

Микродуговые Zn- и Ag-содержащие покрытия для имплантатов со сложной поровой архитектурой, полученных методом 3D-печати из титанового сплава

Ю.П. Шаркеев^{1,2}, М.Б. Седельникова¹, Т.В. Толкачева¹, Н.А. Щеглова³,
А.А. Панченко³, И.Б. Красовский³, М.В. Соломатина⁴, М.В. Ефименко⁵, В.В. Павлов⁵,
Л.А. Черданцева^{4,5}, И.А. Кирилова⁵

¹ ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН, г. Томск, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Россия

³ ООО «ЛОГИКС Медицинские Системы, г. Новосибирск, Россия

⁴ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,
г. Новосибирск, Россия

⁵ ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна»
Минздрава России, г. Новосибирск, Россия

Реферат

Актуальность. Создание пористых трехмерных материалов для возмещения дефектов кости и ее последующей регенерации является важным направлением медицинского материаловедения. Определяющими являются свойства поверхности имплантата при взаимодействии последнего с костной тканью. **Цель исследования** — оценить физико-химические свойства и совместимость с тканями живого организма пористых имплантатов со сформированными методом микродугового оксидирования кальций-фосфатными Zn- и Ag-содержащими покрытиями. **Материал и методы.** Имплантаты с различными типами пористой структуры получали методом прямого лазерного спекания из порошков титанового сплава Ti-6Al-4V. На поверхности имплантатов были сформированы методом микродугового оксидирования кальций-фосфатные покрытия, в том числе Zn- и Ag-содержащие. **Результаты.** Покрытия, нанесенные в электролитах разных составов, равномерно распределены по сетчатой структуре имплантатов. Фазовый состав Zn-содержащих покрытий, нанесенных в кислом электролите, представлен аморфными фосфатами кальция. Ag-содержащие покрытия, нанесенные в щелочном электролите, имеют аморфно-кристаллическую структуру, в качестве кристаллической фазы в них идентифицируется трикальцийфосфат в модификации α и β . По результатам МТТ-теста была выявлена высокая метаболическая активность постнатальных фибробластов человека линии rFb при их совместном культивировании с экстрактами образцов кальций-фосфатных Zn- и Ag-содержащих покрытий в течение 48 ч. в условиях 37°C, в 5% атмосфере CO₂, в сравнении с величиной метаболической активности постнатальных фибробластов человека интактной культуры. **Заключение.** В процессе исследования влияния кальций-фосфатных Zn- и Ag-содержащих покрытий на живые постнатальные фибробласты человека линии rFb выявили сохранение жизнеспособности клеток культуры, что позволяет сделать заключение о том, что изделие и его компоненты не влияли негативно на показатель клеточного дыхания, что обеспечивает сохранность жизнеспособности клеток в течение 48 ч. Однако необходимы дальнейшие исследования для определения скорости биорезорбции и степени выраженности антибактериальных свойств кальций-фосфатных Zn- и Ag-содержащих покрытий.

Ключевые слова: аддитивные технологии, трехмерный каркас, пористая структура, метод микродугового оксидирования, антибактериальное биопокрытие.

Шаркеев Ю.П., Седельникова М.Б., Толкачева Т.В., Щеглова Н.А., Панченко А.А., Красовский И.Б., Соломатина М.В., Ефименко М.В., Павлов В.В., Черданцева Л.А., Кирилова И.А. Микродуговые Zn- и Ag-содержащие покрытия для имплантатов со сложной поровой архитектурой, полученных методом 3D-печати из титанового сплава. *Травматология и ортопедия России*. 2020;26(2):109-119. doi: 10.21823/2311-2905-2020-26-2-109-119.

Cite as: Sharkeev Yu.P., Sedelnikova M.B., Tolkacheva T.V., Shcheglova N.A., Panchenko A.A., Krasovsky I.B., Solomatina M.V., Efimenko M.V., Pavlov V.V., Cherdantseva L.A., Kirilova I.A. [Micro-Arc Zn- and Ag-Containing Coatings for Implants with Complex Porous Architecture Obtained by 3D Printing Method from Titanium Alloy]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2020;26(2):109-119. (In Russian). doi: 10.21823/2311-2905-2020-26-2-109-119.

Кирилова Ирина Анатольевна / Irina A. Kirilova; e-mail: IKirilova@niito.ru

Рукопись поступила/Received: 27.02.2020. Принята в печать/Accepted for publication: 05.06.2020.

Micro-Arc Zn- and Ag-Containing Coatings for Implants with Complex Porous Architecture Obtained by 3D Printing Method from Titanium Alloy

Yu.P. Sharkeev^{1,2}, M.B. Sedelnikova¹, T.V. Tolkacheva¹, N.A. Shcheglova³,
A.A. Panchenko³, I.B. Krasovsky³, M.V. Solomatina⁴, M.V. Efimenko⁵, V.V. Pavlov⁵,
L.A. Cherdantseva^{4,5}, I.A. Kirilova⁵

¹ Institute of Strength Physics and Materials, Tomsk, Russian Federation

² National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

³ Logeeks Medical Systems, Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

⁵ Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract

Relevance. The creation of porous three-dimensional materials for bone defects compensation and its subsequent regeneration is an important direction of medical materials science. The key issue in the interaction of an implant and bone tissue is the surface properties of the implant. **The purpose of the study** is to evaluate the physicochemical properties and compatibility of tissues of a living organism and porous implants with calcium phosphate Zn- and Ag-containing formed by microarc oxidation. **Materials and Methods.** Implants with various types of porous structure were made by direct laser sintering of titanium alloy Ti-6Al-4V powders. The calcium phosphate coatings, including Zn- and Ag-containing, were formed on the implants surface by microarc oxidation. **Results.** Coatings, deposited in electrolytes of various compositions, were uniformly distributed over the implants mesh structure. The phase composition of Zn-containing coatings, deposited in the acidic electrolyte, was represented by amorphous calcium phosphates. Ag-containing coatings, deposited in the alkaline electrolyte, had an amorphous-crystalline structure, the crystalline phase of which was identified as tricalcium phosphate in the α and β modifications. The samples of extracts of calcium phosphate Zn and Ag-containing coatings were co-cultured with pFb line of the human postnatal fibroblasts for 48 hours at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. The MTT test revealed a high metabolic activity of the co-cultured fibroblasts in comparison with the fibroblasts of control. **Conclusion.** The pFb line of the human postnatal fibroblasts retained their viability for 48 hours of co-culturing with calcium-phosphate Zn- and Ag-containing coatings. The tested product and its components did not negatively affect the cellular respiration. However, further studies are needed to determine the rate of bioresorption and the degree of antibacterial activity of calcium-phosphate Zn- and Ag-containing coatings.

