Физика и химия обработки материалов
2012, №2, с.51-64

УДК 539.26, 544.06.018, 570.085.23

Физико-химические и биологические свойства микродуговых кальцийфосфатных покрытий на титане и цирконии

© 2012 **Ю.П.Шаркеев, Е.В.Легостаева, И.А.Хлусов*, К.С.Куляшова, Е.Г.Комарова**

Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск
E-mail: sharkeev@ispms.tsc.ru; lego@ispms.tsc.ru; kseniya@ispms.tsc.ru; katerina@ispms.tsc.ru
** НОЦ "Биосовместимые материалы и биоинженерия" при Томском политехническом университете, Сибирском государственном медицинском университете и Институте физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск*
E-mail: khl@ultranet.tomsk.ru
Поступила в редакцию 17 июля 2011 г., окончательный вариант — 15 ноября 2011 г.

Изучены физико-химические и биологические характеристики микродуговых кальцийфосфатных покрытий на титане и цирконии. Установлено, что кальцийфосфатные покрытия на титане и цирконии по-разному влияют на морфофункциональное состояние стромальных стволовых клеток, окружающих имплантат, что может быть связано с более высокой растворимостью и последующим выходом фосфатных групп в межклеточную жидкость из покрытий на Zr по сравнению с покрытиями на Ti.

Ключевые слова: микродуговое оксидирование, кальцийфосфатные покрытия, биологическое тестирование.

Physico-chemical and biological characteristics of microarc calcium-phosphate coatings on Ti and Zr substrates have been studied. It was found that calcium-phosphate coatings on Ti and Zr have different impacts on morphofunctional state of stromal stem cells surrounding the implant, which may be associated with a higher solubility and subsequent release of phosphate groups in the intercellular fluid from the coatings on Zr substrate compared with that on Ti one.

Keywords: micro-arc oxidation, calcium-phosphate coatings, biological testing.

Введение

Метод микродугового оксидирования (МДО) в водных растворах электролитов, известный также как анодно-искровое осаждение, микроплазменный метод или плазменно-электролитическое оксидирование [1-3], был разработан для нанесения защитных и упрочняющих покрытий на Ti, Al и их сплавы [4-6], а в последнее десятилетие широко применяется для нанесения биоактивных покрытий, прежде всего на титан [7-14]. Большие достижения в области исследования и разработки методов получения защитных и упрочняющих МДО-покрытий были достигнуты в ИНХ СО РАН (Новосибирск) [12], ИХ ДВО РАН (Владивосток) [3,5,6] и МАТИ (Москва) [1,15], а работы, выполненные в ТПУ и ИФПМ СО РАН (Томск) [7-10,16,17], позволили разработать технологии нанесения оксидных и кальцийфосфатных покрытий на медицинские имплантаты различного назначения.

Формирование покрытия в микродуговом разряде связано с протеканием высокотемпературных химических процессов, вызывающих окисление основного материала и перенос ультрадисперсной фазы из электролита в покрытие. Химический состав,

структура и свойства материала покрытия определяются природой обрабатываемого металла, параметрами процесса и составом электролита [1]. Покрытия на основе фосфатов кальция, нанесенные данным методом на поверхность титана и его сплавов, обладают высокой коррозионной стойкостью, износостойкостью, твердостью и химической устойчивостью в агрессивных средах [7-14]. Тем не менее, проблема повышения механической прочности и адгезии покрытия сохраняется, так как с увеличением толщины покрытия до ~100 мкм его биоактивность, способность к остеоиндукции и остеокондукции возрастают, однако механическая прочность и адгезия к подложке ухудшаются.

В настоящее время отсутствуют данные, однозначно свидетельствующие, какие именно характеристики покрытия (фазовый и элементный состав, структура, шероховатость и т.д.) обеспечивают успешную остеоинтеграцию имплантата. Кроме того, большинство известных результатов получено при нанесении покрытий на титан, который обладает высокой биосовместимостью, но недостаточно высокими механическими свойствами, тогда как более прочные титановые сплавы (ВТ6, ВТ16 и др.) имеют в своем составе легирующие элементы, которые могут быть токсичными для организма [18,19].

В последнее время в медицине все чаще применяют наноструктурированный методами интенсивной пластической деформации титан, механические свойства которого соответствуют среднелегированным титановым сплавам (ВТ6, ВТ16) [16,20,21], однако формируемая таким способом наноструктура сохраняет свою стабильность до ~350°С [16,21], тогда как для формирования микродугового кристаллического кальцийфосфатного покрытия на титане необходим отжиг при 800-850°С [16].

Перспективными с точки зрения замены титана являются Zr-Nb сплавы, которые имеют более высокие механические характеристики, являются биосовместимыми и относятся к классу вентильных металлов, вследствие чего могут быть использованы для нанесения на их поверхность покрытий микродуговым методом [22-24].

В данной работе проведены сравнительные исследования физико-химических и биологических свойств кальцийфосфатных покрытий, нанесенных методом МДО на поверхность Ti и Zr, легированного ниобием.

Материалы и методика эксперимента

Кальцийфосфатные МДО-покрытия наносились на поверхность пластин из технически чистого титана марки ВТ1-0 и циркония, содержащего 1 масс.% Nb размером 10×10×1 мм на установке MicroArc-3.0 в электролите на основе водного раствора ортофосфорной кислоты, гидроксиапатита и карбоната кальция [16,17]. Микродуговое осаждение покрытий на образцы Ti и Zr осуществлялось при подаче импульсов напряжения 150-400 и 150-300 В соответственно при частоте следования импульсов 50 Гц и длительности импульсов 100 мкс. Время нанесения покрытия на Ti составляло до 10 мин, на Zr — до 5 мин.

Морфология поверхности покрытий исследовалась на растровых электронных микроскопах (РЭМ) SEM 515 и Zeiss EVO 50 XVP в НОЦ НГТУ. Размер структурных элементов (сферолитов и пор) определялся методом “секущей”, общая пористость оценивалась как отношение суммарной длины отрезков, попадающих на поры, к общей длине секущих линий [25]. Шероховатость поверхности измерялась на профилометре-296 по параметру R_a.

На образцах в виде спрессованных по стандартной методике таблеток бромистого калия с предварительно снятым с металлической подложки и тонко измельченным покрытием с помощью ИК-спектрометра с Фурье-преобразованием FTIR Spectrometer BIO RAD FTS 175 производили измерения ИК-спектров в интервале длин волн 4000-400 $см^{-1}$. [26,27]. Рентгенофазовый анализ покрытия осуществляли на дифрактометре Bruker D8 Advance в диапазоне углов 2θ=5-90° с шагом сканирования 0,01° в Cu K_α-излучении (λ=1,5405 нм). Время набора дозы на точку составило 60 с.

Биологическое тестирование покрытий проводили с использованием пренатальных стромальных клеток легкого человека (ООО “Банк стволовых клеток“, Томск). Для культивирования клеток на кальцийфосфатных покрытиях пользовались протоколом культуральной среды 90% ДМЕМ/F12 (1:1) (GIBKO, Великобритания), 10% сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma, США), 280 мг/л *L*-глутамина (“Биолот”, РФ), 50 мг/л гентамицина сульфата (“Дарница”, Украина).

Тестируемые образцы с двухсторонним покрытием помещали в лунки (площадь 1,77 $см^2$) 24-луночных планшетов (Costar) и добавляли клеточную взвесь $5 \cdot 10^4$ жизнеспособных кариоцитов в 1 мл культуральной среды. Контролем роста служила культура фибробластоподобных клеток на пластике. Через 4 суток имплантаты удаляли, надосадочную жидкость в клеточных культурах собирали из лунок планшета в пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 500*g*. Функциональное состояние клеток оценивали по концентрации Ca и P, которую

определяли по общепринятой биохимической методике стандартным колориметрическим методом [28].

Образцы с клетками, прилипшими к пластику или поверхности покрытий, сушили на воздухе, фиксировали в течение 30 с в парах формалина и окрашивали на щелочную фосфатазу (ЩФ) методом азосочетания по G.Gomori в модификации А.Г.Михеева [29] с применением реактивов нафтол-AS-BI фосфат, а-нафтилацетат эстераза, прочный синий РР соль (Lachema, Чехия).

Для подготовки к растровой электронной микроскопии образцы с клетками проводили через глутаровый альдегид и осуществляли их фиксацию в 1% растворе четырехокиси осмия в течение 30-40 мин с последующим двукратным отмыванием фосфатным буфером (*pH*=7,2-7,4). Далее производили обезвоживание клеток в серии водных растворов этанола восходящей концентрации при 30, 50, 70, 90, 100°С по 15 мин в каждом и дважды — в чистом ацетоне.

