с учетом погрешности и вариабельности. Исключение составляет образец с хитозаном в случае M1 макрофагов – уровни секреции цитокина во всех донорах превышают таковые для чистого КФ-покрытия и покрытия с прочими полимерами.

Кроме того, нами было показано, что применение данных покрытий не приводит к увеличению секреции цитокина TNF- α , являющегося наиболее распространенным маркером острого воспаления. Определенные величины концентрации TNF- α были ниже детектируемого уровня во всех пробах.

В данной работе также исследовалась секреция противовоспалительного цитокина IL-10. Главной функцией IL-10 являются ограничение и купирование воспалительного процесса; повышение его секреции в образцах может указывать на тенденцию к формированию хронического воспалительного процесса вследствие имплантации материалов [23].

Во всех исследованных пробах концентрация IL-10 была ниже детектируемого уровня, это указывает на отсутствие тенденции к формированию хронического пролиферативного воспаления и неопластического процесса, что является положительными результатом. Кроме того, данные коррелируют с результатами определения концентрации провоспалительных цитокинов в супернататах. Как было сказано ранее, противовоспалительные цитокины зачастую выделяются в ответ на развитие активного острого воспаления, что соответствует установленным концентрациям IL-6 и IL-1 β в пробах.

Заключение

В работе проведено комплексное исследование физико-химических и механических свойств кальций-фосфатных покрытий на поверхности титана, сформированных методом микродугового оксидирования при добавлении в электролит растворов поливинилпирролидона, гиалуроновой кислоты и хитозана. Все полученные покрытия являются кальций-дефицитными, что характерно для МДО-покрытий. Показано, что наибольшая шероховатость поверхности – параметр, критически важный для адгезии и пролиферации клеток, – наблюдается у покрытий, сформированных в кальций-фосфатном электролите с добавлением хитозана, $R_a = 0,75 \pm 0,20$ мкм. Добавление к исходному электролиту поливинилпирролидона и хитозана приводит к формированию кальций-фосфатных покрытий с наибольшей пористостью, значение которой превышает 90%. Введение полимеров в раствор электролита успешно увеличивает эластичность МДО-покрытий. Эластичность покрытий, сформированных при добавлении в электролит ПВП и хитозана, достоверно увеличивается, причем толщины этих покрытий и контрольных (электролит без добавления полимеров) не отличаются. Наибольшая устойчивость к царапанию наблюдается у образцов, сформированных в электролите с гиалуроновой кислотой.

По критерию реакции первичных макрофагов человека на исследуемые материалы покрытия, формируемые в электролите с ПВП, не стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов, не ингибируют секрецию противовоспалительных цитокинов первичными макрофагами человека, поэтому являются наиболее биосовместимыми.

Полученные в данной работе результаты подтверждают необходимость дальнейшей работы в сфере разработки методик формирования кальций-фосфатных покрытий на поверхности титана и его сплавов методом микродугового оксидирования. Следующий этап исследований полимер / кальций-фосфатных покрытий, исследованных в работе, будет включать *in vivo* исследования на модели лабораторных животных.

Разработка технологии, получение образцов и исследование физико-химических свойств материалов были выполнены в Томском политехническом университете в рамках проекта РФФИ (проект № 20-53-18003Болг_а). Биологические исследования были выполнены в Томском государственном университете в рамках проекта ВИУ НУ 8.1.23.2018 Л, соглашение от 19.03.2018, Программа повышения конкурентоспособности ТГУ.

Литература

1. Steinemann S.G. Metal implants and surface reactions // Injury. 1996. V. 27. P. S/C16–S/C22.
2. Schliephake H. et al. Biomimetic calcium phosphate composite coating of dental implants // International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. 2006. V. 21, № 5. P. 738–746.