Keywords: additive technologies, three-dimensional framework, porous structure, microarc oxidation method, antibacterial biocoating.

Введение

Создание новых композитных материалов и покрытий с заданными свойствами является одним из главных направлений современных науки и технологий. Современные исследования направлены на создание биосовместимых, остеокондуктивных и биостабильных каркасов [1, 2] для тканевой инженерии, обладающих требуемой механической прочностью для выполнения необходимых опорных функций [3, 4]. Для улучшения остеointegrации каркасы для тканевой инженерии делают пористыми, близкими по структуре к костной ткани [2]. Пористый трехмерный материал обеспечивает необходимые условия для роста

и деления клеток, в то время как архитектура определяет окончательную структуру новообразованной кости [3].

Аддитивные технологии являются важным и быстро развивающимся направлением технологии производства в области машиностроения, авиационной промышленности, биомедицинской инженерии [5]. Метод прямого лазерного спекания DMLS (direct metal laser sintering) имеет ряд достоинств по сравнению с традиционными производственными технологиями. Главным из них является возможность быстрого производства геометрически сложных деталей без необходимости механической обработки. Технология DMLS позво-

ляет одновременно создавать несколько моделей, количество которых ограничено только размером рабочей камеры, а также создавать индивидуальные имплантаты сложной формы для проведения реконструктивных вмешательств.

Среди прочих факторов эффективность взаимодействия имплантата с живыми тканями определяется свойствами поверхности взаимодействующих структур [6, 7, 8, 9, 10]. Для придания биоинертному металлу биоактивных свойств и минимизации образования соединительной ткани в зоне имплантации на поверхности имплантатов формируют кальций-фосфатные покрытия различными методами [6, 8]. Метод микродугового оксидирования (МДО) имеет много преимуществ по сравнению с другими, так как позволяет формировать покрытия защитные, коррозионностойкие, упрочняющие, а также биологически активные на поверхности металлов вентильной группы [11, 12]. Методом МДО возможно осаждать кальций-фосфатные (КФ) соединения на металлические подложки сложной формы и таким образом модифицировать и функционализировать поверхность имплантатов различного назначения [13, 14, 15, 16, 17]. В качестве материалов для покрытий в основном используются соединения, наиболее близкие по составу и свойствам к компонентам костной ткани человека, а именно гидроксипатит, трикальцийфосфат, октакальцийфосфат [12, 13, 14, 15], кислые фосфаты кальция (брушит, монетит) [16, 17]. Серьезной проблемой в области реконструктивной биомедицины является имплантат-ассоциированная инфекция, которая становится причиной формирования выраженного воспаления в тканях в зоне имплантации и сопровождается не только болевым синдромом, но и возникновением гнойно-деструктивных изменений тканей с развитием септических расщеплений имплантатов [18, 19].

Цель исследования — оценить физико-химические свойства и совместимость с тканями живого организма пористых имплантатов со сформированными методом микродугового оксидирования кальций-фосфатными Zn- и Ag-содержащими покрытиями.

Материал и методы

Пористые имплантаты получали методом DMLS из порошков титанового сплава EOS Titanium Ti64ELI (Ti-6Al-4V), по химическому составу соответствующих ASTM F136 и ASTM F3001. Подготовительный процесс включал в себя создание трехмерной компьютерной модели образца имплантата с варьируемой пористой структурой на основе мультисрезовой компьютерной томографии, моделирование геометрии и требуемой структуры имплантата. Полученную компью-

терную трехмерную модель имплантата экспортировали в специализированное программное обеспечение 3D-принтера EOSM290. Выполняли 3D-печать имплантата методом прямого лазерного спекания мелкодисперсного титанового порошка. После остывания имплантат извлекали из рабочей камеры и подвергали термической обработке для снятия внутренних напряжений и повышения пластичности титана. В процессе термической обработки происходит плавный нагрев изделия в вакуумной среде или в среде аргона до 500–1000°C, выдержка от 1 до 6 ч. при необходимой температуре и плавное остывание до комнатной температуры. После термообработки имплантат промывали в ультразвуковой ванне с растворами щелочи, неорганической кислоты или смеси кислот. Процесс завершали повторным промыванием имплантата в ультразвуковой ванне с дистиллированной водой в течение 30–60 мин. для удаления растворителей. Перед нанесением покрытий имплантат подвергали стандартной процедуре дезинфекции и стерилизации путем автоклавирования в режиме, гарантирующем стерильность изделий, с последующим помещением в стерильную герметичную упаковку.

Покрытия наносили методом МДО с использованием установки MicroArc-3.0, которая включает в себя: импульсный источник питания, компьютер для задания параметров и управления процессом нанесения покрытий, гальваническую охлаждаемую ванну и комплект электродов. Были использованы два типа электролитов. Электролит № 1 кислого состава (pH = 1–2) включал H_3PO_4 (30% раствор), $CaCO_3$ (50–75 г/л) и нанопорошок гидроксипатита (ГА) двух различных составов (40–60 г/л): 1 — стехиометрический ГА ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) и 2 — Zn-замещенный ГА ($Ca_{9,5}Zn_{0,5}(PO_4)_6(OH)_2$). С использованием кислого электролита были получены покрытия двух типов — кальций-фосфатные без добавок (КФ_к) и кальций-фосфатные Zn-содержащие покрытия (Zn-КФ).

Электролит № 2 щелочного состава (pH = 10–11) содержал Na_2HPO_4 (30–40 г/л), NaOH (3–5 г/л), порошок β -ТСР (β - $Ca_3(PO_4)_2$, 60–90 г/л). Размер частиц β -ТСР составлял 1,5–5,0 мкм. В данном электролите были сформированы кальций-фосфатные покрытия, не содержащие микроэлементов (КФ_щ). При добавлении $AgNO_3$ (0,3–1,0 г/л) в электролит № 2 были также получены Ag-содержащие КФ покрытия (Ag-КФ).

Нанесение покрытий осуществлялось в результате воздействия микродуговых разрядов, мигрирующих по поверхности обрабатываемого материала, погруженного в электролит. При этом параметры процесса были следующими: длительность импульса — 100 мкс, частота следования

импульсов — 50 Гц, величина импульсного напряжения — 200–500 В, длительность процесса — 10–20 мин. Для исследования морфологии поверхности покрытий использовали метод растровой электронной микроскопии (РЭМ) LEO EVO 50 (Carl Zeiss, Германия), оснащенный оборудованием для энергодисперсионного микроанализа (ЦКП ИФПМ СО РАН «Нанотех», г. Томск). Толщину покрытий измеряли с помощью микрометра МК-25. Фазовый состав покрытия определяли методом рентгенофазового анализа с использованием $\text{CoK}\alpha$ -излучения (дифрактометр ДРОН-07, ЦКП ИФПМ СО РАН «Нанотех», г. Томск). Для идентификации кристаллических фаз использовали стандартную картотеку Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS).