Морфометрию полученных на образцах и пластике цифровых изображений клеток, окрашенных на ЩФ, проводили с использованием программы ImageJ [30], позволяющей определять как функциональный (оптическая плотность клеток при окраске на ЩФ), так и морфологические показатели — площадь клетки, округлость (индекс растет от 0 до 100% для идеального круга) и эллипсоидность ее формы (*AR*, индекс более 1).

В результате статистической обработки данных для каждого параметра получали среднее значение *X*, среднее статистическое отклонение *SD* и ошибку среднего значения *m*. Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова-Смирнова), статистические различия оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (*U*-тест). С целью выявления связи между исследуемыми показателями определяли коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r_S), при этом статистически значимыми различия считались при $p<0,05$.

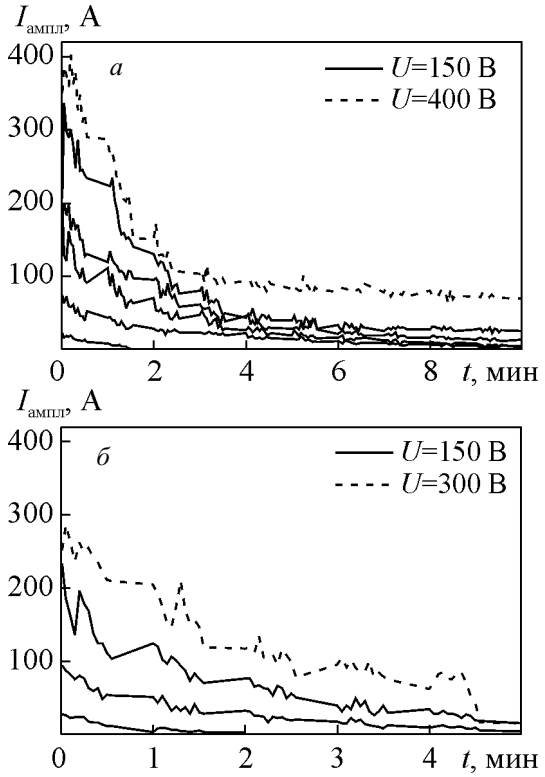


Рис.1. Зависимости амплитуды тока микродугового процесса от времени нанесения кальцийфосфатного покрытия на поверхность Ti (*а*) и Zr (*б*) при различном напряжении.

Результаты и обсуждение

Формирование кальцийфосфатных покрытий

На рис.1 представлены зависимости амплитуды тока разрядов при нанесении покрытий от времени микродугового процесса, на рис.2 — РЭМ-изображения поверхности МДО-покрытий, а на рис.3 — зависимости размеров сферолитов и пор, а также общей пористости покрытий на титане и цирконии от напряжения микродугового процесса. Из полученных данных следует, что покрытия на поверхности Ti и Zr начинают формироваться при напряжении микродугового процесса 150 В. При нанесении покрытия на Ti начальная амплитуда тока составляет 20 А, однако уже через 1,5 мин его величина снижается до нуля, что указывает на формирование диэлектрического покрытия (рис.1*а*). Для Zr время формирования покрытия, за которое амплитуда тока микродугового процесса падает от 30 А до нуля, при том же напряжении (150 В) составило 2 мин (рис.1*б*).

Анализ РЭМ-изображений поверхности покрытий, нанесенных при напряжении процесса 150 В, показал, что уже через 1,5 мин оксидирования покрытие на Ti подложке содержит сфероидальные образования (сферолиты) размером ~5 мкм, в которых наблюдаются сквозные поры размером ~2 мкм (рис.2*а*). Размер сферолитов и пор заметно увеличивается с повышением напряжения микродугового процесса до 350 В, поверхностная пористость CaP покрытий на Ti составляет ~20% (рис.3). При нанесении МДО-покрытий на Zr на его поверхности

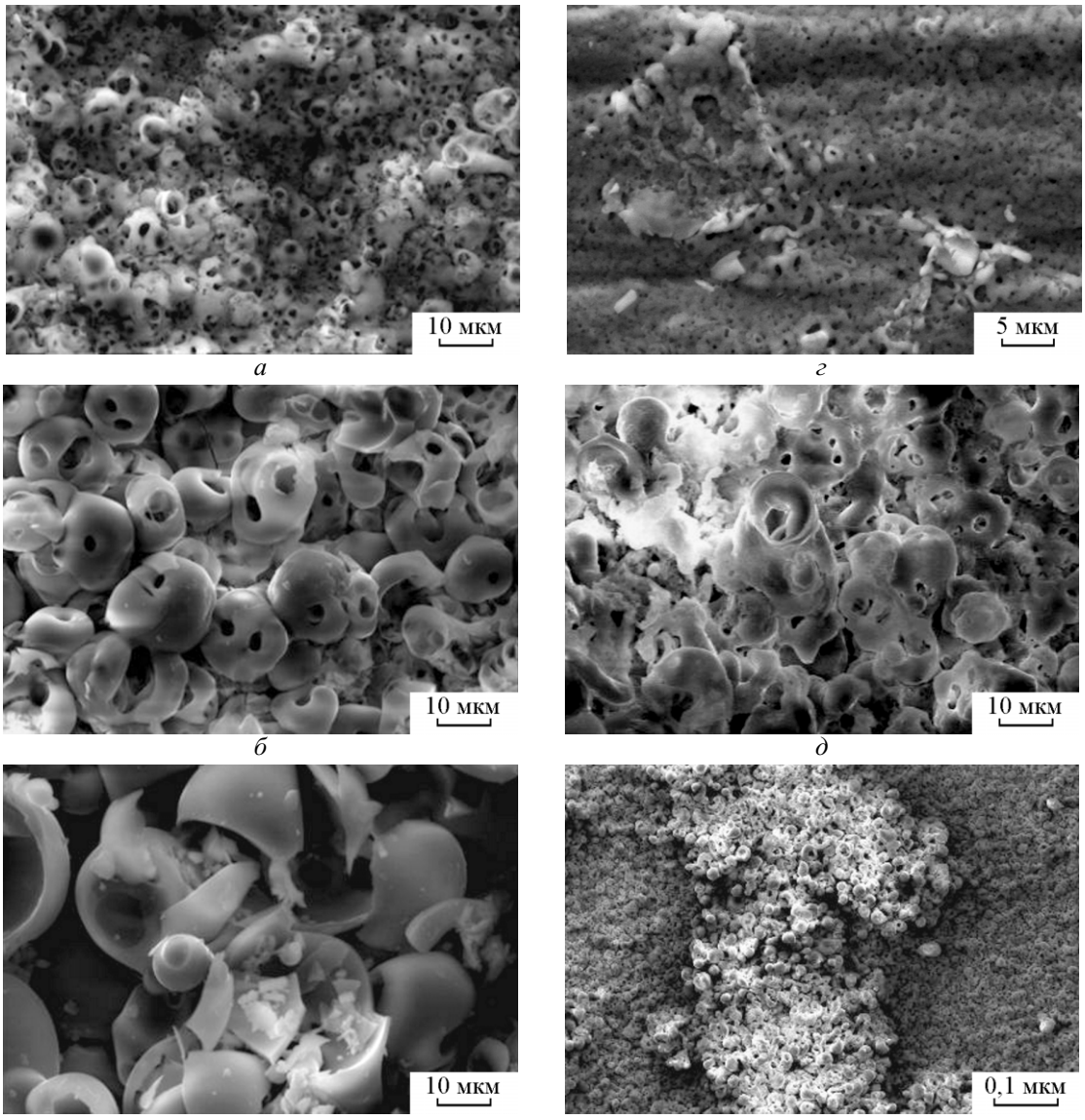


Рис.2. РЭМ-изображения поверхности кальцийфосфатного покрытия, нанесенного методом микродугового оксидирования на поверхность Ti (*а-в*) и Zr (*г-е*) при напряжении 150 (*а*, *г*), 200 (*б*), 400 (*в*), 250 (*д*) и 300 В (*е*).

образуются лишь островки кальцийфосфатного покрытия с пористой структурой (рис.2*г*), при этом средний размер пор равен 0,48 мкм, а поверхностная пористость покрытия составляет 10%, (рис.3).

Следует отметить, что по РЭМ-изображениям определялась поверхностная пористость покрытия, которая может отличаться от его объемной пористости, что хорошо видно на фотографиях поперечных шлифов (рис.4). Однако поверхностная пористость представляется более важной характеристикой, так как именно она может повлиять на биологические свойства кальцийфосфатного покрытия.

Повышение напряжения микродугового процесса в интервале 200-350 В приводит к увеличению начальной амплитуды тока до 80-320 А (рис.1), при этом время формирования CaP покрытия на поверхности Ti можно увеличить до 10 мин, что сопровождается увеличением размера сферолитов до 30 мкм, пор — до 12 мкм, а поверхностной пористости — до 25%. Дальнейшее повышение напряжения до 400 В вызывает увеличение плотности тока и стимулирует переход микродугового разряда в дуговой, при котором происходит разрушение сферолитов и, как следствие, снижение размера пор и уменьшение пористости покрытия (рис.2, 3).

При напряжении 200 В на поверхности Zr также начинается рост сферолитов, содержащих поры (рис.2*д*), однако и в этом случае средний размер сфе-

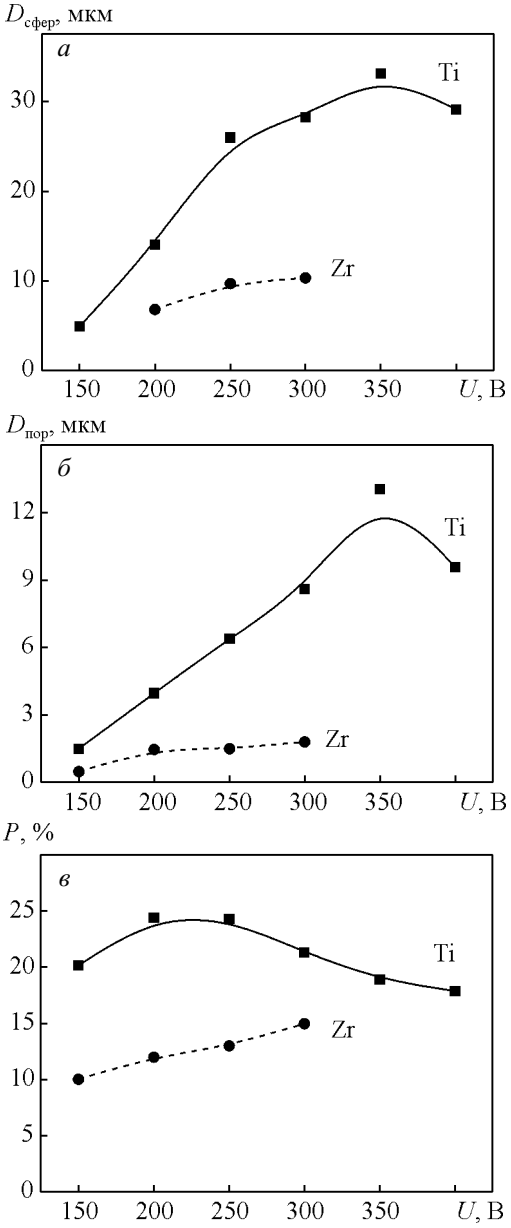


Рис.3. Зависимости размера сферолитов (*а*), пор (*б*) и общей поверхностной пористости (*в*) от напряжения процесса нанесения кальцийфосфатных МДО-покрытий на Ti и Zr.

ролитов и пор, а также пористость покрытия в два раза меньше, чем в покрытии на поверхности Ti (рис.3). Повышение напряжения до 300°С позволяет получить на Zr покрытия с рельефной поверхностью, образуемой чередующимися впадинами и гребнями, представляющими собой скопления большого количества сферолитов (рис.2*е*). Общая поверхностная пористость таких покрытий увеличивается до 15%, а средний размер пор — до 2 мкм. При дальнейшем повышении напряжения оксидирования покрытие на Zr начинает обгорать и отслаиваться.

На рис.5 представлены зависимости толщины, поверхностной плотности и шероховатости поверхности покрытий на Ti и Zr от напряжения оксидирования в интервале 150-400 В. Как видно, с ростом напряжения происходит практически линейное увеличение толщины CaP покрытия, что связано, прежде всего, с увеличением скорости нанесения покрытия вследствие интенсификации процессов воздействия тока на поверхность обрабатываемого материала. При изменении напряжения от 150 до 300 В толщина покрытий как для Ti, так и для Zr, практически линейно возрастает от 10 до 95 мкм (рис.5*а*). Как уже отмечалось, повышение напряжения процесса до 400 В сопровождается увеличением плотности тока и переходом микродугового разряда в дуговой, что приводит к значительному росту покрытий, толщина которых может превышать 100 мкм.

Поверхностная плотность CaP покрытий при увеличении напряжения процесса от 150 до 350 В возрастает от 1,75 до 21,5 мг/см^2 и от 0,3 до 11,5 мг/см^2 для Ti и Zr соответственно. Однако при увеличении напряжения до 400 В покрытие на Ti начинает разрушаться и его поверхностная плотность уменьшается до 19 мг/см^2 (рис.5*б*), что согласуется с результатами структурных исследований (рис.2*в*).

Параметр шероховатости поверхности R_a покрытия на Ti с увеличением напряжения микродугового процесса от 150 до 400 В возрастает от 1,9 до 6 мкм (рис.5*в*). Для покрытия на Zr при увеличении напряжения от 150 до 250 В параметр шероховатости возрастает от 0,6 до 4,5 мкм, а при повышении напряжения до 300 В наблюдается резкое увеличение R_a до 11 мкм, что связано с образованием гребней из скоплений сферолитов (рис.2*е*).

Таким образом, варьирование напряжения микродугового процесса позволяет получать на поверхности Ti и Zr покрытия с различными физическими характеристиками. Кальцийфосфатные покрытия на Zr обладают более развитым рельефом поверхности, в то же время они более плотные, имеют более низкую пористость и поры меньшего размера. Покрытия на Ti более пористые, имеют более крупные поры и более однородную, чем покрытия на Zr, структуру.

Обычно считается, что физико-химические свойства микродуговых покрытий определяются, в первую очередь, составом электролита, то есть типом реакций, протекающих на границе раздела металл–электролит [2,3]. В то же время, различие свойств миродуговых покрытий на Ti и Zr, полученных в одном и том же электролите, может быть обусловлено

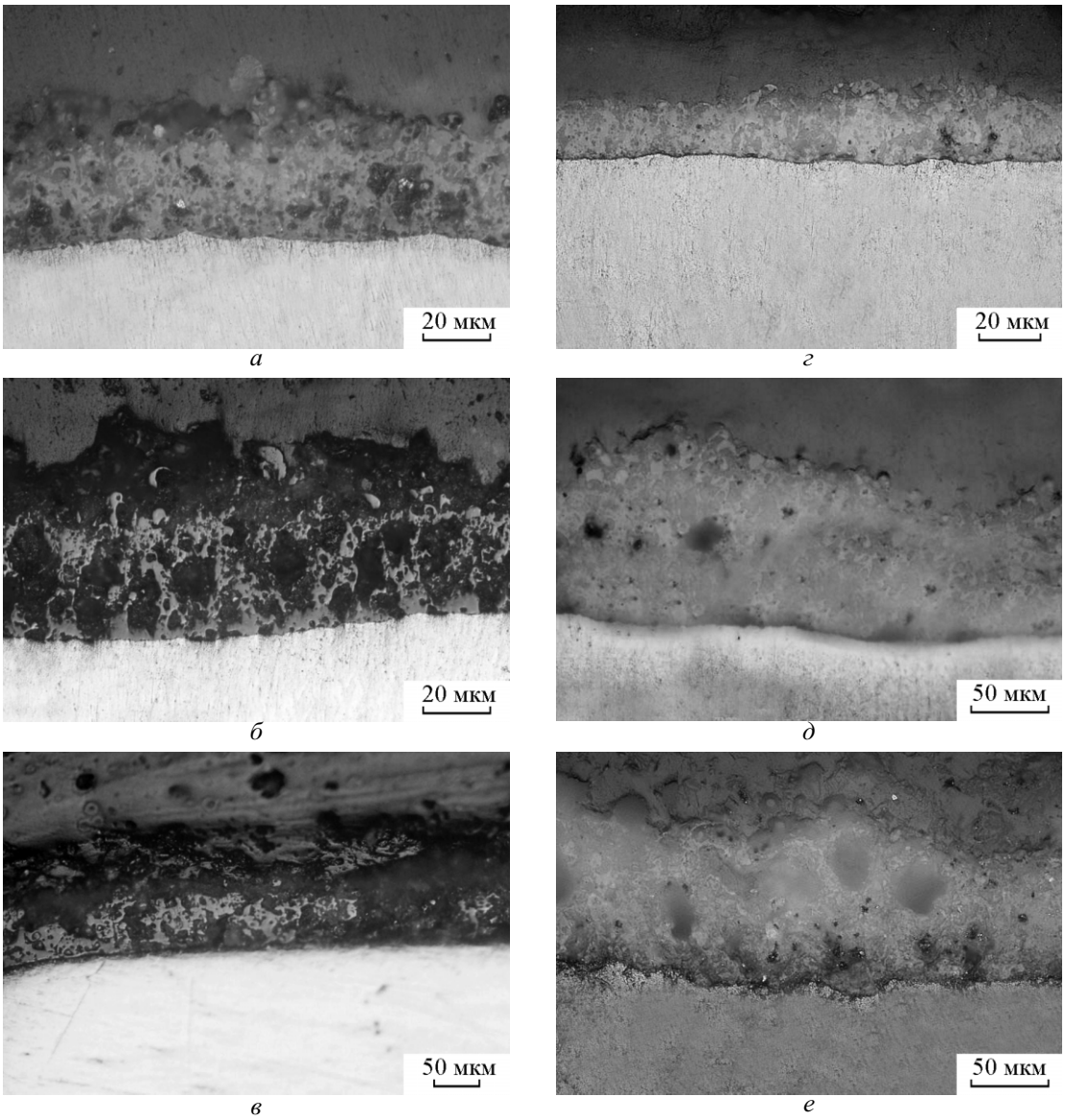


Рис.4. Микрофотографии поперечных шлифов кальцийфосфатных МДО-покрытий на Ti (*а-в*) и Zr (*г-е*), нанесенных при напряжении 200 (*а*, *г*), 300 (*б*), 400 (*в*), 250 (*д*) и 300 В (*е*).

разными физико-химическими характеристиками материала подложек, а также оксидных пленок, присутствующих на их поверхности. В табл.1 приведены электро- и теплофизические свойства, а также и термодинамические характеристики Ti, Zr, Nb и оксидных пленок TiO_2, ZrO_2, Nb_5O_2 [31,32].

Можно предположить, что микродуговой процесс на поверхности сплава Zr-1% Nb начинается в микрообластях, содержащих упрочняющие частицы β-Nb. Теплопроводность частиц β-Nb (λ=54,5 Вт/(м·К)) значительно выше, чем Zr (λ=16,8 Вт/(м·К)), кроме того, Nb имеет гораздо меньшее электросопротивление, чем Zr и Ti. Следует, также, принимать во внимание наличие на поверхности металла (сплава) оксидной пленки, которая в случае Ti и Zr обладает полупроводниковыми свойствами (*n*-тип проводимости), так как Ti, Zr и Nb относятся к элементам переходного ряда.

Как известно, электропроводность оксидных полупроводников обусловлена наличием у ионов одного и того же металла не менее двух разновалентных состояний и связана с обменом электронами между этими ионами. Оксидная пленка Nb_5O_2 имеет достаточно узкую ширину запрещенной зоны, и для перехода электрона из валентной зоны в зону проводимости необходима энергия 1,6 эВ. Ширина

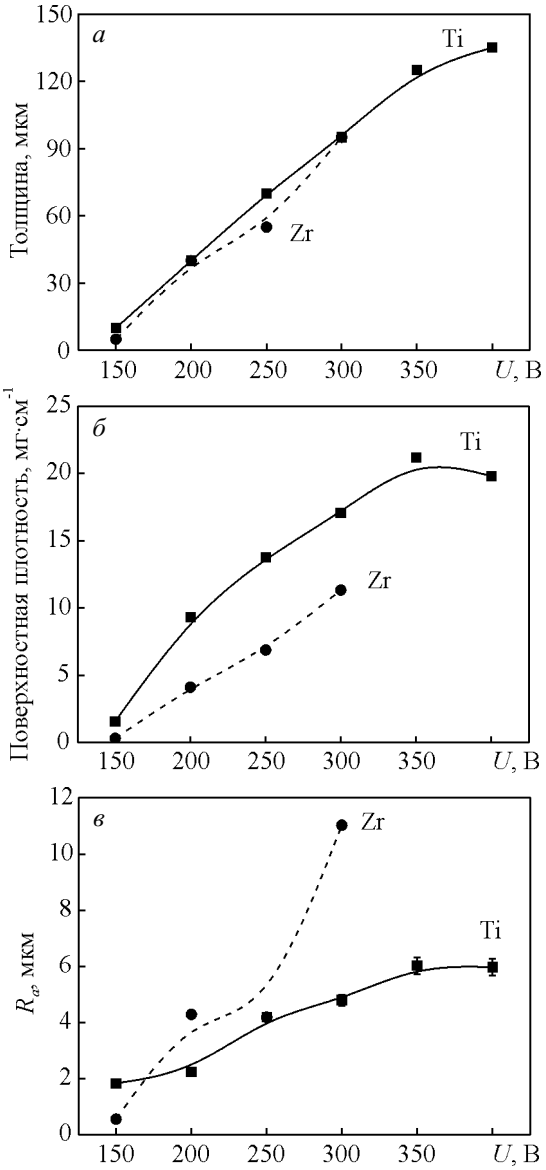


Рис.5. Зависимости толщины (*а*) поверхностной плотности (*б*) и шероховатости поверхности (*в*) кальций-фосфатных МДО-покрытий на Ti и Zr подложках от напряжения микродугового оксидирования.

Таблица 1

Электро- и теплофизические свойства и термодинамические характеристики материала подложек (Ti, Zr, Nb) и оксидных пленок TiO_2, ZrO_2 и Nb_5O_2

Характеристики Me	Ti	Zr	Nb
Плотность, г/см^3	4,5	6,45	8,57
Температура плавления, °C	1668	1852	2500
Температура фазового перехода α↔β, °C	1158-1173	1125-1180	—
Теплопроводность при 300 K, Вт/(м·K)	15,5	16,8	54,5
Коэффициент термического расширения, 10^7 град.$^{-1}$	81	54	63
Электросопротивление, мкОм·м	0,55	0,41	0,152
Работа выхода, эВ	4,09	3,84	4,01
Характеристики оксидных пленок	TiO_2	ZrO_2	Nb_5O_2
Ширина запрещенной зоны, эВ	3	6	1,6
Диэлектрическая проницаемость	30-100	18-21	11-40

запрещенной зоны в ZrO_2 составляет 6 эВ, что близко к соответствующим значениям для диэлектриков. Таким образом, представляется, что микродуговые процессы будут протекать в первую очередь на частицах β-Nb. Значительные различия в электро- и теплофизических свойствах Zr и Nb приводят к формирования менее однородного (особенно в начальный период нанесения) покрытия на Zr-Nb сплаве по сравнению с Ti.

Титан ВТ1-0 содержит незначительное количество примесей Fe, Si, O, C, N и др. элементов (всего <0,5 масс.%), способных образовывать интерметаллиды и карбиды [33,34]. В то же время, теплопроводность интерметаллидов и карбидов значительно меньше, чем титана, так что процесс оксидирования Ti будет протекать активнее в теле зерна, а не на включениях, как в сплаве Zr-Nb. Кроме того, оксидная пленка титана TiO_2 по своим полупроводниковым свойствам (ширина запрещенной зоны 3 эВ) занимает промежуточное положение между ZrO_2 и Nb_5O_2, что также влияет на однородность кальций-фосфатных покрытий.

Таким образом, значительные различия в электро- и теплофизических свойствах Zr и Ti приводят к формированию на МДО-покрытий с различным рельефом поверхности, разной пористостью и однородностью структуры.

Фазовый и элементный состав кальцийфосфатных покрытий

На рис.6, 7 представлены типичные дифрактограммы микродуговых кальцийфосфатных покрытий на поверхности Ti и Zr. Было установлено, что покрытия на Ti сразу после нанесения находятся в аморфном состоянии, на что указывает хорошо заметное гало (рис.6*а*, *б*). Из-за небольшой толщины покрытия, формирующегося на поверхности Ti при напряжении оксидирования 200 В, на соответствующих дифрактограммах наблюдаются также пики, относящиеся к Ti подложке (рис.6*а*). При увеличении напряжения до 300 В толщина покрытия на Ti достигает 100 мкм и на дифрактограмме появляются единичные пики, соответствующие кальцийфос-

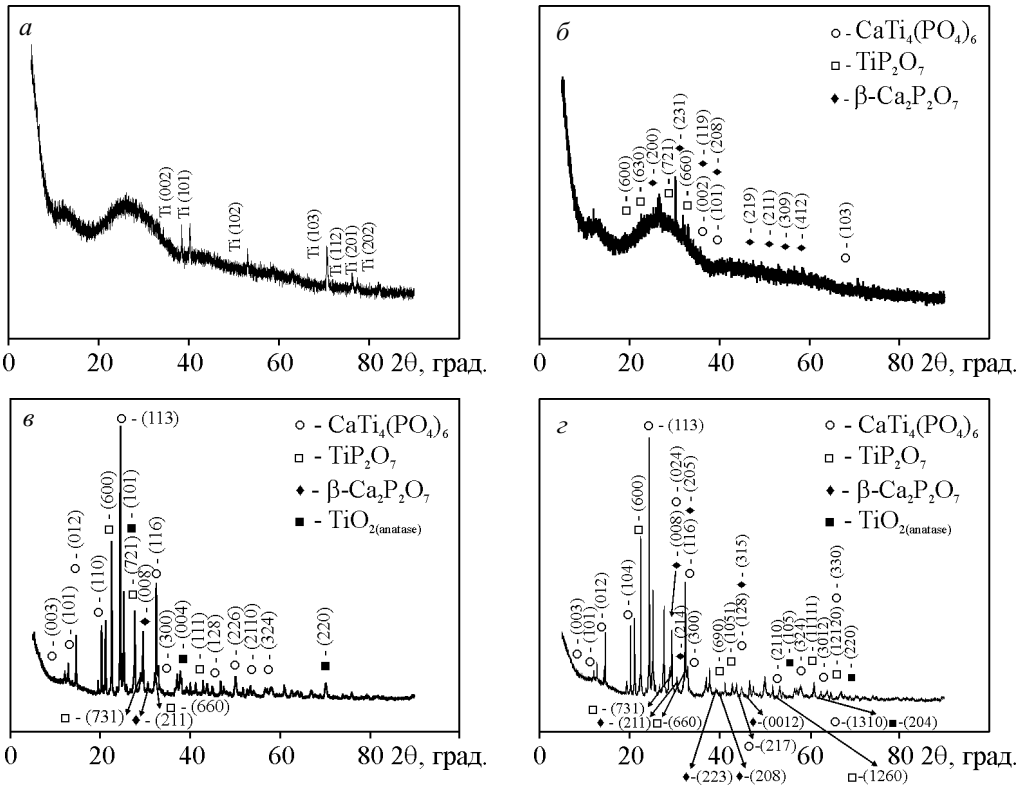


Рис.6. Типичные дифрактограммы кальцийфосфатных МДО-покрытий на Ti сразу после нанесения (*а*, *б*) и после отжига при 800°С. Напряжение оксидирования 200 (*а*, *в*) и 300 В (*б*, *г*).

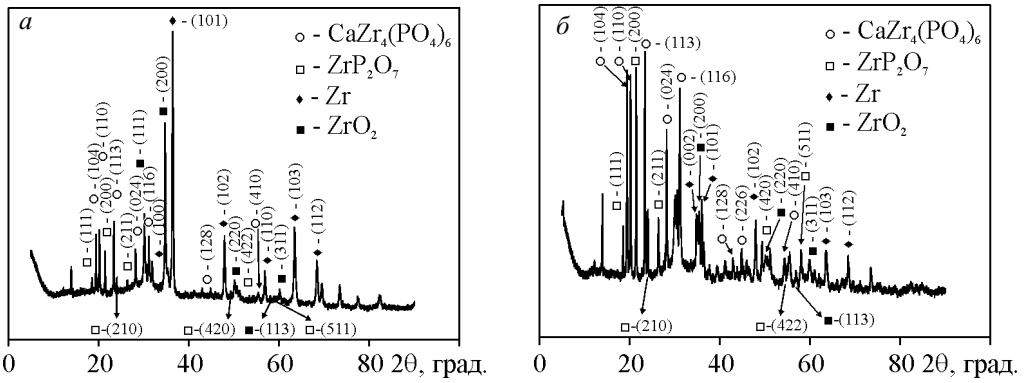


Рис.7. Типичные дифрактограммы кальцийфосфатных МДО-покрытий на Zr, нанесенных при напряжении оксидирования 200 (*а*) и 250 В (*б*).

татным и оксидным соединениям $CaTi_4(PO_4)_6$, β-$Ca_2P_2O_7$, TiP_2O_7, TiO_2(анатаз). Повышение напряжения оксидирования до 400°С не приводит к изменению вида дифрактограммы.

Из-за невозможности определения точного фазового состава кальцийфосфатных покрытий в аморфном состоянии, образцы подвергались отжигу при 800°С/1 ч (скорость нагрева 200°С/ч, охлаждение в свободном режиме) для кристаллизации фаз. Было установлено, что вид дифрактограмм отожженных образцов не зависит от напряжения оксидирования, и основной фазой покрытий является двойной фосфат титаната кальция $CaTi_4(PO_4)_6$ (рис.6*в*, *г*). В состав покрытий также входит пирофосфат кальция β-$Ca_2P_2O_7$, пирофосфат титана TiP_2O_7 и диоксид титана TiO_2 в модификации анатаза.

В отличие от покрытий на Ti, кальцийфосфатные покрытия на Zr имеют кристаллическую структуру (рис.7). Как и для Ti, из-за малой толщины покрытий, формирующихся на Zr при напряжении оксиди-

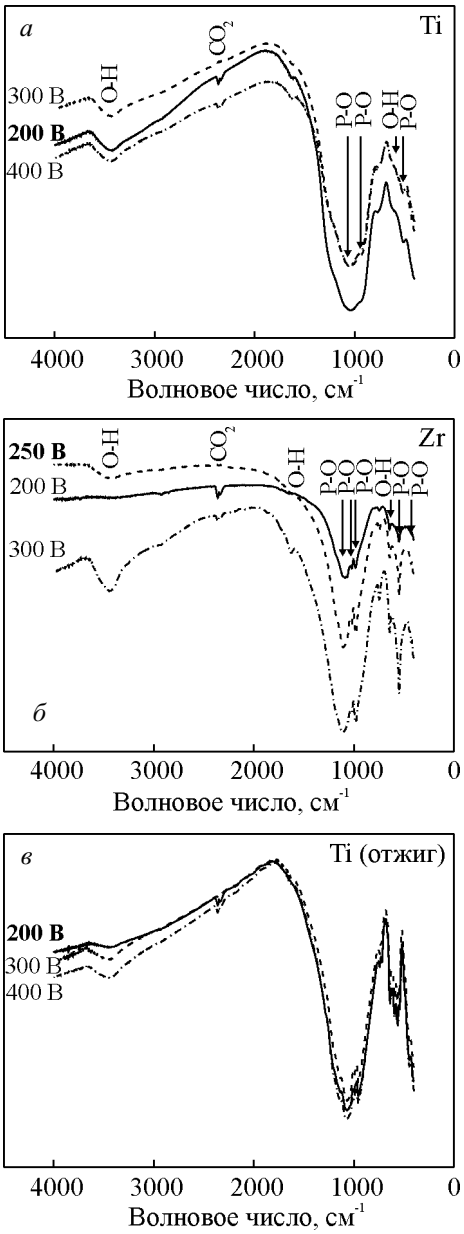


Рис.8. ИК-спектры кальцийфосфатных МДО-покрытий на Ti (*а*, *в*) и Zr (*б*).

рования 200 В, на соответствующих дифрактограммах проявляются достаточно интенсивные пики Zr и ZrO_2, относящиеся к металлической подложке. В покрытии также содержатся фазы ZrP_2O_7 и $CaZr_4(PO_4)_6$ (рис.7*а*), а с увеличением напряжения до 250-300 В и ростом кальцийфосфатного слоя основной фазой становится $CaZr_4(PO_4)_6$. Также присутствуют фазы ZrP_2O_7, ZrO_2 и отдельные пики Zr (рис.7*б*).

На рис.8 приведены ИК-спектры кальцийфосфатных покрытий на поверхности Ti и Zr. Все спектры характеризуются наличием полос поглощения OH^- групп при 3550-3200 $см^{-1}$, 1650-1620 $см^{-1}$ и 660-630 $см^{-1}$, интенсивных полос при 1130-1030 и 960-930 $см^{-1}$, принадлежащих соответственно антисимметричным и симметричным колебаниям фосфатной связи P–O, а также полосы при 600-520 $см^{-1}$, соответствующей трехкратновырожденным деформационным колебаниям связей O–P–O в фосфатной группе. Появление полосы поглощения при 2400-2300 $см^{-1}$ может быть связано с поглощением образцом атмосферного углекислого газа CO_2 во время снятия ИК-спектров [26].

Полосы поглощения для неотожженных покрытий на Ti довольно размыты (рис.8*а*), и такой вид спектров может свидетельствовать о слиянии нескольких полос поглощения, что приводит к образованию одной широкой полосы на частоте 1250-800 $см^{-1}$ для фосфатной группы. Для отожженных кальцийфосфатных покрытий на Ti и для покрытий на поверхности Zr подобного размытия ИК-спектров не наблюдается (рис.8*б*, *в*).

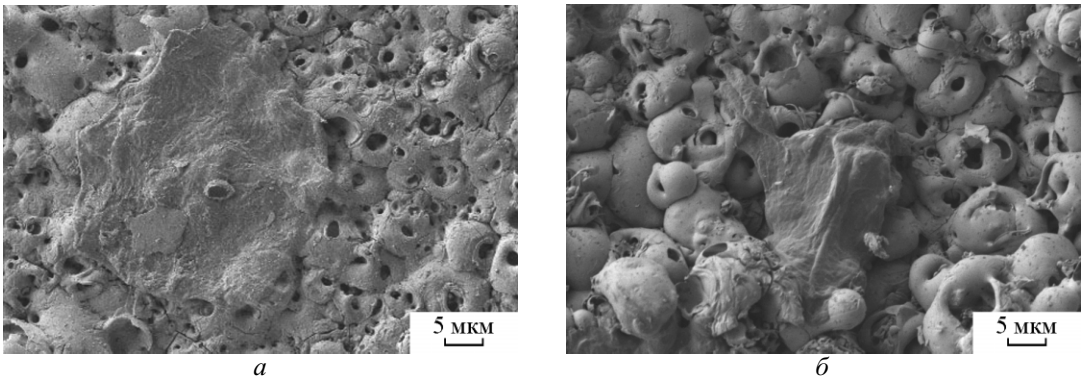
При увеличении напряжения оксидирования с 200 до 250 В наблюдается линейный рост интенсивности всех полос поглощения P–O связи для кальцийфосфатного покрытия на Zr. Эти результаты согласуются с данными, полученными рентгенофазовым анализом, и связаны с увеличением содержания фосфатов кальция и циркония в покрытии.

Зарегистрированные различия в форме и интенсивности полос поглощения при 3500-3550 $см^{-1}$ позволяют предположить, что с увеличением напряжения микродугового оксидирования в кальцийфосфатном покрытии на цирконии увеличивается содержание гидроксильных ионов (рис.8*б*). Для кальцийфосфатных покрытий на Ti зависимость содержания OH^- групп от напряжения микродугового процесса не наблюдается (рис.7*а*).

На основании полученных данных можно сделать заключение, что оптимальный интервал напряжений микродугового процесса нанесения покрытий на подложки из Ti и Zr, обеспечивающий формирование кальцийфосфатных покрытий с наилучшими физико-химическими свойствами, составляет 200-250 В.

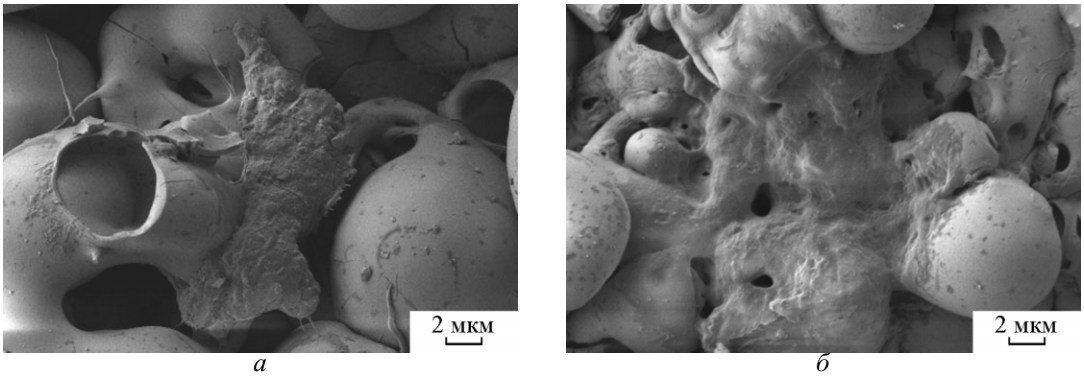
Биологические свойства кальцийфосфатных покрытий

Сравнительные исследования биологических свойств кальцийфосфатных микродуговых покрытий на Ti и Zr, полученных в оптимальных режимах микродугового процесса, изучались по реакции стромальных стволовых клеток и по изменениям морфологических и метаболических (щелочная фосфатаза) показателей клеточной культуры.



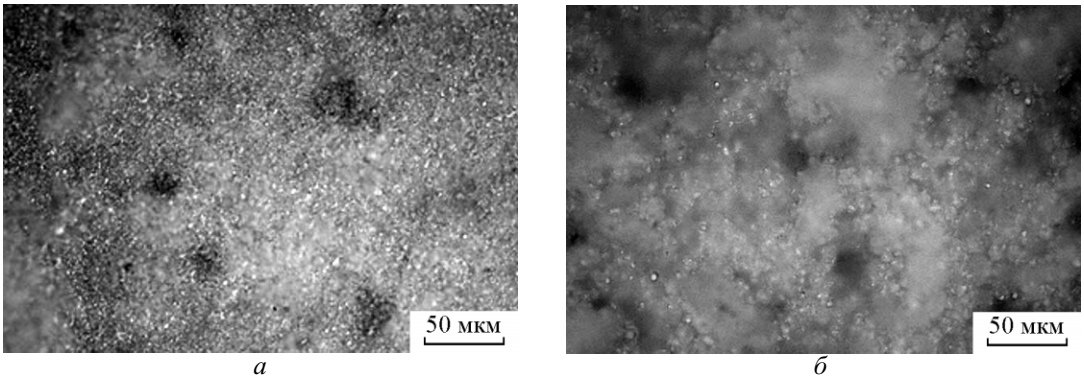
а *б*

Рис.9. РЭМ-изображения округлых пренатальных клеток легкого человека на кальцийфосфатном МДО-покрытии на Ti (*а*) и Zr (*б*).



а *б*

Рис.10. РЭМ-изображения фибробластоподобных пренатальных клеток легкого человека на кальцийфосфатном МДО-покрытии на Ti (*а*) и Zr (*б*).



а *б*

Рис.11. Микрофотографии пренатальных клеток легкого человека, положительно окрашиваемых на щелочную фосфатазу на кальцийфосфатном МДО-покрытии на Ti (*а*) и Zr (*б*).

Таблица 2

Морфофункциональные показатели пренатальных фибробластоподобных клеток легкого человека, прилипающих к образцу и окрашенных на щелочную фосфатазу, на четвертые сутки культивирования в среде без остеогенных добавок, $X \pm SD(m)$

Исследуемая группа образцов с покрытием, n=3	Оптическая плотность клеток D, у.е.о.п.	Площадь окраски клеток на ЩФ, мкм^2	Число ЩФ-позитивных клеток в 1 мм^2
Ti	2,33±2,58(1,49), n_1=41	168,55±62,69(36,19), n_1=41	20±5(3), n_2=30
Ti+CaP	5,77±1,62(0,94), n_1=74	143,28±76,61(44,23), n_1=74	104±24(14), n_2=30, p_1<0,004
Zr+CaP	5,15±1,90(1,10), n_1=115	160,69±43,41(25,06), n_1=115	74±6(3), n_2=30, p_1<0,0003

Примечания: n — число тестируемых образцов изделий; n_1 — число подсчитанных клеток на цифровых снимках; n_2 — число просмотренных снимков.
С каждого образца снимали по 10 фотографий, p_1 — статистически значимые различия с образцами Ti без покрытия.

Таблица 3

Морфофункциональные показатели культуры фибробластоподобных клеток легкого человека на пластике, окрашенных на щелочную фосфатазу, на четвертые сутки культивирования в присутствии тестируемых имплантатов, $X \pm SD(m)$

№ группы	Исследуемая группа образцов с покрытием	Показатели клеток					Показатели межклеточной жидкости	
		Площадь клетки, мкм^2	Округлость клетки, %	Эллипсовидная форма, у.е.	Оптическая плотность, у.е.о.п.	Число подсчитанных клеток	Ca, мМ	P неорг., мМ
1	Контроль (пластик)	397,43±36,52(6,67)	74±3(1)	1,25±0,04(0,01)	0,26±0,04(0,01)	2854	1,20±0,12(0,07)	0,98±0,09(0,05)
2	Ti	401,12±44,68(8,6)	77±3(1)	1,27±0,03(0,01)	0,34±0,08(0,01)	1298	1,29±0,07(0,04)	1,20±0,11(0,06)
			$P1<0,0003$		$P1<0,000004$			
3	Ti+CaP	453,66±69,14(15,09)	74±4(1)	1,27±0,05(0,01)	0,37±0,09(0,02)	539	1,22±0,05(0,03)	1,44±0,07*(0,04)
		$P1<0,0005$			$P1<0,000001$			$P1<0,002$ $P2<0,034$
4	Zr+CaP	475,38±48,45(13,44)	69±3(1)	1,31±0,04(0,01)	0,25±0,05(0,01)	314	1,23±0,02(0,01)	1,61±0,06*(0,04)
		$P1<0,000002$	$P1<0,000007$	$P1<0,00004$				$P3<0,05$

* — статистически значимые различия с соответствующей группой согласно U-критерия Манна-Уитни.

В литературе [35] выделяют прямое (свойства искусственной поверхности) и опосредованное (через продукты деградации) влияние имплантатов на жизнедеятельность клеток и тканей. Постановка текущего эксперимента *in vitro* позволила выяснить морфофункциональное состояние клеток, прикрепляющихся к поверхности биоактивных покрытий (прямой контакт), а также к пластиковой поверхности культурального сосуда вне зоны непосредственного контакта с образцом.

РЭМ исследования прямого четырехсуточного контакта культуры стромальных стволовых клеток показали, что независимо от типа металлической подложки микродуговое кальцийфосфатное покрытие способствует морфологическому созреванию клеток. При контакте с микродуговыми кальцийфосфатными покрытиями обнаруживались две популяции клеток: во-первых, хорошо распластанные клетки округлой формы диаметром 10-20 мкм с одиночными псевдоподиями (рис.9) и, во-вторых, фибробластоподобные клетки, располагающиеся в углублениях между сферолитами (рис.10). Оптическая микроскопия в отраженном свете также выявила одиночные клетки, окрашенные на щелочную фосфатазу, с аналогичной морфологией (рис.11). Функциональная активность стромальных клеток, зафиксированная по цитохимической окраске на щелочную фосфатазу, на разных подложках практически не менялась (табл.2).

Однако результаты компьютерной морфометрии с помощью программы ImageJ стволовых клеток на пластике (вне зоны прямого контакта с имплантатом) показали различное влияние тестируемых образцов с покрытиями на морфофункциональное состояние клеток (табл.3). По сравнению с контрольной культурой (клетки без добавления образца), микродуговое кальцийфосфатное покрытие на Ti подложке вызывало распластывание стволовых клеток (рост средней площади клеток с 397 до 454 мкм^2, $p<0,0005$) и активное остеогенное созревание (оптическая плотность клеток после окраски на ЩФ составила 131% от контроля, $p<10^{-6}$), хотя правильная округлая форма клеток не менялась.

В то же время, Zr металлическая подложка придавала кальцийфосфатному МДО-покрытию биоактивные свойства, отличные от свойств такого же покрытия на Ti. Имплантаты приводили к максимальному распластыванию клеток на пластике (средняя площадь клеток 475 мкм^2, $p<2\cdot10^{-6}$) и их морфологическому созреванию в фибробластоподобные формы (максимальная эллипсоидность 1,31 при 1,25 в контроле, $p<0,0004$) с псевдоподиями

Таблица 4

Биохимические и молекулярные показатели культуры пренатальных клеток легкого человека при четырехсуточном культивировании на МДО-покрытиях на различных подложках, $X \pm SD(m)$

Исследуемая группа	Концентрация показателей в супернатантах, пг/мл								
	Ca, мМ	P неорг., мМ	ЩФ, Е/л	TNFa	IL-1b	Il-6	IFNg	IL-2	Il-4
Фон культуральной среды									
1	1,24	1,11	37,4	4,14	0,22	0	0,225	21,96	0,035
Фибробластоподобные клетки на пластике, n=3									
2	1,20±0,12 (0,07)	0,98±0,09 (0,05)	35,43±1,07 (0,62)	3,44±0,40 (0,23)	0,60±0,22 (0,13)	5,16±0,99 (0,57)	2,88±0,26 (0,15)	24,0±2,98 (1,72)	0,17±0,16 (0,09)
Фибробластоподобные клетки в присутствие Ti дисков без покрытия, n=3									
3	1,29±0,07 (0,04)	1,20±0,11 (0,06)	34,20±3,16 (0,88)	4,96±0,88* (0,51) $P2<0,05$	0,57±0,24 (0,14)	5,09±0,51 (0,30)	5,00±0,91* (0,53)	23,70±2,11 (1,22) $P2<0,018$	0,09±0,04 (0,02)
Фибробластоподобные клетки в присутствии Ti дисков с микродуговым CaP покрытием, n=3									
4	1,22±0,05 (0,03)	1,44±0,07* (0,04) $P2<0,002$ $P3<0,034$	34,13±1,67 (0,97)	5,88±1,72* (0,99) $P2<0,05$	0,28±0,34 (0,20)	3,48±0,92 (0,53)	3,03±1,05 (0,61)	27,49±3,0 (1,73)	0,017±0,16 (0,09)
Фибробластоподобные клетки в присутствии Zr дисков с микродуговым CaP покрытием, n=3									
5	1,23±0,02 (0,01)	1,61±0,06* (0,04) $P3 <0,05$	34,30±0,85 (0,60)	3,76±0,34 (0,20)	0,64±0,21 (0,12)	4,45±0,40 (0,23)	3,64±1,98 (1,15)	17,49±0,80* (0,46) $P2<0,022$ $P3<0,005$	0,053±0,012 (0,007)

* — статистически значимые различия с соответствующей группой согласно U-критерия Манна-Уитни;
n — число изученных образцов (лунок планшета).

(минимальный индекс округлости 69% при 74% в контроле, $p<7\cdot10^{-6}$).

Анализ ионного состава межклеточной жидкости клеточных культур (табл.3) показал статистически значимое накопление фосфатных групп (до 147-164% от контроля) в супернатантах клеточных культур при использовании подложек с кальцийфосфатным покрытием. При этом максимальное растворение кальцийфосфатного слоя в жидкую фазу культуры отмечалось с Zr подложки. В [36] считается, что опосредованное влияние костного матрикса на стволовые клетки связано, прежде всего, с ионами кальция, выделяющимися при его ремоделировании. В наших экспериментах концентрация Ca в межклеточной жидкости практически не менялась (табл.3), однако для исследованных групп (n=12) удалось выявить прямую корреляционную зависимость между концентрацией фосфатных PO_4^{2-} групп в межклеточной жидкости и цитологическими показателями, такими как площадь клеток (r_s=0,8, $p<0,003$), прилипших к пластику, и удлинение (эллипсоидность) их формы (r_s=0,8, $p<0,003$). Для Ca подобных закономерностей не выявлено.

Целенаправленный дизайн искусственных матриц рассматривается как перспективное направление медицинского материаловедения, при этом биологическая активность и остеоинтеграция имплантатов для восстановления дефектов костной ткани зависит от свойств их поверхности и растворимости [35], а особенности имплантатов способны регулировать направление дифференцировки стромальных стволовых клеток [37]. Установленная корреляционная зависимость между физико-химическими и биологическими характеристиками кальцийфосфатных покрытий на различных металлических подложках позволяет моделировать требуемые клинические параметры имплантатов уже в процессе их изготовления.

Выводы

1. Определен интервал напряжений микродугового процесса формирования кальцийфосфатных покрытий на подложке из Ti и Zr (200-250 В), обеспечивающий формирование покрытий с оптимальными характеристиками.

2. Варьирование напряжения микродугового оксидирования позволяет получать покрытия на Ti и Zr с различными физико-химическими характеристиками, что, по-видимому, связано с различными электро- и теплофизическими характеристиками материала подложек и пассивирующих оксидных пленок на их поверхности. Увеличение напряжения микродугового оксидирования приводит к линейному росту толщины покрытия, его массы и шероховатости поверхности, а также размеров

структурных элементов покрытия — сферолитов и пор.

3. Кальцийфосфатные покрытия на Zr обладают более развитым рельефом поверхности (R_a=0,6-11 мкм), имеют более высокую плотность и низкую пористость (10-15%), размер пор в таком покрытии составляет 0,5-1,8 мкм. Более пористые (20-25%) покрытия на Ti имеют более крупные поры (1,5-13 мкм) и более однородную структуру поверхности (R_a=1,9-6 мкм), чем покрытия на Zr. Микродуговые кальцийфосфатные покрытия на Ti сразу после нанесения имеют аморфную структуру, тогда как МДО-покрытия на Zr являются кристаллическими и состоят из фаз $CaZr_4(PO_4)_6$, ZrP_2O_7 и ZrO_2.

4. При прямом контакте клеточной культуры с имплантатом наличие кальцийфосфатного МДО-покрытия на любой металлической подложке (Ti, Zr) способствует морфологическому созреванию и росту плотности распределения ЩФ-позитивных стромальных клеток на искусственной поверхности. В то же время, кальцийфосфатные МДО-покрытия на разных подложках по-разному влияют на морфофункциональное состояние стромальных стволовых клеток, окружающих имплантат, по-видимому, вследствие более сильного растворения и выхода в межклеточную жидкость фосфатных групп с покрытий на Zr подложке.

Авторы признательны профессору М.Эппле и его коллегам из университета Дуйсбург-Эссен, Германия, за помощь при выполнении экспериментов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке интеграционного проекта СО РАН, выполняемого со сторонними научными организациями, №126, программы Президиума РАН, проект №5.27, РФФИ, грант №09-04-00287а, и ФЦП Минобрнауки России, грант №09-04-00287а.

Литература

1. Суминов И.В., Эпельфельд А.В., Людин В.Б. и др. Микродуговое оксидирование (теория, технология, оборудование). М.: Экомет, 2005, 368 с.
2. Мамаев А.И., Мамаева В.А. Сильнотоковые процессы в растворах электролитов. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2005, 255 с.
3. Гордиенко П.С., Гнеденков С.В. Микродуговое оксидирование титана и его сплавов. Владивосток: Дальнаука, 1997, 186 с.
4. Марков Г.А., Терлеева О.П., Шулепко Е.К. Электрохимическое окисление алюминия при катодной поляризации. Изв. СО АН СССР, сер. химических наук, 1983, т.7, вып.3, с.31-34.
5. Руднев В.С., Яровая Т.П., Недозоров П.М., Богута Д.Л. Способ нанесения защитных покрытий на алюминий и его сплавы. Патент РФ №2263164. Опубл. 27.10.2005, бюлл. №30.
6. Руднев В.С., Яровая Т.П., Недозоров П.М. Способ плазменно-электролитического оксидирования вентильных металлов и сплавов. Патент РФ №2263163. Опубл. 27.04.2005, бюлл. №12.
7. Гузеев В.В., Верещагин В.И., Гузеев В.В., Иванова Л.Р., Карлов А.В. Покрытие на имплантат из титана и его сплавов. Патент РФ №2158189. Опубл. 27.10.2000, бюлл. №28.
8. Мамаева В.А., Мамаев А.И., Выборнова С.Н., Бориков В.Н., Дорофеева Т.И. Исследование процесса формирования биоактивных покрытий на титане и его сплавах в импульсном микроплазменном режиме. Перспективные материалы, 2005, №1, с.52-58.
9. Игнатов В.П., Верещагин В.И., Шахов В.П, Мишунина Н.В., Петровская Т.С. Способ нанесения покрытия на имплантат из титана и его сплавов. Патент РФ №2159094. Опубл. 20.01.2004, бюлл. №2.
10. Шашкина Г.А., Шаркеев Ю.П., Колобов Ю.Р., Карлов А.В. Кальций-фосфатное покрытие на титане и титановых сплавах и способ его нанесения. Патент РФ №2291918. Опубл. 20.01.2007, бюлл. №2.
11. Иванов М. Б., Волковняк Н. Н., Колобов Ю. Р. Способ получения покрытий на изделиях, выполненных из титана и его сплавов. Патент РФ №2363775. Опубл. 10.08.2009, бюлл. №22.
12. Wei D., Zhou Y., Jia D., Wang Y. Characteristic and in vitro bioactivity of a microarc-oxidized TiO_2-based coating after chemical treatment. Acta Biomaterialia, 2007, v.3, No.5, p.817-827.
13. Huang P., Wang F., Xu K., Han Y. Mechanical properties of titania prepared by plasma electrolytic oxidation at different voltages. Surf.Coat.Technol., 2007, v.201, p.5168-5171.
14. Chen J.-Z., Shi Y.-L., Wang L., Yan F.-Y., Zhang F.-Q. Preparation and properties of hydroxyapatite-containing titania coating by micro-arc oxidation. Mater.Lett., 2006, v.60, p.2538-2543.
15. Суминов И.В., Эпельфельд А.В., Борисов А.М., Людин В.Б., Романовский Е.А., Беспалова О.В., Куликаускас В.С., Дунькин О.Н., Семенов С.В. Синтез керамикоподобных покрытий при плазменно-электролитической обработке вентильных металлов. Изв. РАН, сер. Физическая, 2000, т.64, №4, с.763-766.
16. Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Eroshenko A.Yu., Khlusov I.A., Kashin O.A. The structure and physical and mechanical properties of novel biocomposite material “nanostructured titanium–calcium-phosphate coating”. Composite Interfaces, 2009, v.16, p.535-546.
17. Легостаева Е.В., Шаркеев Ю.П., Толкачёва Т.В., Толмачёв А.И., Уваркин П.В. Биоактивное покрытие на имплантате из титана и способ его получения. Патент РФ №2385740. Опубл. 10.04.2010, бюлл. №10.

18. Medical applications of titanium and its alloys: the material and biological issues. Eds. S.A.Brown, J.E.Lemons. ASTM STP 1272. West Conshohocken, PA, USA. ASTM Intl., 1996, 421 p.
19. Биосовместимость. Ред. В.И.Севастьянов. М.: 1999, 368 с.
20. Валиев Р.З., Александров И.В. Наноструктурные материалы, полученные методом интенсивной пластической деформации. М.: Логос, 2000, 272 с.
21. Ерошенко А.Ю., Шаркеев Ю.П., Толмачев А.И., Коробицын Г.П., Данилов В.И. Структура и свойства объемного ультрамелкозернистого титана, полученного abc-прессованием и прокаткой. Перспективные материалы, 2009, Спецвыпуск №7, с.107-112.
22. Меерсон А. Металлургия циркония. М.: ИЛ, 1959, 415 с.
23. Шапошников Ю.Г., Шерепо К.М., Шестерня Н.А., Берченко Г.Н. Цирконий для эксплантатов в травматологии и ортопедии. Ортопедия, травматология и протезирование, 1993, №1, с.30-33.
24. Chen X., Nouri A., Li Yu., et al. Effect of surface roughness of Ti, Zr, and TiZr on apatite precipitation from simulated body fluid. Biotechnol.Bioeng., 2008, v.101, No.2, p.378-386.
25. Тушинский Л.И., Плохов А.В., Токарев А.О., Синдеев В.И. Методы исследований материалов: Структура, свойства и процессы нанесения неорганических покрытий. М.: Мир, 2004, 384 с.
26. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия. М.: Мир, 1982, 327 с.
27. Кросс А. Введение в практическую инфракрасную спектроскопию. М.: ИЛ, 1961, 110 с.
28. Тиц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам. М.: Юнимед-Пресс, 2003, 943 с.
29. Лабораторные методы исследования в клинике. Ред. В.В.Меньшиков. М.: Медицина, 1987, 364 с.
30. Collins T.J. ImageJ for microscopy. Biotechniques, 2007, v.43, suppl.1, p.25-30.
31. Вульф Б.К., Борщевский С.М. Титан в электронной технике, М.: Энергия, 1975, 184 с.
32. Бабичев А.П., Бабушкина Н.А., Братковский А.М. и др. Физические величины: Справочник. М.: Энергоатомиздат, 1991, 1232 с.
33. Крюков И.И., Нестерова Е.В., Рыбин В.В., Рыбников А.И. Межзеренные выделения в технически чистом титане. ФММ, 1984, т.57, вып.1, с.194-197.
34. Ушаков С.С., Власова И.Г., Киевская Н.Х., Колодкина Г.И., Паршикова Г.Е., Пламадяла Н.В. Особенности микросегрегаций примесных и легирующих элементов в α-сплавах титана. ФММ, 1981, т.52, вып.4, с.880-882.
35. Cooper S.I., Visser S.A., Hergenrother R.W., Lamba N.M.K. Polymers. In: Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Eds. B.D.Ratner, A.S.Hoffman, F.J.Schoen, J.E.Lemons. 2nd ed. San Diego-London: Elsevier Academic Press, 2004, p.67-79.
36. Scadden D.T. The stem cell niche in health and leukemic disease. Best Pract.Res.Clin.Haematol, 2007, v.20, p.19-27.
37. Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Mesenchemal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res.Ther., 2007, v.9, p.204-219.