3. Fraker A.C., Ruff A.W. Metallic surgical implants: state of the art // JOM. 1977. V. 29, № 5. P. 22–28.
4. Asri R.I.M. et al. Corrosion and surface modification on biocompatible metals : a review // Materials Science and Engineering: C. 2017. V. 77. P. 1261–1274.
5. Geetha M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants : a review // Progress in materials science. 2009. V. 54, № 3. P. 397–425.
6. Montazeri M. et al. Investigation of the voltage and time effects on the formation of hydroxyapatite-containing titania prepared by plasma electrolytic oxidation on Ti–6Al–4V alloy and its corrosion behavior // Applied Surface Science. 2011. V. 257, № 16. P. 7268–7275.
7. Hotchkiss K.M. et al. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation // Acta biomaterialia. 2016. V. 31. P. 425–434.
8. Bose S., Tarafder S., Bandyopadhyay A. Hydroxyapatite coatings for metallic implants // Hydroxyapatite (Hap) for biomedical applications. Woodhead Publishing, 2015. P. 143–157.
9. Leeuwenburgh S. et al. Osteoclastic resorption of biomimetic calcium phosphate coatings in vitro // 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. 2001. V. 56, № 2. P. 208–215.
10. Бардин И.В. и др. Микродуговое оксидирование // Металлургия машиностроения. 2013. № 1. С. 27–35.
11. Wheeler J.M. et al. Evaluation of micromechanical behaviour of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings on Ti–6Al–4V // Surface and Coatings Technology. 2010. V. 204, № 2122. P. 3399–3409.
12. Vishwakarma A. et al. Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response // Trends in biotechnology. 2016. V. 34, № 6. P. 470–482.
13. Kastellorizios M., Tipnis N., Burgess D.J. Foreign body reaction to subcutaneous implants // Immune Responses to Biosurfaces. 2015. V. 865. P. 93–108.
14. Alvarez M.M. et al. Delivery strategies to control inflammatory response: Modulating M1–M2 polarization in tissue engineering applications // Journal of Controlled Release. 2016. V. 240. P. 349–363.
15. Мошенков В.И. и др. Определение нанотвердости материалов с использованием различных методов анализа кривой индентирования // Вопросы проектирования и производства конструкций летательных аппаратов. 2011. № 1. С. 102–107.
16. Ракина А.А., Солдатова Е.А. Модифицированные биodeградируемыми полимерами кальций-фосфатные покрытия на поверхности титановых имплантатов. Оценка иммунной реакции организма человека // Перспективные материалы конструкционно-го и медицинского назначения : сб. тр. Междунар. науч.-техн. молодежной конф., г. Томск, 26–30 ноября 2018 г. Томск, 2018. С. 363–364.
17. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of cell viability by the alamarBlue assay // Cold Spring Harbor Protocols. 2018. V. 2018, № 6. P. 462–470.
18. Abd-elrhman Y. et al. Compatibility assessment of new V-free low-cost Ti–4.7 Mo–4.5 Fe alloy for some biomedical applications // Materials & Design. 2016. V. 97. P. 445–453.
19. Ratner B.D. A perspective on titanium biocompatibility // Titanium in medicine. Berlin ; Heidelberg : Springer, 2001. P. 1–12.
20. Strieter R.M. et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta // Science. 1989. V. 243, № 4897. P. 1467–1469.
21. Dinarello C.A. Biology of interleukin 1 // The FASEB Journal. 1988. V. 2, № 2. P. 108–115.
22. Akira S. et al. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF) // The FASEB Journal. 1990. V. 4, № 11. P. 2860–2867.
23. Saraiva M., O'garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells // Nature reviews immunology. 2010. V. 10, № 3. P. 170–181.