Исследование биосовместимости кальций-фосфатных Zn- и Ag-содержащих покрытий *in vitro* проводилось методом испытания экстрактов [20] в культуре постнатальных фибробластов человека rFb (линия человеческих фибробластов крайней плоти новорожденных FRSN, пятый пассаж, коллекция клеточных культур Института цитологии РАН).

Экстракты получали путем инкубирования исследуемых образцов (среднее значение массы одного образца = 12,9 г) в культуральной среде DMEM — Dulbecco's Modified Eagle's Medium Gibco (Thermo Fisher Scientific) и 100 МЕ гентамицина/мл при 37°C (2 мл/образец) в 5% атмосфере CO_2 в течение 72 ч. Для получения субконфлюэнтного монослоя культуры постнатальных фибробластов человека rFb фибробласты рассаживали в 96-луночный планшет (TPP, Швейцария) и культивировали в течение 24 ч. в культуральной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, HyClone, Южная Америка) и 100 МЕ гентамицина/мл при 37°C в 5% атмосфере CO_2 . Затем полученные экстракты исследуемых образцов вносили в 96-луночный культуральный планшет к субконфлюэнтному монослою культуры постнатальных фибробластов человека rFb. Клетки с исследуемыми экстрактами инкубировали 48 ч. в CO_2 -инкубаторе при 37°C в 5% атмосфере CO_2 . В качестве контроля использовали интактную культуральную среду, которую инкубировали в течение 72 ч. в условиях 37°C в 5% атмосфере CO_2 . После инкубации ее вносили одновременно с экстрактами исследуемых образцов в культуру постнатальных фибробластов человека на 48 ч. [21]. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста по общепринятой методике с помощью набора МТТ Cell Proliferation Kit (Roche Diagnostics, Германия). Определение жиз-

неспособности фибробластов было основано на оценке метаболической активности клеток, выражающейся в их способности восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в нерастворимый формазан темно-фиолетового цвета [21]. Абсорбцию измеряли на автоматическом фотометре ELx808 (BioTek Instruments Inc., США) при длине волны 540 нм.

Для каждого исследуемого образца ($n = 15$) и для контроля ($n = 1$) проводились 8 независимых измерений оптической плотности раствора при проведении МТТ-теста.

Статистический анализ

При статистическом анализе полученных данных проводили расчет их средних значений и среднего отклонения. Обработку данных производили в программе Microsoft Office Excel 2013. Полученные данные составили совокупность значений, которая была проверена на нормальность распределения с помощью теста Шапиро–Уилка с помощью программного пакета STATISTICA 6.0. Подтверждение гипотезы о нормальности распределения позволило использовать критерии параметрической статистики (критерий Даннета) для сравнения данных опытных групп с данными контрольной группы.

Результаты

Методом прямого лазерного спекания DMLS из порошков титанового сплава получены образцы пористых имплантатов с различными типами пористой структуры. При использовании этой технологии разрешение печати составляет в среднем около 20 мкм. Для сравнения: типичная толщина слоя в принтерах, использующих технологию FDM, составляет порядка 100 мкм. Преимуществами оперативного вмешательства при использовании имплантатов, произведенных с помощью технологии 3D-печати, является точное совпадение с костным дефектом по форме и геометрии, индивидуальный подход к восстановлению сложных дефектов, причем поверхностная структура таких имплантатов максимально приближена к структуре костной ткани.

Для проведения экспериментальных работ были спроектированы и изготовлены методом 3D-печати образцы пористых структур с размерами: длина — 10 мм, ширина — 10 мм, высота — 5 мм. Пористая структура высотой 4 мм была сформирована на подложке из сплошного металла высотой 1 мм. Внешний вид образцов представлен на рисунке 1.

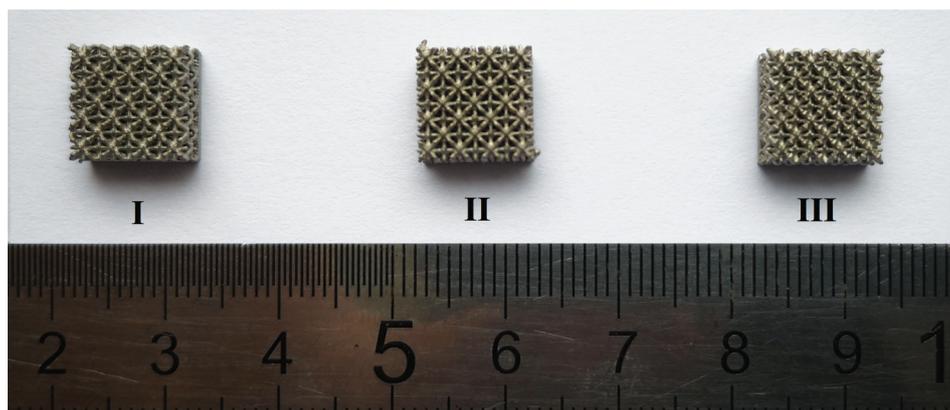


Рис. 1. Образцы пористых материалов, полученных методом прямого лазерного спекания DMLS

Fig. 1. Samples of the porous materials obtained by direct laser sintering DMLS

Параметры пористой структуры (рис. 2):

Образец I — средний диаметр поры 0,8 мм; диаметр стержня сетки 0,5 мм; объемная пористость сетчатой структуры 56%.

Образец II — средний диаметр поры 0,85 мм; диаметр стержня сетки 0,5 мм; объемная пористость сетчатой структуры 58%.

Образец III — средний диаметр поры 0,75 мм; диаметр стержня сетки 0,5 мм; объемная пористость сетчатой структуры 55%.

Методом МДО на поверхности пористых имплантатов были сформированы покрытия КФ_к и Zn-КФ в электролитах кислого состава, а также покрытия КФ_щ и Ag-КФ в электролитах щелочного состава. В результате варьирования электрофизических параметров процесса МДО были

установлены оптимальные длительность и напряжение процесса — 20 мин. и 200 В для кислого электролита; 10 мин. и 400 В — для щелочного электролита. При таких условиях покрытия наиболее равномерно распределялись по поверхности и внутреннему поровому пространству имплантатов. Толщина покрытий варьировала в диапазоне 41–58 мкм, шероховатость по параметру Ra изменялась в пределах 3,5–4,6 мкм (табл. 1).

На РЭМ изображениях представлены рельеф и морфология поверхности покрытий. Анализ микрофотографий показывает, что покрытия всех видов, нанесенные как в кислом, так и в щелочном электролите, равномерно распределены по сетчатой структуре имплантата (рис. 3 а, d, g, j).

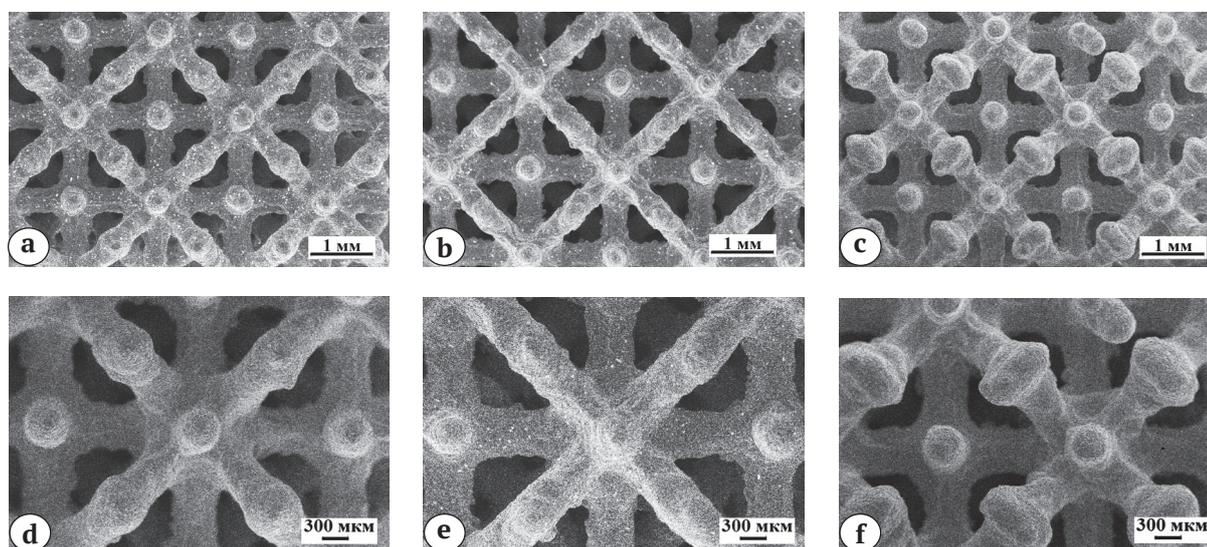


Рис. 2. РЭМ-изображения типов структур пористых имплантатов, полученных методом прямого лазерного спекания DMLS: I (a, d); II (b, e); III (c, f). Ув. $\times 50$ (a, b, c); $\times 100$ (d, e, f)

Fig. 2. SEM images of the types of structures of porous implants obtained by the direct laser sintering method DMLS: I (a, d), II (b, e), III (c, f). Magnification $\times 50$ (a, b, c), $\times 100$ (d, e, f)

Таблица 1

Свойства покрытий, сформированных при оптимальных электрофизических параметрах процесса МДО

Электролит	№ 1 (pH = 1–2)		№ 2 (pH = 10–11)
	КФ _к	Zn-КФ	КФ _ш
Тип покрытия			
Напряжение процесса МДО, В	200		400
Длительность процесса МДО, мин	20		10
Толщина, мкм	58±2	50±3	41±3
Шероховатость, Ra, мкм	3,7±0,1	3,5±0,2	3,6±0,4

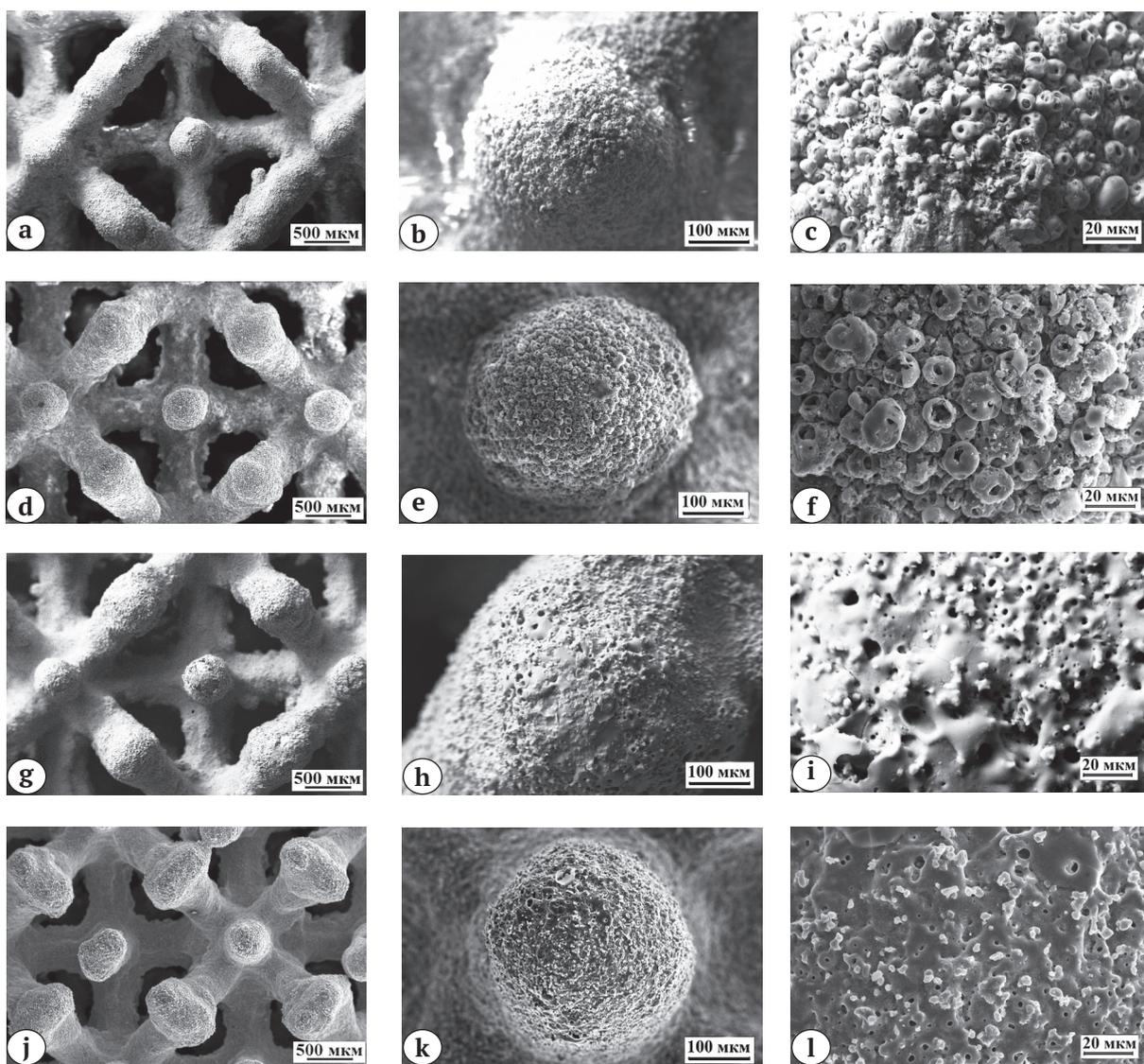


Рис. 3. РЭМ изображения покрытий на пористых имплантатах:

КФ_к (a, b, c), Zn-КФ (d, e, f), КФ_ш (g, h, i) и Ag-КФ (j, k, l). Ув. ×100 (a, d, g, j), ×500 (b, e, h, k), ×2000 (c, f, i, l)

Fig. 3. SEM images of the coatings on porous implants:

KFK (a, b, c), Zn-KF (d, e, f), KFsh (g, h, i) and Ag-KF (j, k, l). Magnification ×100 (a, d, g, j), ×500 (b, e, h, k), ×2000 (c, f, i, l)

Морфология поверхности покрытий, сформированных в разных типах электролитов, отличается. На поверхности покрытий КФ_к и Zn-КФ, сформированных в электролите № 1, при напряжении 200 В наблюдаются пористые сферы и фрагменты размером 10–15 мкм (см. рис. 3 с, f). Покрытия КФ_ш и Ag-КФ, синтезированные в электролите № 2 при напряжении 400 В, имеют пористую структуру и содержат изометричные частицы размером 3–5 мкм (см. рис. 3 i, l). Данные изометричные частицы являются частицами β-ТКФ, переносимыми из электролита в покрытие на заключительной стадии процесса МДО, когда интенсивность микродуговых разрядов становится минимальной, как показано в ранее проведенном нами исследовании [22].

Анализ элементного состава покрытий, определенного методом энергодисперсионного микроанализа, показывает высокое содержание в покрытиях основных элементов: фосфора, кальция, кислорода, титана (табл. 2). Остальные элементы, алюминий и ванадий, привнесенные в покрытие

при взаимодействии электролита с металлической матрицей, содержатся в незначительном количестве. То же можно сказать и о микроэлементах, введенных в состав покрытий для придания им особых антибактериальных свойств, — цинка и серебра. Их содержание в покрытиях не превышает 0,1 ат. %. Отношение кальция к фосфору для покрытий, сформированных в кислом электролите, составляет 0,3, а для покрытий, нанесенных в щелочном электролите, максимальное значение отношения Ca/P равно 0,8.

На картах распределения элементов можно наблюдать, что для покрытия Zn-КФ как основные элементы, так и микроэлементы распределены равномерно по поверхности (рис. 4). Для покрытия Ag-КФ наблюдается другая картина. Фосфор и кальций сосредоточены в основном в частицах β-ТКФ, формирующих поверхностный рельеф покрытия (рис. 5). Титан, алюминий и ванадий локализируются большей частью в областях покрытия, свободных от частиц. Серебро распределено в покрытии равномерно.

Таблица 2

Содержание элементов в покрытиях, ат. %

Элемент	Тип покрытия			
	КФ _к	Zn-КФ	КФ _ш	Ag-КФ
O	60,7±1,0	68,7±0,2	59,4±1,2	68,4±0,2
Al	1,0±0,03	0,7±0,05	1,4±0,3	0,8±0,07
P	20,8±0,4	15,9±0,2	14,9±0,6	10,6±0,3
Ca	5,7±0,4	5,0±0,4	10,0±1,0	8,5±0,8
Ti	11,3±0,4	9,3±0,5	13,8±1,1	12,0±0,8
V	0,5±0,03	0,5±0,03	0,6±0,06	0,4±0,03
Zn	–	0,06±0,03	–	–
Ag	–	–	–	0,04±0,02
Ca/P	0,3	0,3	0,7	0,8