Информация об авторах:

Волохова Аполлинария Александровна, аспирант Национального исследовательского Томского государственного университета (Томск, Россия). E-mail: rapollinariya@gmail.com

Солдатова Елена Александровна, аспирант Национального исследовательского Томского политехнического университета (Томск, Россия). E-mail: kleine_harey92@mail.ru

Чурина Елена Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры органической химии Национального исследовательского Томского государственного университета, профессор кафедры патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия). E-mail: lena1236@yandex.ru

Лапуть Олеся Александровна, аспирант Национального исследовательского Томского государственного университета (Томск, Россия). E-mail: olesyalaput@gmail.com

Твердохлебов Сергей Иванович, кандидат физико-математических наук, доцент НОЦ им. Б.П. Вейнберга Национального исследовательского Томского политехнического университета (Томск, Россия). E-mail: tverd@tpu.ru

Tomsk State University Journal of Chemistry, 2020, 19, 21–36. DOI: 10.17223/24135542/19/3

**A.A. Volokhova^{1,3}, E.A. Soldatova³, E.G. Churina^{1,2},
O.A. Laput¹, S.I. Tverdokhlebov³**

¹ *National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia)*

² *Siberian State Medical University (Tomsk, Russia)*

³ *National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russia)*

**The use of special electrolytes with co-dissolved biodegradable polymers
for the production of bioactive calcium-phosphate coatings
by microarc oxidation (MAO)**

Today, metal implants for various purposes are an integral part of surgical practice in traumatology and orthopedics. Meanwhile, cases of implant rejection are common and the rate of new bone growth on an untreated metal surface is low. The rate of recovery of a patient directly depends on the rate of regeneration of body tissues, and the rate of regeneration is determined by the behavior of cells at the site of surgery. One of the proposed solutions is the use of bioactive coatings that improve the biocompatibility of implants, improve cell proliferation and adhesion.

A widespread resource of such coatings is calcium phosphates of various origins, such as ones obtained by micro-arc oxidation. Among the techniques of coating obtainment, a great interest was the method of micro-arc oxidation (MAO). The MAO method allows obtaining porous, rough coating with a specified chemical composition that plays an important role in osteoconduction process. However, fragility of obtained coatings is significantly higher than bone fragility. Thus, mechanical inconsistencies may affect on integrity of obtained coating during implantation.

The paper proposes a method for the formation of hybrid calcium-phosphate coatings by micro-arc oxidation using an electrolyte based on calcium oxide with an admixture of dispersed particles of hydroxyapatite and co-dissolved biodegradable polymers: chitosan, polyvinylpyrrolidone, and hyaluronic acid. It is assumed that the polymers will act as a plasticizer. The resulting coatings are calcium-deficient and highly porous. It is shown that the introduction of polymers into an electrolyte solution improves the elasticity, specific amount and average pore diameter, and also does not lead to a deterioration in the biocompatibility of coatings.

Keywords: *microarc oxidation, biodegradable polymers, calcium phosphate coatings, macrophages, bone implants.*