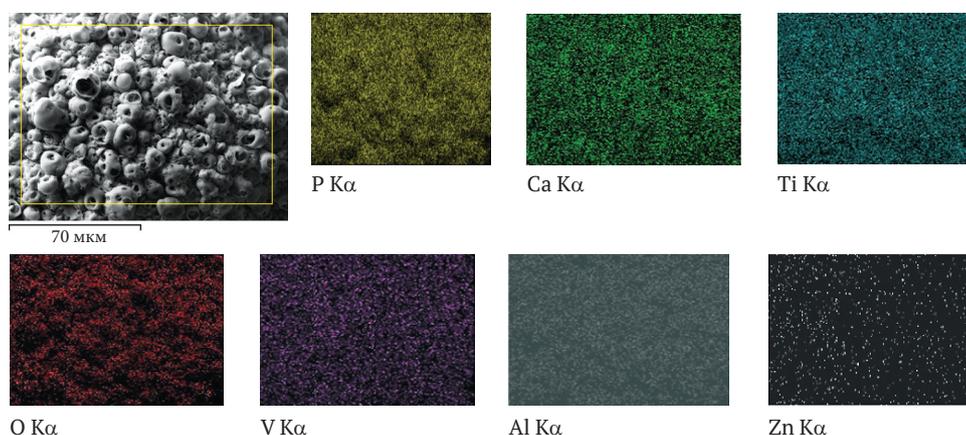


Рис. 4. РЭМ изображения и карты распределения элементов в покрытии Zn-КФ

Fig. 4. SEM images and the elements distribution maps in the Zn-KF coating

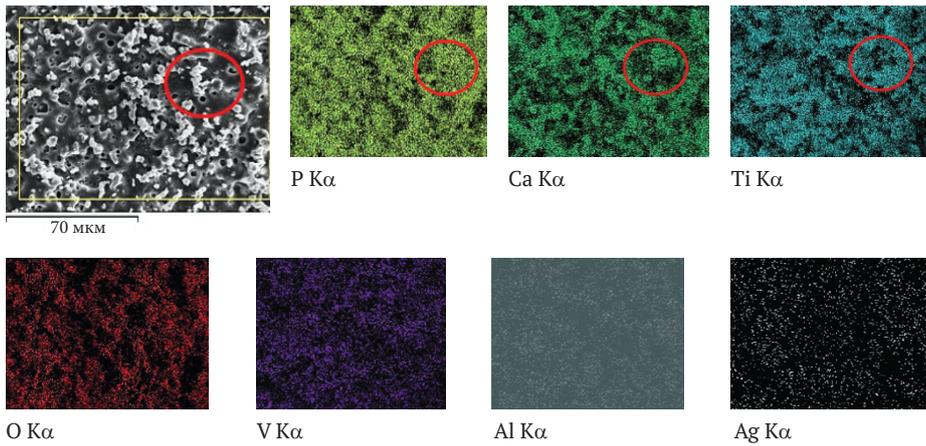


Рис. 5. РЭМ изображения и карты распределения элементов в покрытии Ag-КФ

Fig. 5. SEM images and the elements distribution maps in the Ag-KF coating

В результате исследования покрытий методом рентгенофазового анализа выявлено, что КФ_к и Zn-КФ покрытия имеют аморфную структуру, о чем свидетельствует гало в области углов 20–45° (рис. 6а). Единичные пики, присутствующие на рентгенограммах, относятся к основному материалу подложки (Ti). КФ_ш и Ag-КФ покрытия имеют аморфно-кристаллическую структуру (рис. 6б). Многочисленные рефлексы, наблюдающиеся на рентгенограммах, связаны с присутствием в покрытиях трикальцийфосфата (ТКФ) — Ca₃(PO₄)₂ в двух модификациях — α и β. На рентгенограммах также присутствует небольшое гало в области 23–45°, что свидетельствует о присутствии аморфной фазы в покрытиях.

По результатам МТТ-теста не выявили статистически значимых отличий показателей абсорбции раствора формазана при инкубировании

постнатальных фибробластов человека линии pFb с экстрактами исследуемых образцов № 1–15, от показателя абсорбции раствора формазана фибробластами интактной культуры.

Результаты МТТ-теста свидетельствуют о метаболической активности постнатальных фибробластов человека линии pFb при их совместном культивировании с экстрактами образцов № 1–7, 10, 13–15 кальций-фосфатных Zn- и Ag-содержащих покрытий в течение 48 ч. при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в сравнении с величиной метаболической активности постнатальных фибробластов человека линии pFb интактной культуры фибробластов (рис. 7).

Полученные данные позволяют сделать вывод о биосовместимости экстрактов исследуемых образцов № 1–15 с постнатальными фибробластами человека линии pFb.

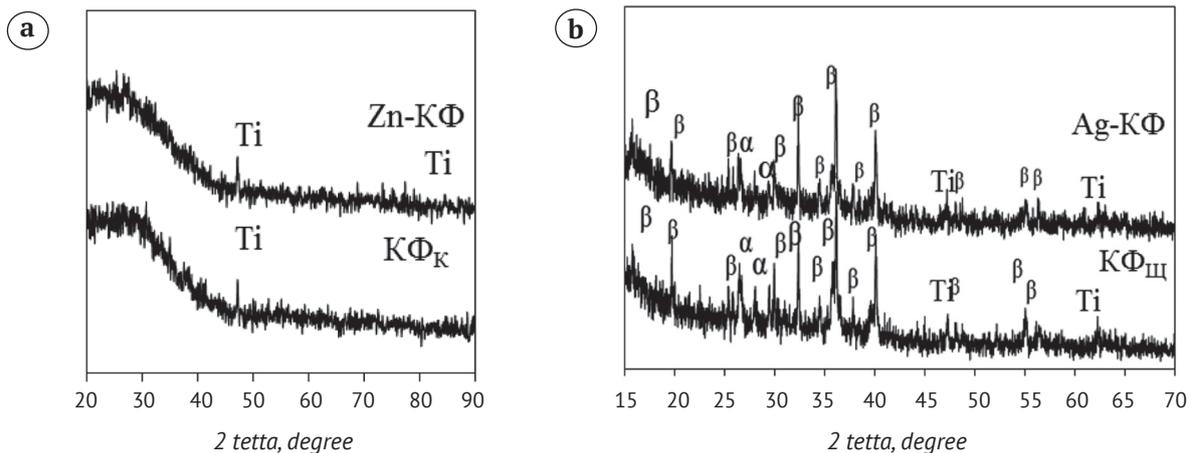
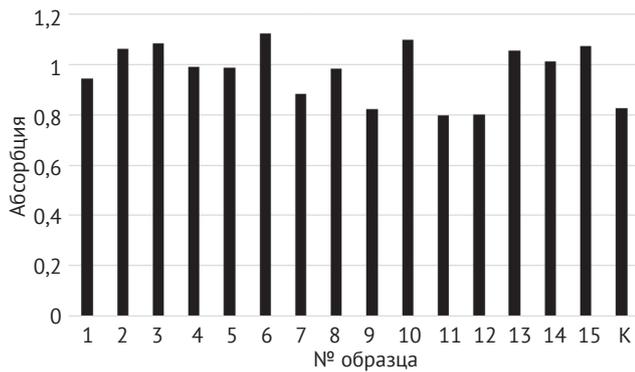


Рис. 6. Рентгенограммы покрытий, нанесенных в кислом (а) и щелочном (б) электролите: Ti — титан, α — α-ТКФ, β — β-ТКФ

Fig. 6. XRD patterns of the coatings deposited in acidic (a) and alkaline (b) electrolytes: Ti — titanium, α — α-TCP, β — β-TCP



Обсуждение

В работе S.M. Wallace с соавторами показано, что дальнейшие перспективы разработки эффективной защиты медицинских имплантируемых устройств и изделий заключаются в исследовании и применении новых неспецифических механизмов воздействия на патогенные микроорганизмы [23]. Решением данной проблемы является модификация поверхности имплантатов покрытиями, содержащими антибактериальные агенты, такие как Ag или Zn [24]. В представленной работе методом микродугового оксидирования на поверхности пористых имплантатов из титанового сплава (Ti-6Al-4V) были сформированы Ag- и Zn-содержащие кальций-фосфатные покрытия в электролитах кислого и щелочного состава. Вследствие различного состава электролитов процесс микродугового оксидирования происходил при различных напряжениях и характеризовался разной длительностью. В исследованиях M. Rizwan с соавторами [11] и S. Liu с соавторами [12] показано, что в процессе микродугового оксидирования в каналах микродуговых разрядов происходит разогрев плазмы до температур выше 1100°C, и, как следствие, разложение компонентов электролита и формирование новых фаз. В представленных исследованиях в кислом электролите формировались покрытия с аморфной структурой, тогда как в щелочном электролите, содержащем частицы ТКФ, при температуре 1125° С наблюдался полиморфный переход β-ТКФ в α-ТКФ, что подтверждается в работе П.В. Евдокимова с соавторами [25]. Изделие и его компоненты не влияли негативно на показатель клеточного дыхания, что обеспечивает сохранность жизнеспособности клеток в течение 48 ч. Ранее проведенные экспериментальные исследования показали, что Zn- и Ag-содержащие микродуговые покрытия, нанесенные на поверхность плоских образцов из титана (BT1-0) и титан-ниобиевого сплава (Ti-40 мас. % Nb) демонстрируют антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus* 209P [22].

Рис. 7. Результаты МТТ-теста при культивировании постнатальных фибробластов человека линии pFb с экстрактами кальций-фосфатных Zn- и Ag-содержащих покрытий (образцы № 1–15) в течение 48 ч. при 37°C в 5% атмосфере CO₂; средние значения абсорбции для образцов № 1–15 (M_{ср.} ± ст. откл.). Контроль (K) — это интактная культуральная среда

Fig. 7. The results of the MTT test during cultivation of human postnatal fibroblasts of the pFb line with extracts of calcium phosphate Zn- and Ag-containing coatings (samples No. 1–15) 48 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂; the average absorption values for samples No 1–15 (M±SD). A control (K) is an intact culture medium

Заключение

В процессе исследования влияния кальций-фосфатных Zn- и Ag-содержащих покрытий на поверхности пористых имплантатов, полученных методом DMLS прямого лазерного спекания из порошков титанового сплава, на живые постнатальные фибробласты человека линии pFb выявили сохранение жизнеспособности клеток культуры. Таким образом, изделие и его компоненты не влияли негативно на показатель клеточного дыхания, что обеспечивает сохранность жизнеспособности клеток в течение 48 ч. Это определяет возможность использования данного типа покрытий для создания пористых имплантатов из титанового сплава (Ti-6Al-4V) с антибактериальными свойствами. Однако необходимы дальнейшие исследования, направленные на определение скорости биорезорбции и степени выраженности антибактериальных свойств кальций-фосфатных Zn- и Ag-содержащих покрытий.

Благодарности

Авторы выражают благодарность младшим научным сотрудникам В.В. Чебодаевой и М.А. Химич из Института физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск, Россия) за оказанную помощь при выполнении экспериментов.

Конфликт интересов: не заявлен.

Источник финансирования: работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований СО РАН, 2013–2020 гг., проект № III.23.2.5.

Вклад авторов

Шаркеев Ю.П. — концепция и дизайн исследования, обзор литературы.

Седельникова М.Б. — обзор литературы, обработка данных, написание текста.

Толкачева Т.В. — нанесение покрытий, проведение исследований, обработка данных.

Щеглова Н.А. — формирование пористых имплантатов из титана, проведение исследований, обработка данных, написание текста.

Красовский И.Б. — концепция и дизайн исследования, обзор литературы, редактирование текста.

Панченко А.А. — формирование пористых имплантатов из титана, проведение исследований, обработка данных.

Соломатина М.В. — проведение биологических исследований, обработка данных.

Кирилова И.А. — обзор литературы, написание текста.

Павлов В.В. — проведение исследований, обработка данных, редактирование текста.

Черданцева Л.А. — проведение биологических исследований, обработка данных.

Ефименко М.В. — проведение биологических исследований, обработка данных.

Литература [References]

- Bassous N.J., Jones C.L., Webster T.J. 3-D printed Ti-6Al-4V scaffolds for supporting osteoblast and restricting bacterial functions without using drugs: predictive equations and experiments. *Acta Biomater.* 2019;96:662-673. doi: 10.1016/j.actbio.2019.06.055.
- Ahangar P., Cooke M.E., Weber M.H., Rosenzweig D.H. Current biomedical applications of 3D printing and additive manufacturing. *Review Appl Sci.* 2019;9(8):1713. doi: 10.3390/app9081713.
- Zhang Y., Li J., Che S., Yang Z., Tia Y. Chemical leveling mechanism and oxide film properties of additively manufactured Ti-6Al-4V alloy. *J Mater Sci.* 2019;54:13753-13766. doi: 10.1007/s10853-019-03855-4.
- McHugh K.J., Nguyen T.D., Linehan A.R., Yang D., Behrens A.M., Rose S. et al. Fabrication of fillable microparticles and other complex 3D microstructures. *Science.* 2017;357(6356):1138-1142. doi: 10.1126/science.aaf7447.
- Arabnejad S., Johnston B., Tanzer M., Pasini D. Fully porous 3D printed titanium femoral stem to reduce stress-shielding following total hip arthroplasty. *J Orthop Res.* 2017;35(8):1774-1783. doi: 10.1002/jor.23445.
- Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Ivanova A.A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis--areview. *Acta Biomater.* 2014;10(2):557-579. doi: 10.1016/j.actbio.2013.10.036.
- Falde E.J., Yohe S.T., Colson Y.L., Grinstaff M.W. Superhydrophobic materials for biomedical applications. *Biomaterials.* 2016;104:87-103. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.050.
- Otitoju T.A., Ahmad A.L., Ooi B.S. Superhydrophilic (superwetting) surfaces: A review on fabrication and application. *J Industr Engineer Chemistry.* 2017;47:19-40. doi: 10.1016/j.jiec.2016.12.016.
- Denry I., Kuhn L.T. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Dent Mater.* 2016;32(1):43-53. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.008.
- Sharma S., Verma A., Teja B.V., Pandey G., Mittapelly N., Trivedi R. et al. An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;133:120-139. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.05.014.
- Rizwan M., Alias R., Zaidi U.Z., Mahmoodian R., Hamd M. Surface modification of valve metals using plasma electrolytic oxidation for antibacterial applications: A review. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106(2):590-605. doi: 10.1002/jbm.a.36259.
- Liu S., Li B., Liang C., Wang H., Qiao Z., Formation mechanism and adhesive strength of a hydroxyapatite/TiO₂ composite coating on a titanium surface prepared by micro-arc oxidation. *Applied Surf Sci.* 2016;362:109-114. doi: 10.1016/j.apsusc.2015.11.086.
- Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синебрюхов С.Л., Хрисанова О.А., Легостаева Е.В., Завидная А.Г. и др. Кальций-фосфатные биоактивные покрытия на титане. *Вестник ДВО РАН.* 2010;(5):47-57.
- Gnednikov S.V., Sharkeev Ju.P., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Legostaeva E.V., Zavidnaya A.G. et al. [Calcium-phosphate bioactive coatings on titanium]. *Vestnik DVO RAN [Vestnik of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences]* 2010;(5):47-57. (In Russian).
- Седелникова М.Б., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Толкачева Т.В. Влияние параметров процесса микродугового оксидирования на формирование и свойства биопокрытий на основе волластонита и фосфатов кальция. *Физика и химия обработки материалов.* 2016;(6):57-63.
- Sedelnikova M.B., Sharkeev Ju.P., Komarova E.G., Tolkacheva T.V. [Effect of micro-arc oxidation process quality on the formation and properties of wollastonite- and calcium phosphate based biocoatings]. *Fizika i himiya obrabotki materialov [Physics and Chemistry of Materials Treatment]*. 2016;(6):57-63. (In Russian).
- Шаркеев Ю.П., Шейкин В.В., Седелникова М.Б., Легостаева Е.В., Комарова Е.Г., Ермаков В.В. и др. Модифицирование поверхности титановых медицинских скобок для сшивающих аппаратов методом микродугового оксидирования. *Перспективные материалы.* 2015;(10):46-55.
- Sharkeev Ju.P., Shejkin V.V., Sedelnikova M.B., Legostaeva E.V., Komarova E.G., Ermakov V.V. et al. [Modification of titanium medical agraffe surface for suturing instruments with micro arc oxidation method]. *Perspektivnye Materialy.* 2015;(10):46-55. (In Russian).
- Сафронова Т.В., Путляев В.И. Медицинское неорганическое материаловедение в России: кальцийфосфатные материалы. *Наносистемы: физика, химия, математика.* 2013;4(1):24-47.
- Safronova T.V., Putlyaev V.I. [Inorganic materials science for medicine in Russia: materials based on calcium phosphates]. [Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics]. 2013;4(1):24-47. (In Russian).
- Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;55:272-326. doi: 10.1016/j.msec.2015.05.033.
- Aydogan D.T., Muhaffel F., Kilic M.M., Acar O.K., Cempura G., Baydogan M. et al. Optimization of micro-arc oxidation electrolyte for fabrication of antibacterial coating on titanium. *Mater Technol.* 2018;33(2):119-126. doi: 10.1080/10667857.2017.1391931.
- Widmer A.F. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 2:S94-S106. doi: 10.1086/321863.
- Morrison C., Macnair R., MacDonald C., Wykman A., Goldie I., Grant M.H. In vitro biocompatibility testing of polymers for orthopaedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials.* 1995;16(13):987-992. doi: 10.1016/0142-9612(95)94906-2.
- Moller B., Terheyden H., Acil Y., Purcz N.M., Hertrampf K., Tabakov A. et al. A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(5):638-645. doi: 10.1016/j.ijom.2012.02.004.