References

1. Steinemann S.G. Metal implants and surface reactions // *Injury*. 1996. V. 27. P. S/C16–S/C22.
2. Schliephake H. et al. Biomimetic calcium phosphate composite coating of dental implants // *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2006. V. 21, № 5. P. 738–746.
3. Fraker A.C., Ruff A.W. Metallic surgical implants: state of the art // *JOM*. 1977. V. 29, № 5. P. 22–28.
4. Asri R.I.M. et al. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: a review // *Materials Science and Engineering: C*. 2017. V. 77. P. 1261–1274.
5. Geetha M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants: a review // *Progress in materials science*. 2009. V. 54, № 3. P. 397–425.
6. Montazeri M. et al. Investigation of the voltage and time effects on the formation of hydroxyapatitecontaining titania prepared by plasma electrolytic oxidation on Ti–6Al–4V alloy and its corrosion behavior // *Applied Surface Science*. 2011. V. 257, № 16. P. 7268–7275.
7. Hotchkiss K.M. et al. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation // *Acta biomaterialia*. 2016. V. 31. P. 425–434.
8. Bose S., Tarafder S., Bandyopadhyay A. Hydroxyapatite coatings for metallic implants // *Hydroxyapatite (Hap) for biomedical applications*. Woodhead Publishing, 2015. P. 143–157.
9. Leeuwenburgh S. et al. Osteoclastic resorption of biomimetic calcium phosphate coatings in vitro // *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*. 2001. V. 56, № 2. P. 208–215.
10. Bardin I.V. et al. Microdugovoe oksidirovanie [Microarc oxidation] // *Metallurgiya Mashinostroeniya*. 2013. № 1. P. 27–35. In Russian.
11. Wheeler J.M. et al. Evaluation of micromechanical behaviour of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings on Ti–6Al–4V // *Surface and Coatings Technology*. 2010. V. 204, № 2122. P. 3399–3409.
12. Vishwakarma A. et al. Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response // *Trends in biotechnology*. 2016. V. 34, № 6. P. 470–482.
13. Kastellorizios M., Tipnis N., Burgess D.J. Foreign body reaction to subcutaneous implants // *Immune Responses to Biosurfaces*. 2015. V. 865. P. 93–108.
14. Alvarez M.M. et al. Delivery strategies to control inflammatory response: Modulating M1–M2 polarization in tissue engineering applications // *Journal of Controlled Release*. 2016. V. 240. P. 349–363.
15. Moshchenyuk V.I. et al. Opredelenie nanotverdosti materialov s ispol'zovaniem razlichnykh metodov analiza krivoy indentivaniya [Determination of nanohardness of materials using various methods of indentation curve analysis] // *Voprosy proektirovaniya i proizvodstva konstruktsiy letatel'nykh apparatov*. 2011. № 1. P. 102–107. In Russian.
16. Rakina A.A., Soldatova E.A. Modifitsirovannye biodegradiруемymi polimerami caltsiy-fosfatnye pokrytiya na poverhnosti titanovykh implantatov. Otsenka immunoy reaksii organizma cheloveka [Modified by biodegradable polymers, calcium-phosphate coatings on the surface of titanium implants. Assessment of the immune response of the human body] // *Perspektivnye materialy konstruktsionnogo i meditsinskogo naznacheniya: sbornik trudov Mezhdunarodnoy nauchno-tehnicheskoy molodezhnoy konferentsii*. Tomsk, 2018. P. 363–364. In Russian.
17. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of cell viability by the alamarBlue assay // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018. V. 2018, № 6. P. 462–470.
18. Abd-elrhman Y. et al. Compatibility assessment of new V-free low-cost Ti–4.7 Mo–4.5 Fe alloy for some biomedical applications // *Materials & Design*. 2016. V. 97. P. 445–453.

19. Ratner B.D. A perspective on titanium biocompatibility // *Titanium in medicine*. Berlin; Heidelberg : Springer, 2001. P. 1–12.
20. Strieter R.M. et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta // *Science*. 1989. V. 243, № 4897. P. 1467–1469.
21. Dinarello C.A. Biology of interleukin 1 // *The FASEB Journal*. 1988. V. 2, № 2. P. 108–115.
22. Akira S. et al. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF) // *The FASEB Journal*. 1990. V. 4, № 11. P. 2860–2867.
23. Saraiva M., O'garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells // *Nature reviews immunology*. 2010. V. 10, № 3. P. 170–181.

Information about the authors:

Volokhova Apollinariya Aleksandrovna, postgraduate student at the National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: rapollinariya@gmail.com

Soldatova Elena Aleksandrovna, postgraduate student at the National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russia). E-mail: kleine_harey92@mail.ru

Churina Elena Georgievna, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Organic Chemistry, National Research Tomsk State University, Professor of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University (Tomsk, Russia). E-mail: lena1236@yandex.ru

Laput Olesya Aleksandrovna, postgraduate student at the National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: olesyalaput@gmail.com

Tverdokhlebov Sergei Ivanovich, Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor of the Scientific and Educational Center named after B.P. Weinberg of the National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russia). E-mail: tverd@tpu.ru