22. Sedelnikova M.B., Komarova E.G., Sharkeev Yu.P., Ugodchikova A.V., Mushtovatova L.S., Karpova M.R. et al. Zn-, Cu- or Ag-incorporated micro-arc coatings on titanium alloys: Properties and behavior in synthetic biological media. *Surface Coating Technology*. 2019;369:52-68. doi: 10.1016/j.surfcoat.2019.04.021.
23. Wallace S.M., Walton B.I., Kharbanda R.K., Hardy R., Wilson A.P., Swanton R.H. Mortality from infective endocarditis: clinical predictors of outcome. *Heart*. 2002;88(1):53-60. doi: 10.1136/heart.88.1.53.
24. Furko M., Jiang Y., Wilkins T.A., Balázi C. Electrochemical and morphological investigation of silver and zinc modified calcium phosphate bioceramic coatings on metallic implant materials. *Mater Sci Eng C*. 2016;62:249-259. doi: 10.1016/j.msec.2016.01.060.
25. Евдокимов П.В., Путляев В.И., Мерзлов Д.А., Шаталова Т.Б., Сафронова Т.В., Климашина Е.С., Чурагулов Б.Р. Полиморфизм $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. *Наносистемы: физика, химия, математика*. 2013;4(1):48-53. Evdokimov P.V., Putlyayev V.I., Merzlov D.A., Shatalova T.B., Safronova T.V., Klimashina E.S., Churagulov B.R. [Polimorfizm $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]. [Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics]. 2013;4(1):48-53. (In Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шаркеев Юрий Петрович — д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией физики наноструктурных биоконструктивов ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН; профессор ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск

Седельникова Мария Борисовна — д-р техн. наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктивов, ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН, г. Томск

Толкачева Татьяна Викторовна — ведущий технолог лаборатории физики наноструктурных биоконструктивов, ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН, г. Томск

Шеглова Наталья Александровна — директор по развитию ООО «ЛОГИКС Медицинские Системы», г. Новосибирск

Панченко Андрей Александрович — технический директор ООО «ЛОГИКС Медицинские Системы», г. Новосибирск

Красовский Игорь Борисович — директор ООО «ЛОГИКС Медицинские Системы», г. Новосибирск

Соломатина Мария Владимировна — канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств, ФГБУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск

Ефименко Максим Владимирович — травматолог-ортопед травматолого-ортопедического отделения, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск

Павлов Виталий Викторович — д-р мед. наук, начальник научно-исследовательского отделения эндопротезирования и эндоскопической хирургии суставов ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск

Черданцева Лилия Александровна — канд. мед. наук, заведующая лабораторией заготовки и консервации тканей, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России; ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск

Кирилова Ирина Анатольевна — д-р мед. наук, зам. директора по научной работе, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск

AUTHORS' INFORMATION:

Yurii P. Sharkeev — Dr. Sci. (Phys.-Math.), Professor, Head of the Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, Institute of Strength Physics and Materials; Professor, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

Mariya B. Sedelnikova — Dr. Sci. (Tech.), Assistant Professor, Senior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, Institute of Strength Physics and Materials, Tomsk, Russian Federation

Tatyana V. Tolkacheva — Leading Technologist, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, Institute of Strength Physics and Materials, Tomsk, Russian Federation

Natalya A. Shcheglova — Development Director, Logeeks Medical Systems, Novosibirsk, Russian Federation

Andrey A. Panchenko — Technical Director, Logeeks Medical Systems, Novosibirsk, Russian Federation

Igor B. Krasovsky — Director of Logeeks Medical Systems, Novosibirsk, Russian Federation

Maria V. Solomatina — Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Department of Development and Testing of Pharmacological Agents, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Maxim V. Efimenko — Orthopedic Surgeon, Department of Traumatology and Orthopedics, Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

Vitaliy V. Pavlov — Dr. Sci. (Med.), Head of the Research Department, Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

Liliya A. Cherdantseva — Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory for the Procurement and Preservation of Tissues, Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics; Researcher, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Irina A. Kirilova — Dr. Sci. (Med.), Deputy Director, Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation