

Санкт-Петербургский государственный университет

***СОКОЛОВА Дарья Николаевна***

**Выпускная квалификационная работа**

***Разработка темплатного электрохимического метода синтеза массива микрочастиц гидроксиапатита на поверхности титана для создания биоактивных покрытий***

Уровень образования: *Бакалавриат*

Направление: *04.03.01 «Химия»*

Основная образовательная программа: *СВ.5014.2016 «Химия»*

Профиль: *базовый*

Научный руководитель: профессор  
кафедры химии твердого тела  
д.х.н., проф. Смирнов Владимир  
Михайлович

Рецензент: Главный научный  
сотрудник Акционерного общества  
«Научно-производственное  
объединение Государственный  
оптический институт им. С.И.  
Вавилова» (АО «НПО ГОИ им. С.И.  
Вавилова»),  
д.х.н. Михайлов Михаил  
Дмитриевич

Санкт-Петербург  
2020

## Содержание

Введение	4
1. Литературный обзор	6
1.1. Золь-гель технология получения неорганических покрытий	6
1.1.1. Методы нанесения покрытий золь-гель методом	8
1.2. Электрохимическое осаждение	12
1.2.1. Электрохимическое осаждение серебра	13
1.2.2. Электрохимическое осаждение фосфатов кальция	14
1.3. Темплатный синтез	16
1.3.1. Темплатный электрохимический синтез	18
1.4. Методы модифицирования поверхности титана в целях улучшения остеоинтеграции	19
1.4.1. Явление остеоинтеграции	19
1.4.2. Биоинертные и биоактивные материалы	21
1.4.3. Бактерицидные покрытия	24
1.4.4. Биомимикрические покрытия	25
2. Экспериментальная часть	27
2.1. Синтетические методы	27
2.1.1. Методика нанесения покрытий $\text{TiO}_2$ на поверхности твердой подложки золь-гель методом по технологии dip-coating	27
2.1.2. Методика электрохимического темплатного синтеза массива микрочастиц серебра	29
2.1.3. Методика электрохимического темплатного синтеза гидроксиапатита на композитном покрытии $\text{TiO}_2/\text{Ag}$	31
2.2. Аналитические методы	32
2.2.1. Рентгенофазовый анализ образцов	32
2.2.2. Исследование образцов методом ИК-спектроскопии	35
2.2.3. Исследование образцов методом оптической микроскопии	38
2.2.4. Исследование поверхности образцов методом сканирующей электронной микроскопии	40
2.2.5. Исследование образцов методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии	42

2.2.6. Цитологическое исследование образцов	44
3. Результаты работы и их обсуждение	46
3.1. Исследование перфорированной пленки $\text{TiO}_2$	46
3.1.1. Определение фазового состава оксидного покрытия методом рентгенофазового анализа	46
3.1.2. Обнаружение органических примесей в пленках оксида титана методом инфракрасной спектроскопии	47
3.1.3. Исследование зависимости структуры оксидной пленки от температуры синтетического раствора	47
3.1.4. Анализ структуры оксидного покрытия методом сканирующей электронной микроскопии	48
3.2. Анализ поверхности композитной пленки $\text{TiO}_2/\text{Ag}$	50
3.2.1. Исследование структуры покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ методом сканирующей электронной микроскопии	50
3.2.2. Определение элементного состава композиционного покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , полученного теплотным электрохимическим синтезом, методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии	51
3.3. Исследование композитного покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	52
3.3.1. Определение фазового состава осаждаемых электрохимически фосфатов кальция методом рентгенофазового анализа	52
3.3.2. Исследование структуры и элементного состава композиционного покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ методом сканирующей электронной микроскопии и методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии	54
3.3.3. Цитологическое исследование клеточной линии остеобластов MC3T3-E1 на поверхности композитного покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	58
Заключение	59
Выводы	60
Благодарности	61
Список используемой литературы	62

## Введение

Для создания костных имплантатных изделий наиболее перспективным среди материалов является титан и его сплавы, так как он характеризуется такими свойствами, как гипоаллергенность, высокий уровень биосовместимости и способности к остеоинтеграции, низкий удельный вес, относительно низкая стоимость и высокие механические свойства. В литературе отмечается, что покрытие имплантата слоем диоксида титана повышает его биосовместимость, остеоинтеграцию и остеокондуктивные свойства, а также является антибактериальным агентом [1, 2, 3, 4]. Однако на скорость приживления имплантата влияет не только химический состав, но и морфология поверхности. Наличие двухуровневой упорядоченности рельефа, состоящей из микро- и нано-неровностей, повышает биоактивность имплантата, т.к. ускоряет адгезию и способствует началу процесса дифференцировки остеобластов [3, 5]. Одним из наиболее перспективных способов нанесения текстурированной пленки диоксида титана является метод золь-гель синтеза, позволяющий контролировать рельеф и толщину покрытия.

Тем не менее, при имплантации всегда присутствует риск инфекции, что приводит к воспалению приимплантатной области и как следствие отторжению изделия. Соответственно, целесообразно применение бактерицидных агентов для предотвращения развития колонизации бактерий. Отмечается, что нанесенное на поверхность имплантата серебро оказывает антибактериальное действие [6, 7, 8]. Кроме этого указывают на положительное действие кальцийфосфатных покрытий, имитирующих минеральную составляющую костной ткани [9, 10, 11]. Так, благодаря своей превосходной остеосовместимости и биологической активности гидроксиапатит, кристаллохимический аналог минеральной части кости, является одним из наиболее используемых материалов при покрытии имплантатов для улучшения их биомедицинских свойств. Применение гидроксиапатита способствует улучшенной фиксации имплантата в костной ткани и его ускоренному приживлению. Нанесение серебра и гидроксиапатита возможно путем электрохимического осаждения. Этот метод синтеза позволяет контролировать морфологию покрытия и фазовый состав кальцийфосфатного слоя.

**Целью** данной работы является разработка методики темплатного электрохимического синтеза перспективного для имплантации композиционного покрытия с двухуровневой иерархией на поверхности титана на основе диоксида титана, серебра и гидроксиапатита.

**Задачи:**

1. Изучить зависимость качества покрытия диоксида титана, полученного методом dip-coating, на титановой подложке от температуры синтетического раствора, определить оптимальное значение.
2. Исследовать с помощью рентгенодифракционного анализа зависимость изменения фазового состава кальцийфосфатного покрытия от условий электрохимического осаждения.
3. Разработать методику темплатного электрохимического синтеза композитного покрытия на основе серебра с матрицей диоксида титана.
4. Разработать методику темплатного электрохимического синтеза композитного покрытия на основе диоксида титана, серебра и гидроксиапатита с применением в качестве темплата текстурированных пленок  $\text{TiO}_2$ .
5. Провести цитологическое исследование и оценить адгезионные свойства полученного покрытия для остеобластов.

## 1. Литературный обзор

### 1.1. Золь-гель технология получения неорганических покрытий

Обычно методы получения наноматериалов разделяют на диспергирование («top-down») и конденсацию («bottom-up»). Конденсационные включают в себя растворные методы, методы термического восстановления, метод сжигания и конденсацию из газовой фазы. Растворные методы также классифицируют на методы, включающие удаление растворителя (распылительная сушка, криохимический метод), и методы, основанные на различных вариантах смешения исходных компонентов (метод химического соосаждения, гидротермальный метод, метод замены растворителя). К последним, кроме того, относят метод, базирующийся на применении золь-гель технологии – технологии получения материала на основе перехода гомогенного раствора в золь и затем в гель (рис. 1).



Рис. 1. Схема перехода истинного раствора в золь и затем в гель.

Суть этого метода синтеза такова: на объект наносят золь, содержащий наноразмерные частицы, или раствор прекурсора, который при контакте с воздухом переходит в золь в процессе гидролиза реакционного вещества. Затем золь за счет последующего гидролиза и испарения растворителя переходит в гель. При полном удалении растворителя гель переходит в конечное состояние покрытия – ксерогель.

В золь-гель технологии золь – это высокодисперсная коллоидная система с жидкой дисперсионной средой и твердой нанодисперсной фазой. Частицы дисперсной фазы золя и их сольватная оболочка, подвержены броуновскому

движению и заполняют весь объем дисперсионной среды, так как не связаны пространственно. Размеры дисперсных частиц расположен в пределах от 1 до 100 нм. Гель – это система, состоящая из низко- и высокомолекулярных компонентов, которые образуют пространственную структурную сетку, основанную на межмолекулярном взаимодействии. По Бринкеру и Шереру гель состоит из непрерывных твердой и жидкой фаз, которые имеют коллоидные размеры (от 1 до 1000 нм) [12, 13].

В золь-гель технологии прекурсор – это вещество, образующее при определенных условиях полимолекулы, полисольватированные группы, мицеллы, из которых формируются зародыши наночастиц золя. В роли прекурсоров выступают в сущности любые гидролизующиеся соединения – алкоксиды титана  $Ti(OR)_4$  и других элементов (Al, Si, Zr и др.), соли, например, хлориды титана.

При золь-гель процессе золь переходит в гель с увеличением концентрации частиц дисперсной фазы, однако это может происходить под влиянием изменения внешних параметров: изменение pH среды, понижение температуры, изменение ионной силы раствора. Крайне важную роль в золь-гель процессе играют этапы удаления растворителя из геля (сушки). В зависимости от метода их реализации возможно получение различных продуктов синтеза: ксерогели, амбигели, криогели, аэрогели [14]. В нашей работе после удаления дисперсионной среды геля формируется ксерогель, пористый каркас. Для получения покрытий на подложку наносится золь с частицами будущей пленки, формирование которой происходит с испарением растворителя.

На схеме (рис. 2) приведены основные возможные процессы, протекающие во время золь-гель-перехода. Обозначения к иллюстрации: I – созревание золя и гелеобразование: золь (1) → гель (2); II – сушка при суперкритических условиях или промывание геля в растворителях: гель (2) → аэрогель (3); III – сушка при обычных условиях: гель (2) → ксерогель (4); IV – осаждение наночастиц: золь (1) → порошок (6); V – нанесение золя на подложки: золь (1) → пленка ксерогеля (7); VI – обжиг: ксерогель (4) или пленка ксерогеля (7) → монолитные стекло и керамика (5) или пленки и покрытия (8).

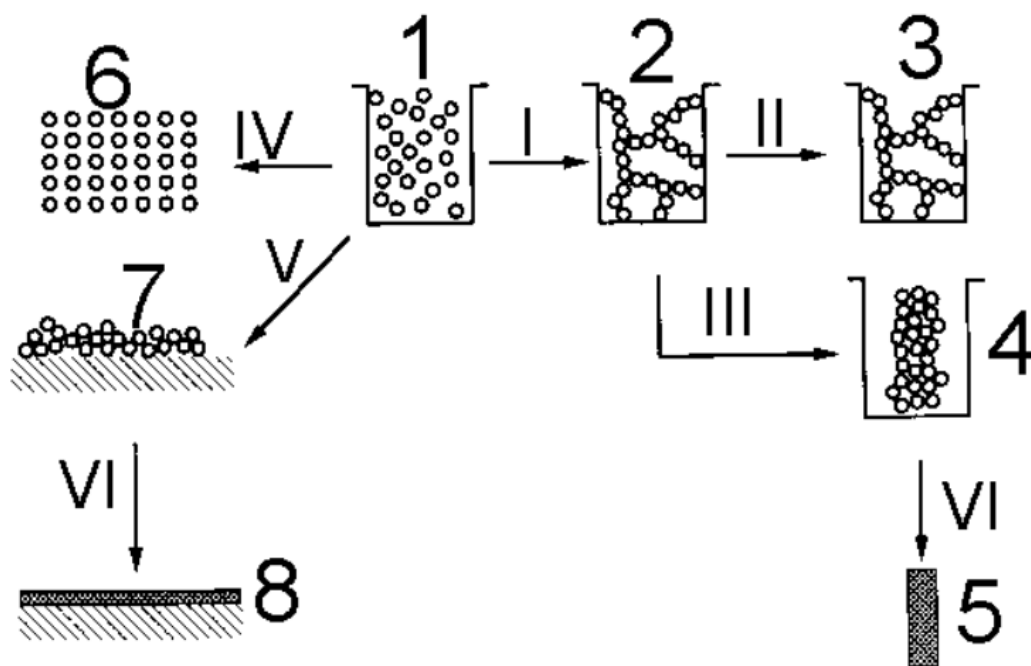


Рис. 2. Принципиальная схема получения различных материалов, покрытий и порошков методами золь-гель-технологии [12].

Золь-гель синтез обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами нанесения покрытий, как например, напыление, химическое осаждение и др. Так для золь-гель технологии характерны высокий уровень воспроизводимости, допустимость проведения синтеза в обычных условиях (температура, давление), высокая чистота конечных продуктов, возможность варьирования состава раствора изменением содержания органических и неорганических компонентов на молекулярном уровне [15].

### 1.1.1. Методы нанесения покрытий золь-гель методом

Существует ряд методов, позволяющих наносить покрытия с помощью золь-гель технологии. Среди них spin-coating, flow-coating, dip-coating, метод капиллярного покрытия и т.д.

Spin-coating – четырехстадийный процесс (рис. 3) получения покрытия на плоском диске или изогнутой чаше путем распределения слоя жидкости под действием центробежной силы. а) – нанесение избытка синтетического раствора на неподвижную или медленно вращающуюся подложку. б) – начинается вращение скоростью в несколько тысяч оборотов в минуту, центробежная сила радиально



распределяет жидкость по подложке. с) – избыток каплями удаляется по окружности, со временем пленка становится тоньше и поток замедляется из-за увеличения сопротивления течению и процессов испарения, приводящих к концентрированию и повышению вязкости. d) – из-за концентрирования пленка затвердевает, происходит полное удаление избытка, испарение приводит к истончению пленки. Одно из достоинств метода spin-coating – получение однородного покрытия вследствие одновременного действия центробежной силы и сопротивления силы вязкости, действующей радиально внутрь [16, 17].

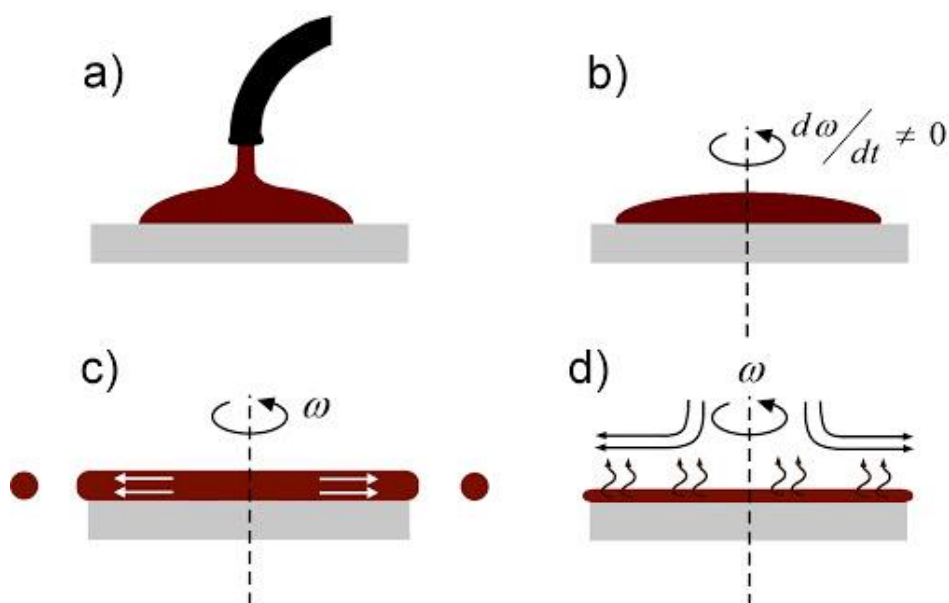


Рис. 3. Стадии метода spin-coating [16].

Flow-coating – процесс нанесения покрытия на подложку путем стекания раствора или золя по наклонной поверхности (рис. 4). Этот метод позволяет получать покрытия на изделиях более сложной формы по сравнению с возможностями spin-coating'a. Синтетический раствор, стекая, покрывает подложку и за счет испарения растворителя и контакта с воздухом затвердевает. Толщина пленки зависит от вязкости раствора, угла наклона и характеристик поверхности подложки, скорости испарения растворителя. Из-за возможности утолщения пленки в нижней части образца и, как следствие, получения неоднородностей необходим контроль процесса [18, 19].

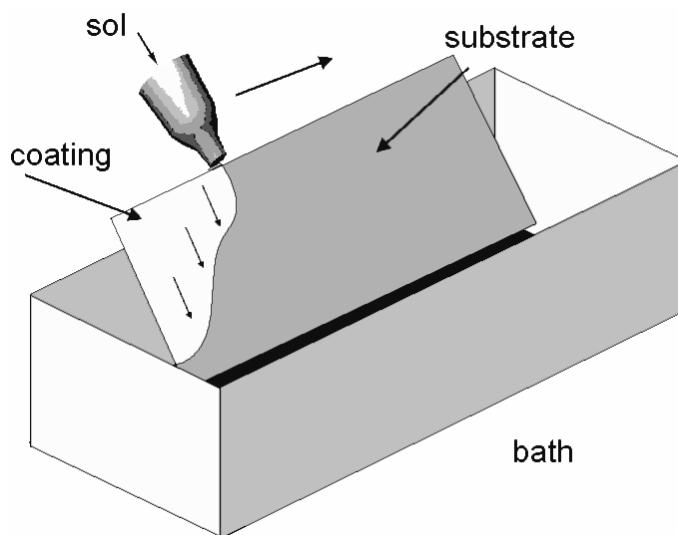


Рис. 4. Схема нанесения покрытия методом flow-coating [18].

Метод капиллярного покрытия – способ нанесения пленки при помощи капилляра, который реализует контакт между поверхностью подложки и синтетическим раствором за счет поверхностного натяжения. Однородное покрытие получают за счет возникновения мениска и его последующего отделения от поверхности с помощью «ножа» (рис. 5). Пленка затвердевает вследствие контакта с атмосферой и испарения растворителя [18].

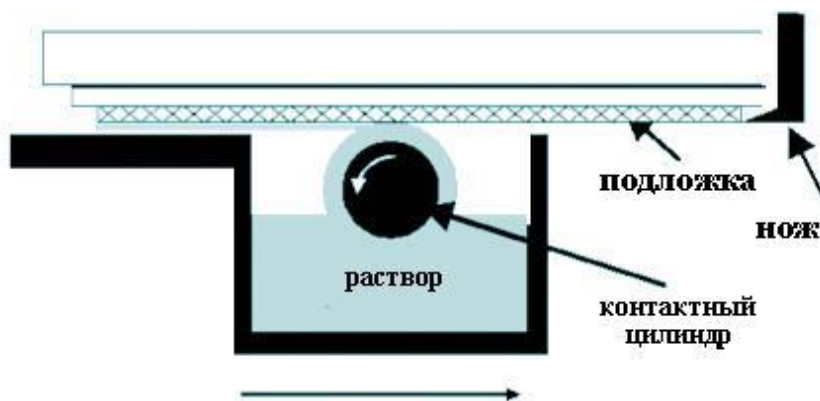


Рис. 5. Иллюстрация метода капиллярного покрытия [20].

Метод dip-coating основан на погружении подложки в емкость с материалом покрытия (золе), извлечении ее с заданной скоростью и образовании покрытия, часть которой удаляется нагревом или сушкой [21].

Процесс разделяют на пять стадий. Подложка погружается в раствор материала покрытия с заданной скоростью, затем некоторое время остается в растворе и

начинает подниматься, слой оседает на подложке во время её вытягивания также с постоянной скоростью (осаждение). После происходит дренаж: избыток жидкости стекает с поверхности. И последняя часть – испарение растворителя (причем летучие растворители, как например спирты, начинают испаряться уже на стадии осаждения) [22].

На рисунке 6 представлена последовательность основных этапов метода dip-coating: погружение подложки, её извлечение с постоянной скоростью и испарение растворителя с образованием пленки.

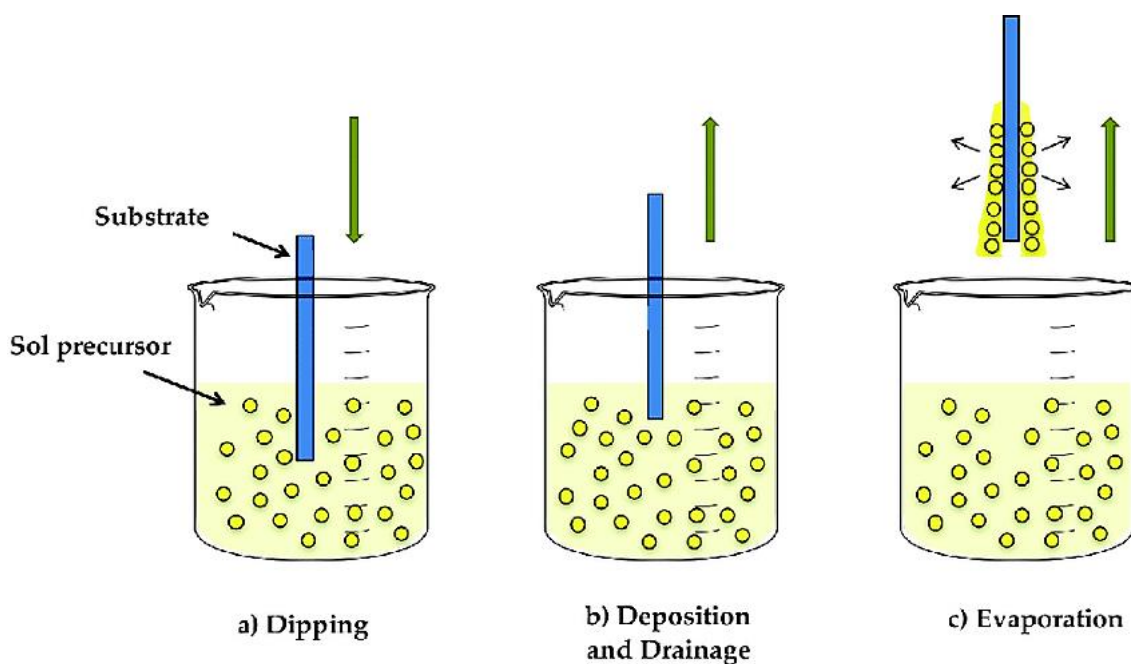


Рис. 6. Процесс получения покрытия методом dip-coating [23].

Dip-coating устройство должно без вибрации, рывков и колебаний вытягивать подложку и обладать достаточной инертностью деталей, которые могут соприкоснуться с раствором. Подложка должна быть термо- и химическистойкой по отношению к синтетическому раствору, обладать гладкой поверхностью с низкой шероховатостью. Прекурсор, типичными представителями которого являются хлориды, ацетаты металлов и алкоксиды и от которого зависит получаемый материал покрытия, также должен удовлетворять определенным требованиям: достаточная растворимость в растворителе без осаждения и кристаллизации во время его испарения, способность образования гелевой пленки.

При подъеме подложки из жидкости захватывается пленка синтетического раствора, уже на этом этапе начинается процесс испарения летучих растворителей, таких как спирты, и при некоторых условиях стадия гидролиза. Процесс формирования покрытия представляет собой равновесие жидкости между захваченной пленкой и отходящим избытком, которое зависит от вязкого сопротивления, силы тяжести, поверхностного натяжения, инерционной силы и расклинивающего давления. Толщина пленки зависит от скорости подъема пластины из раствора, концентрации и вязкости жидкости и теоретически определяется формулой Ландау-Левича [21, 24]:

$$h = 0.94 \cdot \frac{(\eta \cdot v)^{2/3}}{\gamma_{LV}^{1/6} (\rho \cdot g)^{1/2}}$$

где  $h$  – толщина покрытия,  $g$  – сила тяжести,  $\eta$  – вязкость,  $\rho$  – плотность,  $\gamma_{LV}$  – поверхностное натяжение на фазовой границе жидкость/газ.

После стадии извлечения пленка закрепляется на подложке за счет адгезии. Стадия отверждения является фактически переходом золя в гель с параллельными процессами испарения и гидролиза. На этом этапе атмосферные изменения и турбулентности могут повлиять на однородность структуры. Затем для получения целевого материала в некоторых случаях может потребоваться дополнительная термообработка посредством высушивания или спекания покрытия.

Итак, для метода dip-coating характерны следующие качества: простота обработки, автоматизация и относительно недорогое оборудование, воспроизводимость, контролируемое получение пленки различной толщины, возможность покрывать объекты сложных форм. Именно поэтому среди прочих способов нанесения покрытия нами был выбран метод dip-coating, позволяющий синтезировать однородное покрытие контролируемой толщины на подложках, имитирующих имплантаты сложных форм.

## 1.2. Электрохимическое осаждение

В работе также использовался такой метод нанесения покрытий, как электрохимическое осаждение, т.е. получение покрытия с использованием электролита под действием электрического тока от внешнего источника.

При применении данного метода подложка, на которую наносится покрытие, сконструирована как катод (отрицательный электрод) и помещается в емкость с электролитом. Электрическая цепь завершается анодом (положительным электродом), который размещается на некотором расстоянии от катода. По цепи протекает ток при низких напряжениях.

Электрохимическое осаждение достаточно удобный метод, т.к. реализуется в условиях “мягкой химии”, быстро, позволяет контролировать фазовый состав осаждаемого вещества путем изменения таких условий процесса, как время и потенциал. На структуру и свойства покрытия также могут влиять другие контролируемые условия: плотность и смена направления подаваемого тока, выделяющийся водород при электролизе, структура катода/анода, перемешивание и температура электролита, концентрация ионов осаждаемого вещества, влияние посторонних электролитов, поверхностно-активных и коллоидных веществ.

Другими достоинствами метода электрохимического осаждения являются простота, экономичность и экологичность, высокая селективность, возможность осаждения на электроды-подложки сложной формы и больших размеров при комнатной температуре и без вакуумной установки [25].

### **1.2.1. Электрохимическое осаждение серебра**

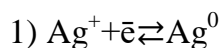
При имплантации существует риск возникновения инфекции, которая может быть вызвана хирургическим вмешательством или реакцией организма на имплантационный материал, что приводит к воспалению области вокруг имплантата и его отторжению. В связи с этим актуальными являются покрытия, препятствующие размножению и распространению бактерий, например, были предприняты попытки ковалентного связывания антибиотиков с поверхностью имплантата [26], однако из-за возможности развития антибиотикорезистентности актуальными становятся покрытия с применением серебра и его соединений [8, 27, 28].

Для нанесения серебряных покрытий применяют различные методы, в том числе послойный (layer-by-layer) синтез [29], вакуумное плазменное напыление [30] и др. Сообщается, что получение серебра методом импульсного электрохимического осаждения позволяет синтезировать покрытия, характеризующиеся равномерным

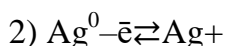
распределением осаждаемых частиц, антибактериальными свойствами и высоким уровнем биосовместимости [31, 32].

При синтезе серебряного покрытия методом электрохимического осаждения наблюдаются следующие реакции:

на катоде:



на аноде:



### **1.2.2. Электрохимическое осаждение фосфатов кальция**

Для улучшения таких качеств имплантатов, как биосовместимость и механическая устойчивость на их поверхности создают разного рода покрытия, химический состав и структура которых варьируется в зависимости от места и цели имплантации [33].

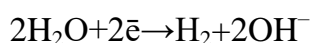
Так, в травматологии и хирургии значительную роль играют материалы на основе гидроксиапатита и других биосовместимых фосфатов кальция. Так как минеральный матрикс костной ткани в основном состоит из гидроксиапатита и в меньших количествах других фосфатов кальция, то покрытия, содержащие эти вещества на ортопедических изделиях, предназначенных для интеграции в костную ткань, способствуют ускоренному приживлению имплантата, а также восстановлению кости в месте контакта с имплантатом.

В отличие от других армирующих материалов гидроксиапатит значительно улучшает свойства имплантатов, поскольку он имеет кристаллическую структуру, аналогичную кристаллической структуре неорганического компонента естественной кости. В частности, наноразмерный гидроксиапатит морфологически напоминает биологический апатит, так что имплантаты обладают улучшенными остеокондуктивными (способствуют адгезии и распространению костной ткани по поверхности), остеоиндуктивными (стимуляция образования и роста костной ткани по поверхности) и остеогенными свойствами [34].

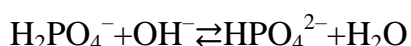
Гидроксиапатит может быть синтезирован с использованием различных методов, таких как осаждение, гидролиз и гидротермальный синтез или получение из природных ресурсов [35]. Синтетическим путем, однако, получают не только гидроксиапатит, но и в ряде случаев другие соли фосфата кальция, которые представлены в таблице 1. Наиболее распространенные методы нанесения кальцийфосфатных покрытий – плазменное и высокочастотное магнетронное напыление [36, 37]. Но эти методы не позволяют наносить покрытия на изделиях больших размеров и сложных форм, кроме того, такие покрытия неравномерны, имеют нестехиометрический состав и низкую биоактивность из-за высокотемпературной обработки. В связи с этим разрабатываются другие методы получения биоактивных покрытий, в частности, метод электрохимического осаждения фосфатов кальция за счет локального повышения уровня pH в приэлектродной области становится все более актуальным [38, 39, 40]. Так, при синтезе гидроксиапатита методом электрохимического осаждения происходят следующие реакции:

на катоде:

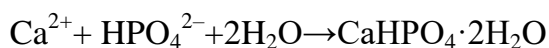
- 1) происходит электрохимическое разложение воды на газообразный водород и гидроксид-ионы



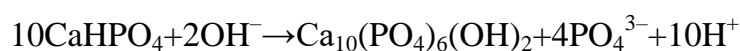
- 2) гидроксид-ионы реагируют с дигидроортофосфат-ионами



- 3) ионы  $\text{Ca}^{2+}$  реагируют с ионами  $\text{HPO}_4^{2-}$ , в результате чего на поверхности электрода осаждается  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

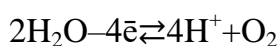


- 4) под действием гидроксид-ионов происходит следующая реакция



на аноде:

- 5) происходит электрохимическое разложение воды на газообразный кислород и протоны



Полученные таким методом покрытия характеризуются меньшими размерами кристаллитов и более высокой биоактивностью [41].

Табл. 1. Типы фосфатов кальция [35].

Ca/P	Систематическое наименование	Символ	Формула
0.5	Моногидрат монокальций фосфата	МСРМ	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.5	Монокальций фосфат безводный	МСРА	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
1.0	Дикальцийфосфатный дигидрат	ДСРД	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.0	Дикальций фосфат безводный (монетит)	ДСРА	$\text{CaHPO}_4$
1.33	Октакальцийфосфат	ОСР	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1.5	$\alpha$ -трикальцийфосфат	(А-ТСР)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.5	$\beta$ -трикальцийфосфат	(В-ТСР)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.2-2.2	Аморфный фосфат кальция	АСР	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$
1.67	Гидроксиапатит	НА	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

### 1.3. Темплатный синтез

По Стиду и Этвуду темплат – это частица или структура, которая играет организующую роль при синтезе и формировании супрамолекулярных комплексов или наноструктур [42]. За счет различных межмолекулярных взаимодействий темплат организует вокруг себя низкомолекулярные соединения и способствует созданию упорядоченного комплекса. В качестве примера можно привести метод литографического темплатирования. После взаимодействия темплат может как входить в состав полученного комплекса, так и быть вне его.

На основе темплата (шаблона) проводится темплатный синтез, во время которого происходят процессы под влиянием тех или иных факторов пространственного ограничения, которые позволяют управлять структурой образующейся фазы. С использованием этого метода возможно, например, получение нанокомпозита, который содержит наночастицы определенной формы и размера (рис. 7). Это достигается путем использования пористых оксидных или полимерных матриц с упорядоченным расположением пор определенного размера и



геометрической формы. При этом пористая матрица – темплат – задает не только форму и размеры наночастиц, но и их расположение в пространстве.

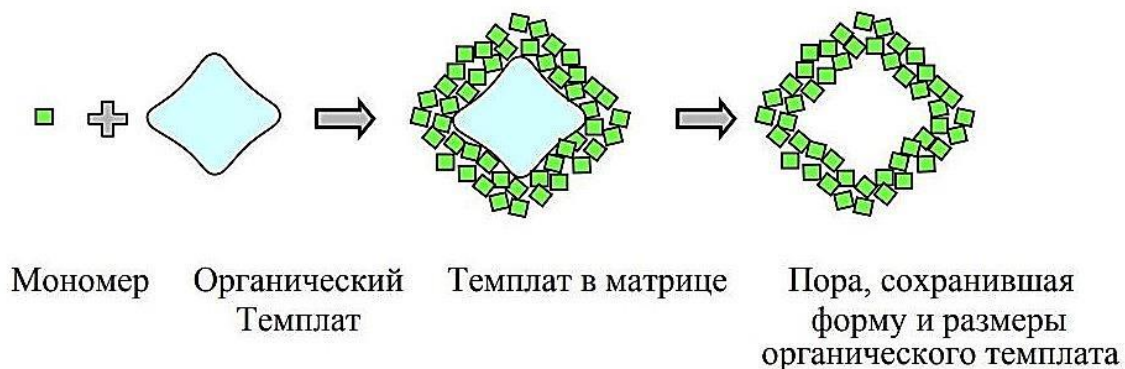


Рис. 7. Схема темплатного синтеза.

Оксидные мезопористые материалы получают посредством гидролиза прекурсоров (органических, неорганических, комплексных соединений, содержащих целевые атомы металлов и неметаллов) в растворах с молекулами темплатов. Для создания мезопористых структур с однородными по размерам порами роль темплата играют мицеллы, образованные органическими молекулами.

Еще одним классическим примером применения темплатного синтеза материалов может служить получение MCM-41 (Mobil Composition of Matter № 41). Структура материала представляет собой каркас  $\text{SiO}_2$  в форме пчелиных сот, диаметр которых составляет около 3.5 нм, стенки пор на молекулярном уровне аморфны и имеют толщину около 0.8 нм [43]. Формирование подобной структуры достигается при помощи темплатного метода: в качестве шаблона используются мицеллы различных поверхностно-активных веществ (для MCM-41 используется преимущественно цетилтриметиламмоний бромид  $[(\text{C}_{16}\text{H}_{33})\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$ ).

На рисунке 8 изображен механизм синтеза MCM-41. Поверхностно-активное вещество сначала образует стержнеобразные мицеллы, которые затем выстраиваются в гексагональные массивы. После добавления прекурсора кремнезема мицеллы покрываются гидратированными  $\text{SiO}_2$ . Позднее кальцинирование приводит к конденсации силанольных групп, так что атомы кремния соединяются атомами кислорода. Органический шаблон окисляется и удаляется из пор, что приводит к получению ксерогеля с упорядоченной системой мезопор.

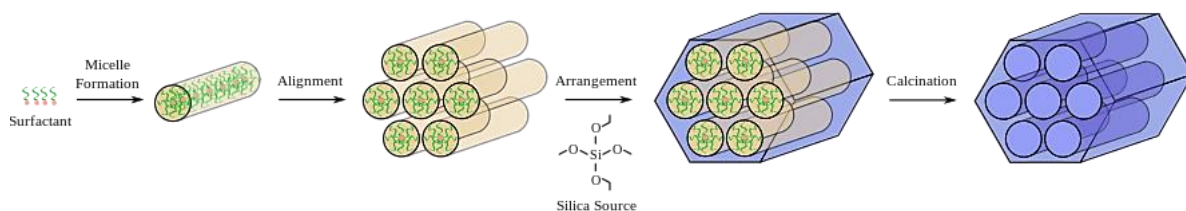


Рис. 8. Механизм образования MCM-41.

Также в качестве примеров структурообразующих агентов, которые часто встречаются в литературе по темплатному синтезу, можно привести поверхностно-активные вещества, полимеры, углеродные каркасные структуры, коллоидные золь-гели, нанопористые мембраны и др. Есть ряд методов синтеза, включающих в себя применение темплатной технологии, например, самосборка, электроосаждение, химическое осаждение, химическое парофазное осаждение, послойный (layer-by-layer) синтез, литография [44]. В нашей работе для создания покрытий был использован метод темплатного электрохимического осаждения.

### 1.3.1. Темплатный электрохимический синтез

Электрохимические методы темплатного осаждения на проводящие материалы традиционно применяются для нанесения тонких пленок различных металлов и полупроводников. В работе Penner и Martin [45] впервые представили темплатный синтез в качестве эффективного и универсального метода получения одномерных наноструктур, в частности нанопроволок. Синтез с использованием опорного шаблона (темплата) на основе электрохимического осаждения – простой и наглядный способ формирования разнообразных наноструктур. Роль темплата могут играть непроводящие поликарбонатные мембраны, стекла с наноканалами и другие пористые материалы [46, 47, 48]. Особенно в литературе внимание уделяется наноструктурированному оксиду алюминия, т.к. из-за однородной пористости он прекрасно подходит для темплатного электрохимического синтеза наноматериалов.

Темплат представляет собой пластину из анодированного оксида алюминия с множеством пор или полостей, которые заполняются требуемым материалом, принимающим форму этих пустот. В результате формируются нанопроволоки, затем темплат удаляется. Пористые анодированные пластины оксида алюминия получают методом электрохимического травления алюминиевой фольги в кислоте. Подбирая

условия анодирования, можно контролировать диаметр пор (10-200 нм), их регулярность и плотность.

Электрохимическое осаждение происходит перпендикулярно к поверхности подложки в нано- или микро-ячейки темплата. Сначала на одну из сторон темплата наносится проводящая пленка, служащая катодом, а электроосаждение осуществляется в поры мембраны. Размеры синтезируемого нанопродукта зависят от диаметра пор и времени электроосаждения. Темплат должен быть химически стойким во время синтеза по отношению к электролиту. Часто бывает целесообразно добавление в процессе осаждения поверхностно-активных веществ, способствует заполнению максимального числа пор.

Метод электрохимического темплатного синтеза позволяет синтезировать многослойные нанопроволочные структуры: изменяя катодные потенциалы в электролите с двумя типами различных ионов, можно поочередно контролируемо осадить два вида металлов. Нанопроволоки, полученные этим методом, зачастую имеют ярко выраженную кристаллическую текстуру. Кроме того возможен контроль размера кристаллитов путем регулировки напряжения, изменения состава электролита или температуры (высокие температуры могут способствовать укрупнению зерен за счет ускорения диффузионной кинетики осажденных частиц). Также применяя метод электрохимического темплатного синтеза, можно использовать различные режимы осаждения: при постоянном, переменном или импульсном токе, что влияет на характеристики конечной структуры [49].

#### **1.4. Методы модифицирования поверхности титана в целях улучшения остеointеграции**

##### **1.4.1. Явление остеointеграции**

Термин «остеointеграция», полученный из латинских слов «os» («кость») и «integrare» («целое»), был введен профессором P.-I. Brånemark в конце 1950-х годов после наблюдения интеграции титана в костную ткань [50]. По Brånemark остеointеграция – прямая структурная и функциональная связь между высокодифференцированной живой костью и поверхностью опорного имплантата, выявляемая на уровне светового микроскопа. Другими словами, это феномен

непосредственного контакта поверхности имплантата с живыми, высокодифференцированными структурами костной ткани [51].

На рисунке 9 схематически изображен процесс остеоинтеграции. Первый этап – установка имплантата и начальный период приживления: 1 – контакт между имплантатом и костью, 2 – гематома в закрытой области между имплантатом и костью, 3 – поврежденная при установке имплантата кость, 4 – неповрежденная кость, 5 – имплантат. Второй этап – приживление: 6 – образование костной мозоли, 7 – заживление поврежденной кости. Третий этап – полное приживление: 8 – нормальная костная ткань в контакте с поверхностью имплантата. На четвертом изображении представлен результат заживления без остеоинтеграции: 9 – развитие неминерализованной соединительной ткани.

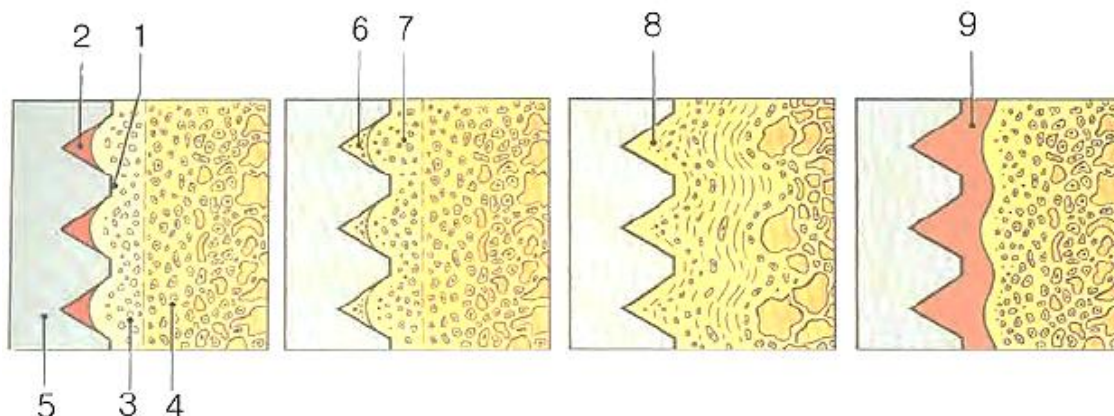


Рис. 9. Этапы процесса остеоинтеграции [52].

При успешной остеоинтеграции между поверхностью имплантата и костью не наблюдаются рубцовые ткани, хрящевые или связочные волокна. Профессором Т. Albrektsson совместно с Р.-I. Brånemark были определены факторы, влияющие на процесс остеоинтеграции: качество имплантационного материала, структура и геометрия поверхности имплантата, конструкция имплантата, состояние зоны имплантации, техника установки имплантатов, условия функциональной нагрузки [53].

После установки имплантата нарастает трабекулярная кость – начинается процесс регенерации. Постепенно она уплотняется и заменяется ламеллярной костью, которая заполняет пространство между костью и имплантатом и прорастает в поры

имплантата. Таким образом, происходит остеоинтеграция: теперь имплантат считается прижившимся и может принимать полноценную естественную нагрузку.

Хотя процесс остеоинтеграции можно наблюдать при работе с перечнем различных материалов, чаще всего этот термин используется для описания реакции костных тканей на титан или титан с кальций-фосфатным покрытием (имплантаты с подобным покрытием быстрее приживляются, а процент случаев отторжения их организмом минимален) [54]. По сравнению с другими имплантационными материалами, обладающими достаточной биосовместимостью и оптимальными физико-химическими и механическими свойствами (сплавы циркония, тантала, кобальт-хромовые сплавы с добавлением молибдена, никеля, вольфрама, некоторые виды керамики), титан отличается высокой способностью к остеоинтеграции. Предполагается, что эта особенность титана обусловлена высокой диэлектрической проницаемостью его естественной оксидной пленки.

Также титан обладает такими качествами, как гипоаллергенность, высокий уровень биосовместимости, низкий удельный вес, что обеспечивает небольшую массу имплантатов, устойчивость к коррозии за счет поверхностной пленки диоксида титана  $TiO_2$ , которая также препятствует переходу ионов титана в ткани, устраняя опасность их раздражения и воспалительных явлений, относительно низкая стоимость. При этом титан характеризуется высокими механическими показателями.

#### **1.4.2. Биоинертные и биоактивные материалы**

Биосовместимость – способность материала встраиваться в организм, не вызывая при этом побочных клинических проявлений и индуцируя клеточный или тканевой ответ, необходимый для достижения оптимального терапевтического эффекта. Следовательно, биосовместимыми материалами являются такие материалы, которые функционируют внутри живого тела, не индуцируя серьезных заболеваний или осложнений.

Различают три группы биосовместимых имплантационных материалов: биотолерантные (нержавеющая сталь, кобальто-хромовые сплавы и др.), биоинертные (титан и его сплавы, цирконий, тантал и др.) и биоактивные (гидроксиапатит, трикальцийфосфат, рассасывающиеся барьерные мембраны).

Биотолерантные материалы проявляют некоторую биосовместимость, однако они не обладают osteoconductive свойствами, следовательно, не обеспечивают адгезию белков и клеток костной ткани на своей поверхности, поэтому между поверхностью имплантата и костным матриксом не образуется физико-химическая связь, что в свою очередь приводит к формированию соединительной ткани или фиброзной капсулы вокруг имплантата, т.е. к дистантному остеогенезу [51].

Биоинертность – термин, широко используемый в ортопедии и стоматологии, обозначающий неотторжение организмом имплантируемого материала вследствие отсутствия токсического воздействия на него.

Для биоинертных имплантационных материалов характерны выраженные osteoconductive свойства: их поверхность обеспечивает физико-химическую связь с костным матриксом. Биоинертные материалы позволяют кости формироваться в непосредственной близости от поверхности имплантата, практически не взаимодействуя при этом с окружающими тканями и не вызывая образования выраженного фиброзного слоя. С течением времени в результате такого взаимодействия можно наблюдать непосредственный контакт костной ткани с имплантатом, т.е. явление остеоинтеграции, в основе которого лежит контактный остеогенез.

Зачастую на поверхности биоинертных материалов присутствует стойкая оксидная пленка, которая способствует адсорбции белков, необходимых для запуска остеогенеза, а также препятствует выходу ионов из имплантата и проникновению в него молекул из окружающей биологической жидкости. Теоретически биоинертные материалы не должны изменять свой состав и физико-химические свойства на протяжении всего времени нахождения в организме или биоактивных средах.

При выборе биоинертного материала преимущество отдают диэлектрикам, чьи характеристики препятствуют проявлению электрохимических и гальванических явлений вокруг имплантата. Примером таких соединений может быть металлокерамика из оксида титана, циркония и алюминия. Однако следует понимать, что никакой материал, имплантируемый в живую ткань, не может быть абсолютно инертным. На границе раздела ткань-имплантат наблюдаются реакции, которые

зависят от многих факторов [55], а также изменение конформации биомолекул при сорбции [56].

Биоактивность может рассматриваться как свойство материала, которое характеризует степень его воздействия на патофизиологические и морфологические процессы, происходящие в зоне контакта с биологическим объектом.

Биоактивным материалом называется такой материал, который связывается с биологическими системами для повышения эффективности лечения, образования или замещения ткани или органа при выполнении тех или иных функции организма [57]. Существует пять основных категорий биоактивных материалов для костной имплантации: кальцийфосфатная керамика, стекло и стеклокерамика, биоактивные полимеры, биоактивные гели и композиты.

Имплантационные биоактивные небиологические материалы участвуют в ионном обмене и метаболизме костного матрикса. Они частично или полностью замещаются костной тканью в процессе ее регенерации. В травматологии и ортопедии применяются биоактивные имплантаты, обладающие общим характерным свойством – образованием слоя гидроксиапатита на поверхности при имплантации. Такой слой приближен по составу и структуре к минеральной фазе кости и растет в виде поликристаллических агломератов, в состав которых входят коллагеновые фибриллы. За счет этого неорганическая поверхность имплантата связывается с органическими компонентами тканей, и граница раздела между имплантатом и костью почти идентична естественно возникающим границам раздела между костями, сухожилиями и связками.

Кальцийфосфатные материалы, которые получают методами химического осаждения, спекания и синтеза, являются аналогом главного компонента минеральной части кости и обладают выраженными остеоиндуктивными свойствами, т.е. способны вызывать остеогенез, но в результате взаимодействия с биологической средой подвергаются частичной или полной деградации. При направленной тканевой регенерации, в частности, для наращивания костной ткани применяют композиционные материалы на основе высокомолекулярного полиэтилена с минеральным гидроксиапатитным наполнителем.

Другим примером биоактивного материала являются биоактивные полимеры молочной и лимонной кислот, которые используют для создания рассасывающихся барьерных мембран [58].

### **1.4.3. Бактерицидные покрытия**

В результате хирургического вмешательства при имплантации нередко пациенты страдают от осложнений, вызванных бактериальными инфекциями. Для ингибирования процессов воспаления прибегают к антибиотикам, однако это чревато развитием резистентности бактерий к антибиотическим препаратам. Альтернативой является нанесение неорганических бактерицидных покрытий, например, соли свинца, кадмия, ртути, алмазоподобный углерод и т.д. Однако такие имплантационные покрытия должны не только проявлять выраженные бактерицидные свойства, но и быть биосовместимыми, устойчивыми в условиях биологических жидкостей организма и не способствовать локальному раздражению. Наиболее перспективными в настоящее время считаются серебросодержащие покрытия [28, 59, 60].

Серебро обладает бактерицидными свойствами широкого спектра действия, характеризуется хорошим уровнем биосовместимости и стабильности [6]. Кроме того отмечаются его выраженные противогрибковые и антисептические способности. Серебро выделяется наиболее сильным бактерицидным действием среди прочих металлов: оно проявляет высокий уровень бактерицидного воздействия на аэробные и анаэробные микроорганизмы, в том числе на устойчивые к антибиотикам [61].

Антибактериальное действие серебра может быть объяснено различными механизмами действия (рис. 10): выделение ионов нарушает процессы синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) и репликации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК); генерация активных форм кислорода, что вызывает окисление и гибель клеток; повреждение клеточной мембраны, нарушение ее проницаемости [8, 62].



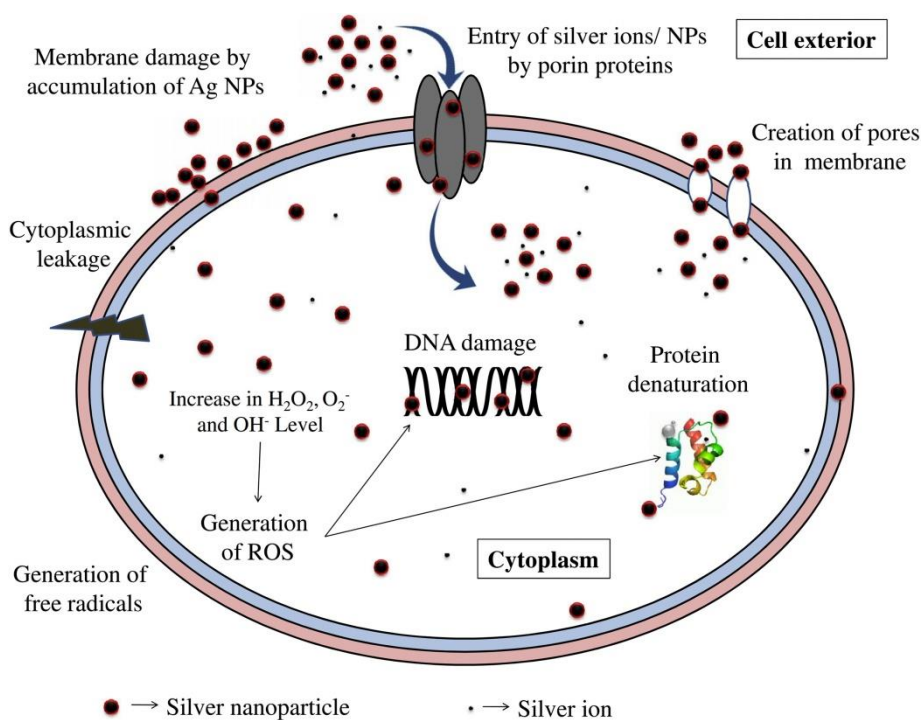


Рис. 10. Возможные механизмы влияния серебра на бактериальную клетку [8].

Поскольку инфекции, связанные с имплантированием, тяжело поддаются лечению, оказывается необходимым введение профилактических мер против развития микроорганизмов [63]. Соответственно, разрабатываются покрытия, направленные на предотвращение формирования так называемых биопленок, образующихся на поверхности вживляемых конструкций [64, 65], а также покрытия, препятствующих адгезии бактерий [66, 67].

Помимо имплантологии серебро находит широкое применение в различных областях. Так, например, наноразмерные частицы серебра используются для покрытия медицинских инструментов, таких как катетеры, скальпели и иглы [68], при разработке систем доставки лекарств [69], в пищевой промышленности – для предотвращения развития микроорганизмов в продуктах [70]. Отмечается эффективность серебряных покрытий, нанесенных на медицинскую, текстильную, косметическую и бытовую технику [69], развивается производство серебросодержащих тканей на основе хлопка [71].

#### 1.4.4. Биомимикрические покрытия

Биомимикрия – термин, который произошел от греческих слов *bios* – «жизнь» и *mimesis* – «имитировать», означает повторение (имитирование) природных

принципов и систем. При разработке современных биоматериалов широко используются природные концепции на основе биомимикрии [72, 73].

Так, в костной имплантации используются данные о структуре и составе твердых тканей, соединяющихся с инородным телом имплантата, для создания требуемого для остеоинтеграции упорядочения его поверхности. Путем имитации топографии поверхности можно регулировать поведение клеток, например, остеогенную дифференцировку, что необходимо для обеспечения долгосрочной остеоинтеграции имплантатов и успешной регенерации кости [74, 75].

Для улучшения приживляемости и оптимизации способов фиксации используется как пористая поверхность металлического имплантата, имитирующая лакуны остеоцитов, так и покрытие из фосфата кальция в форме гидроксиапатита, который имитирует состав минеральной компоненты ткани, благодаря чему кость срастается с поверхностью протеза, стабилизирует его, и соединение имплантата с костью оказывается более прочным и долговечным, а переход имплантат/кость менее контрастным в силу сродства структуры.

## 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Синтетические методы

#### 2.1.1. Методика нанесения покрытий $\text{TiO}_2$ на поверхности твердой подложки золь-гель методом по технологии dip-coating

Для получения на титановой подложке перфорированной пленки  $\text{TiO}_2$  применялся метод золь-гель синтеза с использованием технологии dip-coating.

В качестве синтетического раствора использовался спиртовой (ИПС) раствор изопророксида титана следующего состава:  $((\text{CH}_3)_2\text{CHO})_4\text{Ti}$  изопророксид титана (ТТИР),  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$  изопроропиловый спирт (i-PrOH),  $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$  диэтаноламин (DEA),  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$  полиэтиленгликоль (PEG-20000),  $\text{H}_2\text{O}$  вода. Реагенты были взяты в соотношении ТТИР/i-PrOH/DEA/ $\text{H}_2\text{O}$  = 227/773/105/36 на основании литературных данных [76], количество PEG-20000 составляло 2.5%.

На рисунке 11 представлена установка, на которой был приготовлен синтетический раствор. В безводном изопроропиловом спирте растворяли диэтаноламин, после чего приливали изопророксид титана и тщательно перемешивали раствор с помощью магнитной мешалки. Затем также при перемешивании в полученный раствор приливали воду для проведения неполного гидролиза, приводящего к образованию полиалкоксидов титана. Далее добавляли PEG-20000 и нагревали смесь до его полного растворения.

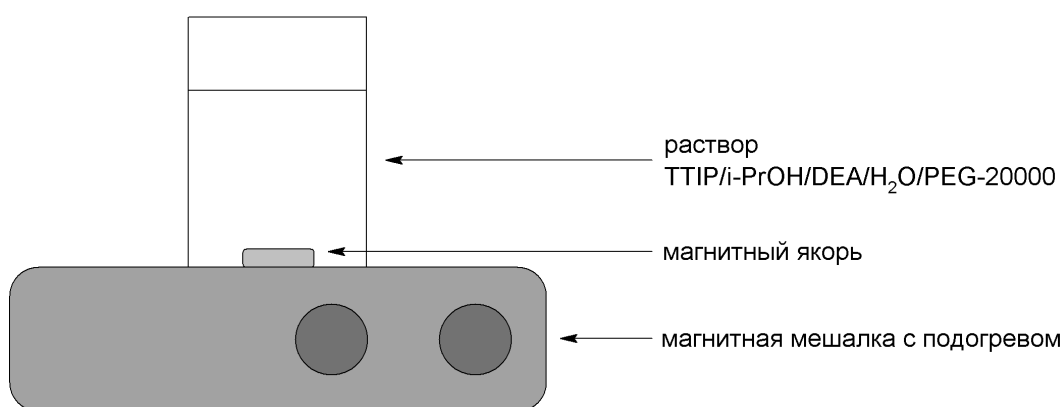


Рис. 11. Схема установки для приготовления синтетического раствора.

Нанесение покрытия производилось методом dip-coating на приборе KSV NIMA dip-coating single small. Титановую подложку опускали в подогретый раствор:

была проведена серия экспериментов с различными температурами раствора от 40°C до 60°C с шагом 5°C. После этого с помощью dip-coater'a вытягивали со скоростью 100 мм/мин (рис. 12). Затем производили на плитке шоковую сушку (hot plating) при 400°C, кипятили в воде в течение 30 мин для удаления органических остатков с поверхности подложки и сушили на воздухе (рис. 13).

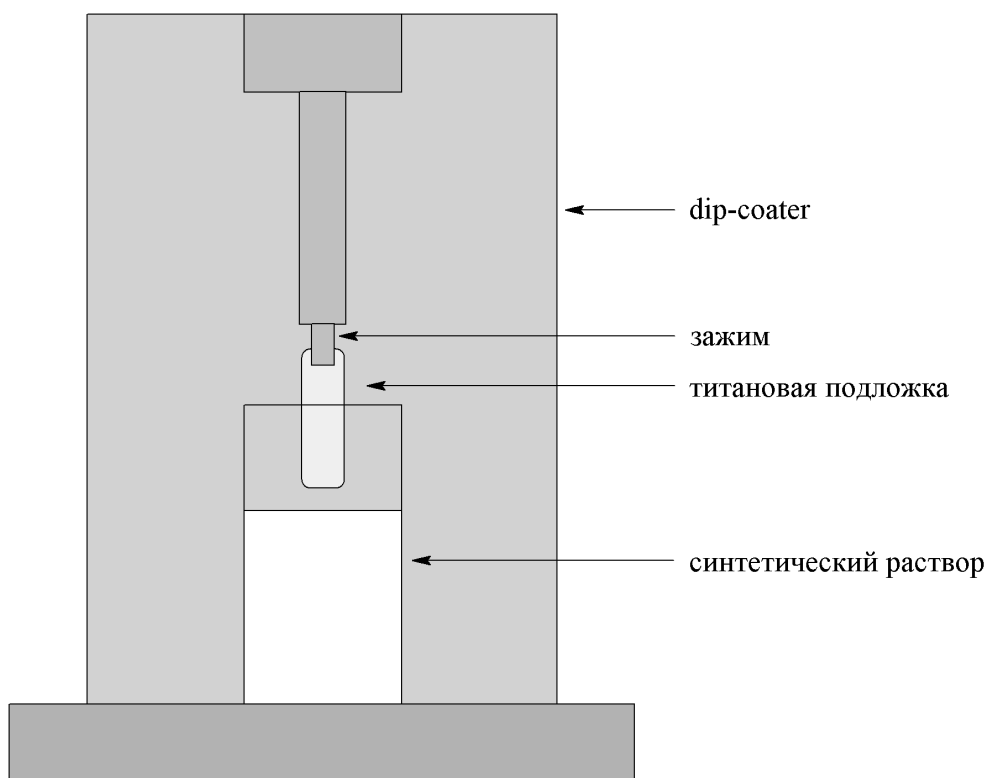


Рис. 12. Схема dip-coater'a

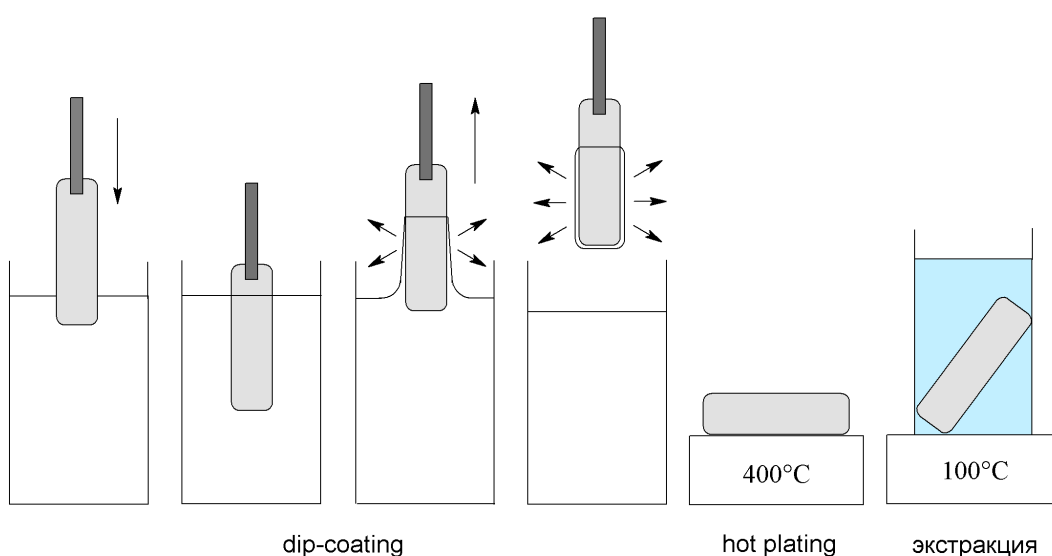


Рис. 13. Схема синтеза перфорированной пленки  $\text{TiO}_2$ .

После вытягивания на поверхности титановой подложки формировался тонкий слой синтетического раствора, претерпевавшего во влажной атмосфере следующие превращения: истинный раствор прекурсора оксида титана → золь → гель. В осажденном геле за счет снижения растворимости полиэтиленгликоля возникала микронная структура полимерных капель в матрице геля. После шоковой сушки, водной экстракции и сушки на воздухе пленка преобразовывалась в текстурированный на микронном уровне ксерогель диоксида титана (рис. 14). Реакция гидролиза раствора с образованием пленки  $\text{TiO}_2$  в ходе синтеза представлена на рисунке 15.

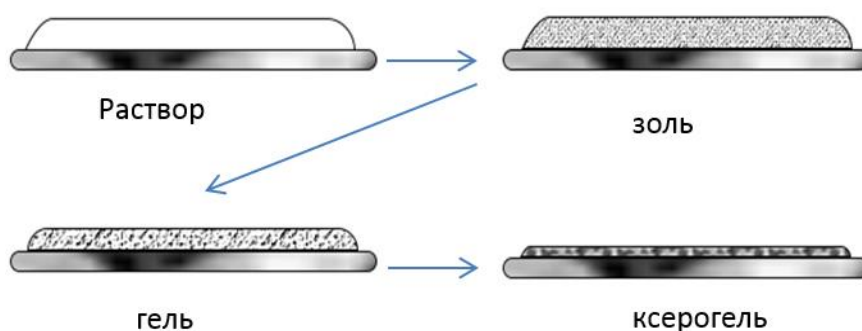


Рис. 14. Схема синтеза покрытия методом золь-гель технологии.

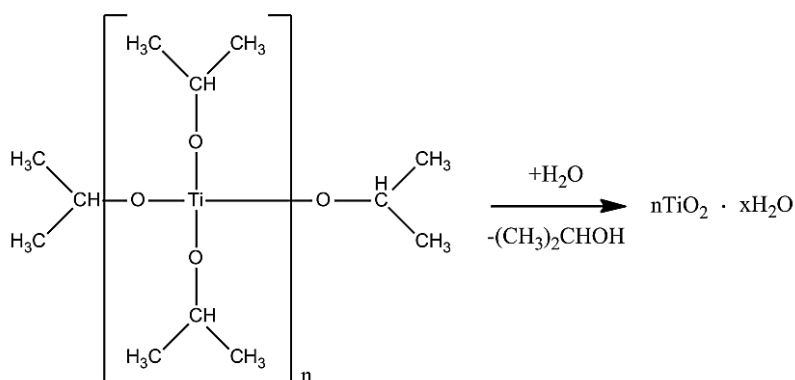


Рис. 15. Реакция синтеза покрытия  $\text{TiO}_2$ .

### 2.1.2. Методика электрохимического темплатного синтеза массива микрочастиц серебра

Электрохимическое осаждение серебра производилось методом электрохимического темплатного синтеза с применением в качестве темплата текстурированных пленок  $\text{TiO}_2$  на приборе потенциостат-гальваностат Ellins P-45X с

использованием серебряного анода. Для синтеза был приготовлен раствор данного состава: 3.15 г нитрата серебра  $\text{AgNO}_3$  и 11 г сульфосалициловой кислоты  $\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{SO}_3\text{H})\text{COOH}$  на 100 мл воды. Для доведения значения  $\text{pH}=9$  приливали гидроксид аммония  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Перед осаждением серебра поверхность подложки с нанесенной диоксидной пленкой покрывали электроизоляционным лаком, исключая область площадью  $15 \times 7$  мм, для нивелирования влияния геометрических дефектов подложки. Синтез проводился при перемешивании электролита магнитной мешалкой (рис. 16).

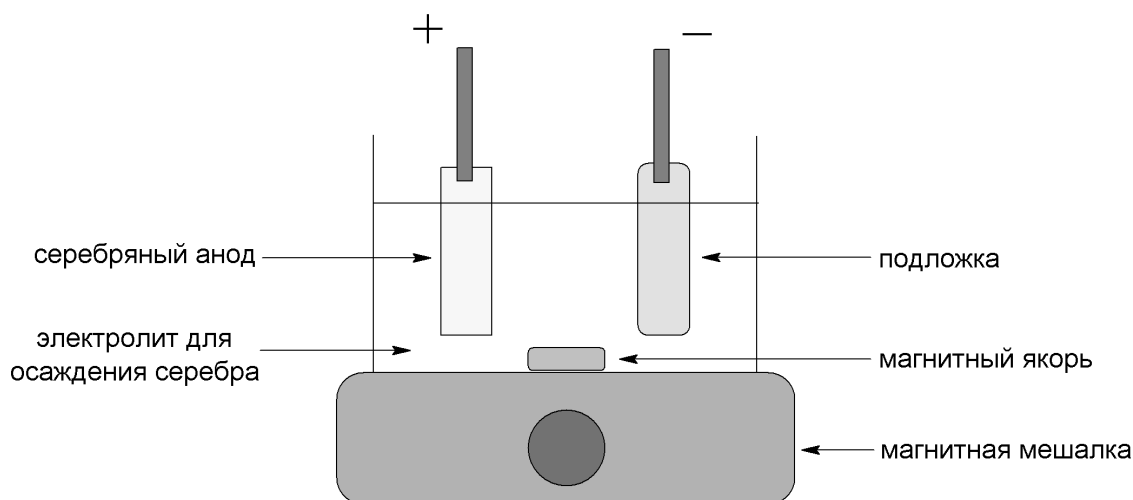


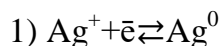
Рис. 16. Схема установки для осаждения серебра.

Осаждение серебра из раствора производили при постоянном и при импульсном токе. Использовался стационарный режим 2 В ( $\tau = 1$  мин). При импульсном токе производилось 800 циклов, состоящих из следующей последовательности импульсов:

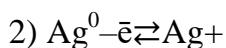
Е, В	-1	0.3	2	0
$\tau$ , мс	5	3	10	65

При синтезе происходят следующие реакции:

на катоде:



на аноде:



После подложку с покрытием промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе.

### 2.1.3. Методика электрохимического темплатного синтеза гидроксиапатита на композитном покрытии TiO<sub>2</sub>/Ag

Покрyтия гидроксиапатита получали методом электрохимического темплатного синтеза с применением в качестве темплата композитной пленки TiO<sub>2</sub>/Ag на приборе потенциостат-гальваностат Ellins P-45X с использованием угольного анода. Для синтеза был приготовлен раствор состава: 1.18 г нитрата кальция Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и 0.345 г дигидроортофосфата аммония NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> на 100 мл воды из расчета соотношения гидроксиапатита Ca/P = 1.67. Кроме того был использован раствор с калиевой солью, которая была применена в работах [77, 78, 79], следующего состава: 1.18 г нитрата кальция Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и 0.411 г дигидроортофосфата калия KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> на 100 мл воды. Синтез проводился при перемешивании электролита магнитной мешалкой (рис. 17).

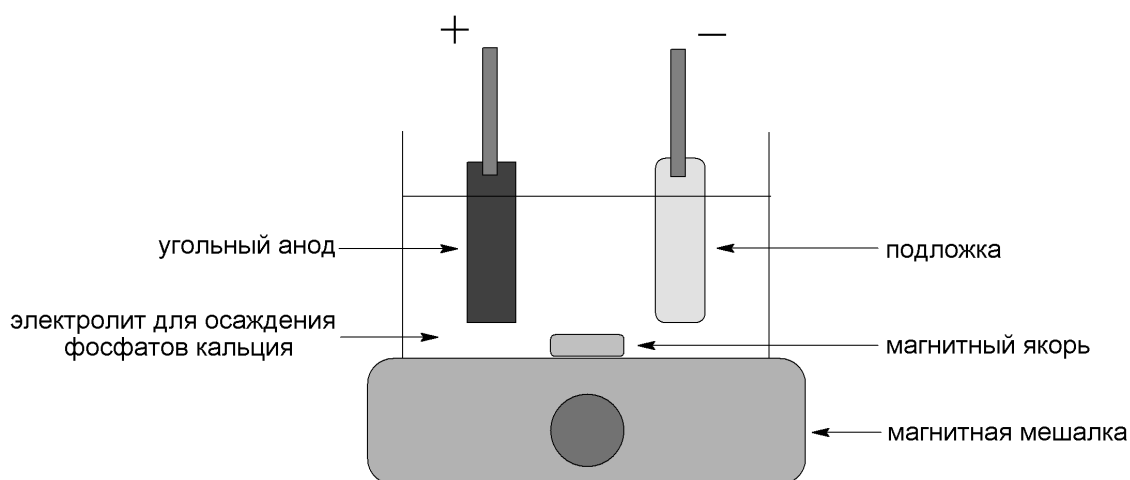


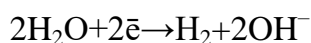
Рис. 17. Схема установки для осаждения фосфатов кальция

Осаждение гидроксиапатита производили как при постоянном, так и при импульсном токе.

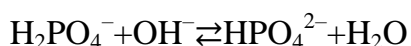
При синтезе происходят следующие реакции:

на катоде:

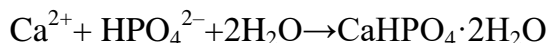
- 1) электрохимическое разложение воды на газообразный водород и гидроксид-ионы



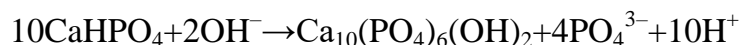
2) гидроксид-ионы реагируют с дигидроортофосфат-ионами



3) ионы  $\text{Ca}^{2+}$  реагируют с ионами  $\text{HPO}_4^{2-}$ , в результате чего на поверхности электрода осаждается  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

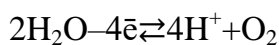


4) под действием гидроксид-ионов происходит следующая реакция



на аноде:

5) электрохимическое разложение воды на газообразный кислород и протоны



После подложку с покрытием промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе.

## 2.2. Аналитические методы

### 2.2.1. Рентгенофазовый анализ образцов

С помощью рентгенофазового (качественного и количественного) анализа осуществляется идентификация различных кристаллических фаз и определение их относительных концентраций в смеси на основе изучения дифракционной картины исследуемого образца. Помимо этого метод позволяет с высокой точностью определять параметры элементарной ячейки известного вещества для обнаружения изоморфных примесей и параметры возможной пространственной группы для новых соединений, выявлять кристаллическую структуру образца (координаты, заселенность позиций атомов), устанавливать размеры частиц и микронапряжения, текстуру вещества и т.д.

Качественный рентгенофазовый анализ заключается в сравнении значений межплоскостных расстояний  $d_{(hkl)}$  кристаллических фаз и соответствующих относительных интенсивностей линий  $I_{(hkl)}$  рентгеновского спектра с эталонными рентгенограммами ( $(hkl)$  – семейство плоскостей). На основе этого возможно разделение и идентификация отдельных фаз гетерогенной системы.



Второй этап исследования – количественный анализ – проводится, когда уже известен качественный фазовый состав. В его основе лежит зависимость интенсивности дифракционных отражений от содержания  $c_i$  соответствующей фазы в исследуемом поликристаллическом образце. Возможно определение количества тех или иных фаз в смеси, средних размеров кристаллов, зерен в исследуемом образце и функции распределения их по размерам. Также количественным анализом изучают внутренние напряжения в образце и текстуру, т.е. характер преобладающей ориентации кристаллитов. Существует несколько методов количественного фазового анализа: метод подмешивания, основанный на сравнении интенсивностей линий на дифрактограмме определяемой фазы с интенсивностями линий эталонного вещества, содержание которого задается заранее; метод независимого эталона, т.е. последовательная съемка образца и эталона; метод гомологических пар, прибегая к которому получают серии рентгенограмм смесей и производят поиск линий фаз одинаковой интенсивности; метод наложения, заключающийся в сравнении рентгенограмм исследуемого образца и рентгенограмм отдельных его составляющих в чистом виде; метод съемки без эталона, основанный на пропорциональности интенсивности линий фаз на рентгенограммах и объемного содержания фазы, т.е. измеряя абсолютную интенсивность линий или отношение интенсивностей линий различных фаз, можно установить концентрацию каждой фазы.

В основе РФА лежит явление дифракции, т.е. сильное рассеяние волн на периодической решётке рассеивателя при определенных углах падения и длинах волн. При рентгенофазовом анализе наблюдается рассеяние рентгеновского излучения, а в качестве дифракционной решетки выступает кристаллическая решетка фазы, т.к. межплоскостные расстояния в кристалле сравнимы с длиной волны рентгеновского излучения. В основе же обработки рентгенограмм лежит уравнение Вульфа-Брэгга (рис. 18):  $2d_{(hkl)} \cdot \sin 2\theta = n\lambda$ , где  $d_{(hkl)}$  – расстояние между соседними кристаллографическими плоскостями (hkl),  $\theta$  – угол, под которым наблюдается дифракция (угол скольжения),  $n$  – порядок дифракции,  $\lambda$  – длина волны монохроматических рентгеновских лучей [80].

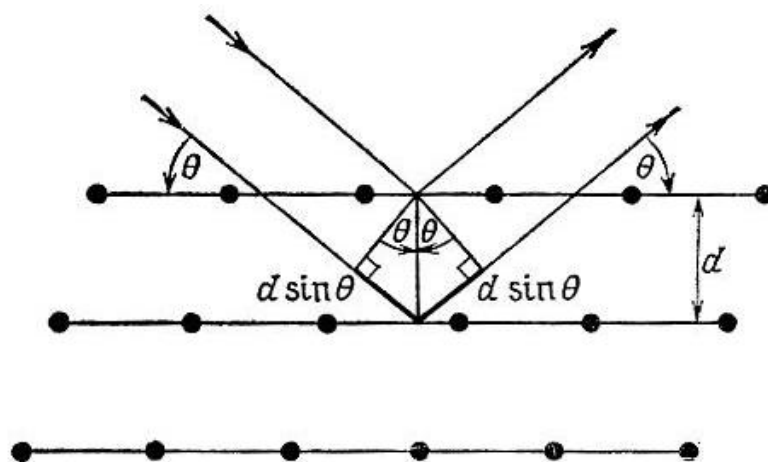


Рис. 18. Условие Вульфа-Брэгга [81].

Современный рентгеновский дифрактометр состоит из нескольких основных компонентов, представленных на рисунке 19. Источник излучения – рентгеновская трубка/синхротрон/вращающийся анод с электронной пушкой (источник пучка электронов). Пучок электронов взаимодействует с металлом (если, например, используется медный вращающийся анод), и происходит испускание электромагнитных квантов. Рентгеновский монохроматор – графитовые пластинки, которые используются для фокусировки и монохроматизации пучка. На исследуемый образец, помещенный в гониометр (прибор, управляемый с помощью компьютера и позволяющий вращать образец), попадает монохроматический рентгеновский луч. Детектор – счётчики квантов (сцинтилляционные, пропорциональные, полупроводниковые счётчики и др.), сигнал с которых считывается компьютером (система для управления и обработки сигналов). В результате формируется дифракционная картина, которую получают последовательно: счётчик перемещается в процессе измерения и регистрирует попавшую в него энергию излучения за определённый интервал времени.

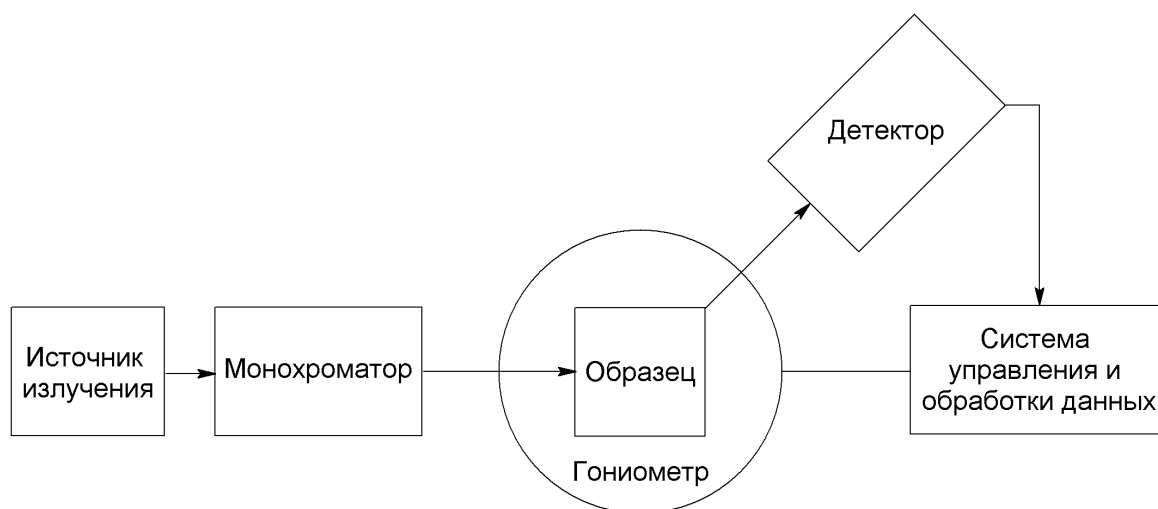


Рис. 19. Блок-схема дифрактометра.

Метод рентгенофазового анализа отличается несложностью пробоподготовки, экспрессностью, исследованием образцов без разрушения, возможностью использования поликристаллического материала, допустимостью массовых измерений, различением полиморфных модификаций, получением из экспериментальной дифрактограммы данных не только о фазовом составе, но и о структурных характеристиках отдельных фаз и их количестве.

Для рентгенофазового анализа в работе использовался дифрактометр Bruker «D2 Phaser». Съемка проводилась на длине волны  $\text{Cu K}\alpha$  с  $\lambda=1.541 \text{ \AA}$ .

### 2.2.2. Исследование образцов методом ИК-спектроскопии

ИК-спектроскопия основана на способности химических веществ поглощать инфракрасное излучение с возбуждением колебаний молекул.

ИК-спектрофотометры различных конструкций имеют общие элементы: источник излучения, оптическую систему, приемник и систему усиления сигнала. Сейчас наиболее распространенными являются источники с широкой областью излучения, работающие при температуре до 1200-1400 К: глобар (карбид кремния), штифт Нернста (оксиды циркония, тория, иттрия), нихромовая спираль, платиновая проволока с керамическим покрытием и др. В дальней ИК-области применяют ртутную лампу низкого давления. Действие тепловых источников описывается законом Планка для излучения абсолютно черного тела. Назначение оптической системы – направление излучения источника по требуемому пути с минимальными

потерями. При использовании отражательных зеркал с наружным покрытием, например, с напыленным алюминием возможно устранение хроматических aberrаций. Отражательная оптика может иметь плоские, сферические, параболические и прочие поверхности. Сейчас разработано большое число различных видов оптических систем для спектрофотометров. Существует два типа ИК-приемников: тепловые (термоэлементы, болометры, пневматические приемники, пироэлектрические приёмники) и фотоэлектронные (фоторезисторы, фотодиоды). Для работы полупроводниковых детекторов в низкочастотной области требуется охлаждение до низких (азотных) температур. Для изготовления окон кювет и светоделителей используются монокристаллы некоторых солей (LiF, BaF<sub>2</sub>, KBr). В спектроскопии внутреннего отражения применяют материалы с высокими показателями преломления.

В основе типичного Фурье-спектрометра лежит схема интерферометра Майкельсона (рис. 20).

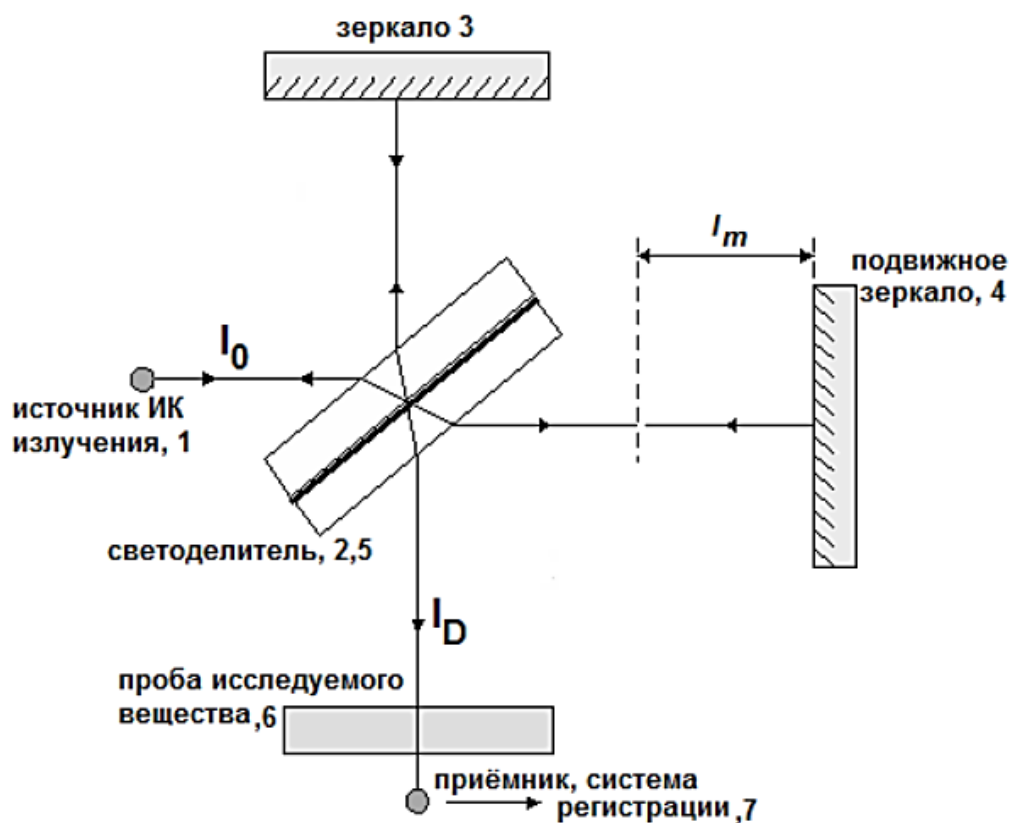


Рис. 20. Принципиальная схема интерферометра Майкельсона [82].

Свет источника излучения (1) разделяется светоделителем (2) на два когерентных пучка (5 – компенсирующая пластинка), один из которых направляется к неподвижному плоскому зеркалу (3) и отражается на светоделитель (2), а другой идет к плоскому подвижному зеркалу (4) и при возвращении соединяется на светоделителе с первым пучком. Эти два когерентных пучка интерферируют между собой: в фокальной плоскости объектива возникают интерференционные полосы, которые можно регистрировать (7). Подвижное зеркало (4) совершает возвратно-поступательное перемещение вдоль луча, причем смещение происходит относительно нулевого положения, в котором оптическая разность хода в плечах интерферометра равна нулю. Детектор (7) регистрирует интерферограмму – зависимость интенсивности выходящего из интерферометра светового потока от оптической разности хода, по которой можно судить о спектральном составе излучения, идущего от источника.

Разрешающая способность является важнейшей характеристикой ИК-спектрофотометров: приемлемым является разрешение  $0.1 \text{ см}^{-1}$ . Также немаловажную роль играет возможность работы в широкой области регистрации спектра. Прибор может испускать одновременно все длины волн инфракрасного излучения: ближнюю ИК-область ( $14\ 000\text{--}4000 \text{ см}^{-1}$ ), среднюю ( $4000\text{--}400 \text{ см}^{-1}$ ) и дальнюю ( $400\text{--}10 \text{ см}^{-1}$ ).

Поглощение излучения веществом количественно описывается законом Бугера-Ламберта-Бера:  $I = I_0 \exp(-k_\lambda l)$ , где  $I_0$  – интенсивность пучка света, падающего на слой толщины  $l$ , а  $I$  – вышедшего из него,  $k_\lambda$  – коэффициент поглощения, зависящий от длины волны  $\lambda$ . Другими словами количественный анализ базируется на зависимости интенсивности полос поглощения от концентрации вещества в пробе, а спектр получается при построении зависимости испускания или оптической плотности от длины волны, частоты или волнового числа [83].

Достоинствами метода ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье являются возможность анализа объектов различных агрегатных состояний, высокая разрешающая способность, высокая точность определения частот, широкая область регистрации спектра, малое время анализа, возможность регистрации слабых сигналов и т.д. [84] Задачи, решаемые с помощью ИК-спектроскопии: качественный анализ (определение функциональных групп), количественный анализ смесей,

изучение межмолекулярных взаимодействий, исследование кинетики реакций, характеристика интермедиатов.

Анализ проводили с помощью ИК-Фурье спектрометра Shimadzu IRPrestige-21 в диапазоне волновых чисел 4000-400 см<sup>-1</sup>.

### **2.2.3. Исследование образцов методом оптической микроскопии**

Оптическая или световая микроскопия использует видимую область света и систему линз для получения увеличенного в 2000-3000 раз изображения. Ее возможности ограничены волновой природой света: цвет – длина волны, яркость изображения – амплитуда волны, и другие свойства волны, как фаза, плотность и направление ее распространения зависят от свойств объекта [85].

Основные характеристики светового микроскопа – это разрешающая способность (минимальное расстояние между двумя объектами, при котором они различимы на изображении), увеличение (отношение расстояния между изображениями двух точек объекта на изображении к расстоянию между этими точками на объекте) и контраст (различие яркостей изображения и фона).

Современный световой микроскоп включает в себя следующие составляющие (рис. 21): 1 – камера для осуществления микросъемки, 2 – окулярная линза, 3 – объективная башня, 4 – объективные линзы, 5 – предметный столик, 6 и 7 – ручки фокусировки изображения для грубой и точной регулировки соответственно, 8 – диафрагма и конденсор, 9 – источник света.



Рис. 21. Основные компоненты современного светового микроскопа [86].

Окуляр или окулярная линза – обращённая к глазу оператора часть микроскопа, описываемая такими параметрами, как вынос зрачка (расстояние от окуляра до глаза порядка 5-20 мм) и ширина поля зрения (угловой размер изображения). Объектив или объективная линза – обращённая к объекту наблюдения часть, характеризующаяся номинальным увеличением, числовой апертурой (разрешающая способность), способностью исправления хроматических искажений и т.д. Конденсор представляет собой систему линз, которая собирает и направляет лучи света на исследуемый объект для повышения его освещённости.

В зависимости от структуры образца, а также цели и условий исследования можно прибегать к различным методам микроскопии: метод светлого поля, поляризационная микроскопия, метод темного поля, люминесцентная микроскопия, метод фазового контраста, интерференционная микроскопия и т.д. [85]

В работе применяли оптический микроскоп ЛОМО Микмед-6. Для измерения объектов и получения микрофотографий была использована камера TOP CAM 5, откалиброванная по штатному объектмикроскопу.

#### 2.2.4. Исследование поверхности образцов методом сканирующей электронной микроскопии

Сканирующая электронная микроскопия – это разновидность электронной микроскопии, в которой применяется сканирование поверхности исследуемого объекта сфокусированным пучком электронов и регистрация детектором сигнала, возникающего в результате взаимодействия электронов с веществом, для визуализации топографии поверхности (при регистрации вторичных электронов) и карты элементного состава поверхности (при регистрации обратно рассеянных электронов, оже-электронов и рентгеновского излучения) [87].

На рисунке 22 представлена принципиальная схема сканирующего электронного микроскопа. Она включает в себя источник электронов (катод), оптическую систему для фокусировки электронов и сканирования (электронную колонну), камеру с образцом, детекторы для регистрации сигнала, систему обработки данных, а также систему откачки для создания и поддержания вакуума в микроскопе.



Рис. 22. Схема сканирующего электронного микроскопа [88].



Катод испускает электроны, которые проходят через систему электронной оптики, фокусируются и ускоряются в направлении образца. Сфокусированный пучок сканирует поверхность образца, и происходит эмиссия вторичных электронов, которые регистрируются детектором. Так на систему сбора данных поступает информация о координатах пучка на образце и величине сигнала с детектора. При построении изображения каждой точке образца присваивается значение яркости пропорциональное величине сигнала, измеренного в момент взаимодействия пучка с этой точкой.

Работа катода базируется на явлении эмиссии электронов металлами при определенном воздействии. Современные термополевые катоды, работающие под действием электрического поля и высокой температуры, чаще всего оснащены дополнительными электродами. Из такой системы, называемой электронной пушкой, электроны вылетают, с помощью электрического поля ускоряются и через оптическую систему устремляются к образцу. В колонну электронной оптики обычно входят конденсорная линза, диафрагма, отклоняющая система и объективная линза. В настоящее время широкое применение находит система из нескольких конденсорных линз и отклоняющих систем, кроме того часто устанавливается устройство для компенсации астигматизма. В системе электронной оптики под действием электрического или магнитного поля изменяются траектории выпущенных электронов.

Направленные ускоренные электроны взаимодействуют с веществом, что приводит к выходу из анализируемого образца электронов или квантов электромагнитного излучения. Основные сигналы, регистрирующиеся в сканирующем электронном микроскопе – это вторичные электроны, отраженные электроны и рентгеновское излучение, но кроме того детекторы регистрируют оже-электроны, катодоллюминесценцию и т.д. Электронный пучок проникает в толщу образца и рассеивается. Обратное рассеянные электроны (BSE - backscattered electrons) – электроны, вылетевшие в результате рассеяния; вторичные электроны (SE - secondary electrons) – электроны, выбитые ускоренными первичными электронами; тормозное и характеристическое рентгеновское излучение – рентгеновское излучение, которое возникает из-за торможения ускоренных электронов в веществе и

из-за возбуждения ими атомов вещества соответственно. Количество вторичных электронов зависит от морфологии поверхности образца, а количество обратно рассеянных – не только от морфологии, но и от атомного номера и плотности материала. Рентгеновское излучение позволяет проводить качественный и количественный элементный анализ образца, который основывается на измерении отношения интенсивностей характеристической линии в анализе к интенсивности этой же линии в эталоне. Регистрация рентгеновского излучения дает возможность локального анализа, т.е. позволяет построить элементную карту поверхности – изображение, отражающее элементный состав различных участков образца. Кроме того электронный микроскоп позволяет исследовать распределение донорных или акцепторных центров по величине поглощенного тока, топографию магнитной доменной структуры по вторичным электронам и т.д.

В работе использовался сканирующий электронный микроскоп Zeiss Merlin с детектором вторичных электронов Эверхарта-Торнли (SE2).

### **2.2.5. Исследование образцов методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии**

Рентгенофлуоресцентный анализ (РФЛА) – один из методов рентгеноспектрального анализа (РСА), основанных на взаимодействии рентгеновского излучения с исследуемым веществом. Данный метод базируется на зависимости интенсивности рентгеновской флуоресценции от содержания элемента в пробе. При облучении образца, например, с помощью рентгеновской трубки возникает характеристическое вторичное флуоресцентное излучение атомов, которое пропорционально их концентрации в образце. В различных приборах в качестве источника возбуждения атомов исследуемой пробы могут использоваться не только рентгеновская трубка, но и электроны, и изотопы некоторых элементов (Fe-55, Cd-109 и др.).

Связь энергии и длины волны испускаемого фотона определяется следующей формулой:  $E = E_1 - E_2 = hc/\lambda$ , где  $E_1$  и  $E_2$  – энергии орбиталей атома (K, L, M, и т.д.) между которыми произошел переход электрона,  $h$  – постоянная Планка,  $c$  – скорость света,  $\lambda$  – длина волны испускаемого фотона. Отсюда следует, что длина волны флуоресценции является индивидуальной характеристикой каждого элемента и

называется характеристической флуоресценцией. Вместе с тем, интенсивность, т.е. число фотонов, которые поступают за единицу времени, пропорциональна концентрации или количеству атомов соответствующего элемента. Таким образом, возможно проведение элементного анализа вещества.

На рисунке 23 представлена блок-схема рентгенофлуоресцентного спектрометра, на которой указаны его основные составляющие: источник возбуждения рентгеновского излучения (электронная пушка, протонный генератор, радиоактивный изотоп, рентгеновская трубка и др.), снабженный блоками питания, контроля и управления; кювета с образцом; твердотельный полупроводниковый детектор рентгеновского излучения (например, кремний-литиевый); амплитудный анализатор; система обработки сигналов (персональный компьютер); вспомогательное оборудование (аппаратура для контроля вакуума, система охлаждения, система подачи газа и т.д.).

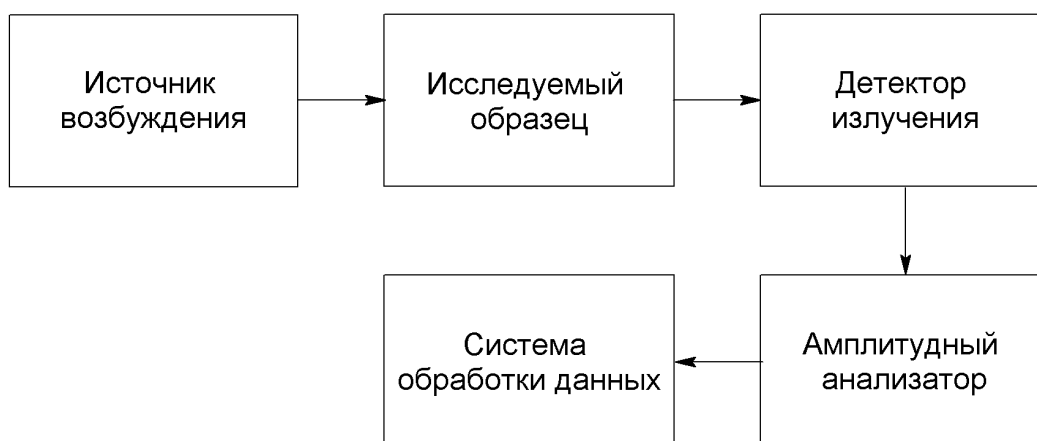


Рис. 23. Блок-схема рентгенофлуоресцентного спектрометра.

Принцип анализа заключается в следующем: атомы исследуемого образца, закрепленного в кюветодержателе, возбуждаются под действием рентгеновской трубки или электронной пушки, вызывая при этом эмиссию характеристического излучения, которое регистрируется твердотельным ионизационным полупроводниковым детектором. Затем спектрометрическое устройство производит усиление и оцифровку сигнала, разделяя рентгеновские фотоны по энергиям. Затем сигнал передается на персональный компьютер, и пользователь получает полный спектр, который позволяет судить об элементном составе образца.

При исследовании образца с помощью сканирующего электронного микроскопа часто используется приставка для энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного микроанализа, что позволяет проводить определение химического состава поверхности образца по всем элементам от углерода до урана. При этом диаметр зоны, на которой производится анализ, может составлять 1 мкм. С помощью такой приставки можно не только проводить анализ в заданной точке или зоне образца, но и получать элементные карты, на которых можно видеть распределение элементов по выбранной области. Кроме того возможно получение изображений «Sameo+», на которых можно видеть совместно химический состав и топографию образцов.

Преимущества метода энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного анализа: несложность расшифровки рентгеновских спектров, отсутствие сложной пробоподготовки, возможность исследования вещества в твердом, жидком и газообразном состоянии, различного размера, вида и формы, одновременное определение содержания нескольких элементов, проведение анализа в широком диапазоне концентраций, меньшая стоимость по сравнению с волнодисперсионными РФ-спектрометрами, возможность изготовления портативных версий прибора, точность и чувствительность при измерении тяжелых элементов, и кроме того анализ является неразрушающим.

В работе применялась приставка рентгеновского микроанализа к сканирующему электронному микроскопу Zeiss Merlin Oxford Instruments INCAx-act, а также энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр Shimadzu EDX-800P.

#### **2.2.6. Цитологическое исследование образцов**

При анализе адгезионных свойств клеток остеобластов MC3T3-E1 образцы были помещены в чашки Петри и простерилизованы путем озонирования поверхности. Нанесение суспензии клеточной линии MC3T3-E1 выполняли в небольшом объеме питательной среды (100 мкл) так, чтобы на поверхности образовалась не стекающая капля. Концентрация клеток при посеве составляла  $1 \cdot 10^5 / \text{см}^2$ . Образцы с нанесенными клетками помещали в условия CO<sub>2</sub>-инкубатора при

температуре 37°C на 3 часа, за которые предположительно должна происходить адгезия клеток на поверхности исследуемых образцов, после чего в чашки Петри добавляли питательную среду. В качестве контроля на поверхность титанового образца наносили суспензии клеток.

После культивирования клеток питательную среду удаляли, трижды промывали раствором фосфатного буфера и фиксировали в 20-кратном объеме раствора глутарового альдегида концентрацией 2.5%. Оценка адгезионных свойств клеток остеобластов MC3T3-E1 и формирования клеточного монослоя на полученных экспериментальных образцах проводилась методом сканирующей электронной микроскопии.

### 3. Результаты работы и их обсуждение

#### 3.1. Исследование перфорированной пленки $\text{TiO}_2$

По методике, представленной в разделе 2.1.1, было получено покрытие ксерогеля  $\text{TiO}_2$  со звездообразными перфорациями.

##### 3.1.1. Определение фазового состава оксидного покрытия методом рентгенофазового анализа

Для определения фазового состава полученной пленки ксерогеля был применен метод рентгенофазового анализа: на дифрактограмме, представленной на рисунке 24, не обнаружены рефлексы анатаза и рутила, однако прокаливание подложки с нанесенным покрытием в течение 60 мин при  $400^\circ\text{C}$  привело к возникновению рефлексов анатаза (рис. 25). Это указывает на рентгеноаморфность осаждаемой пленки диоксида титана.

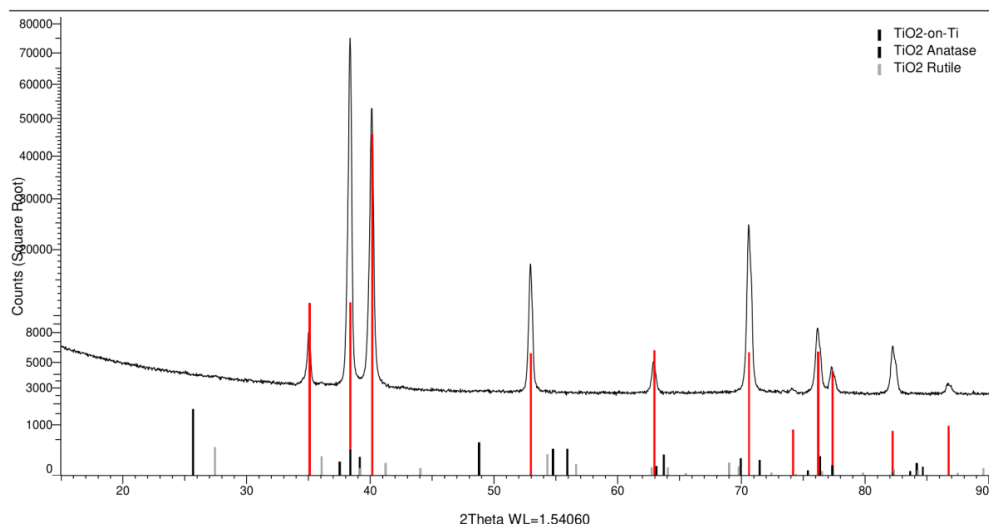


Рис. 24. Дифрактограмма покрытия  $\text{TiO}_2$  до прокаливания.

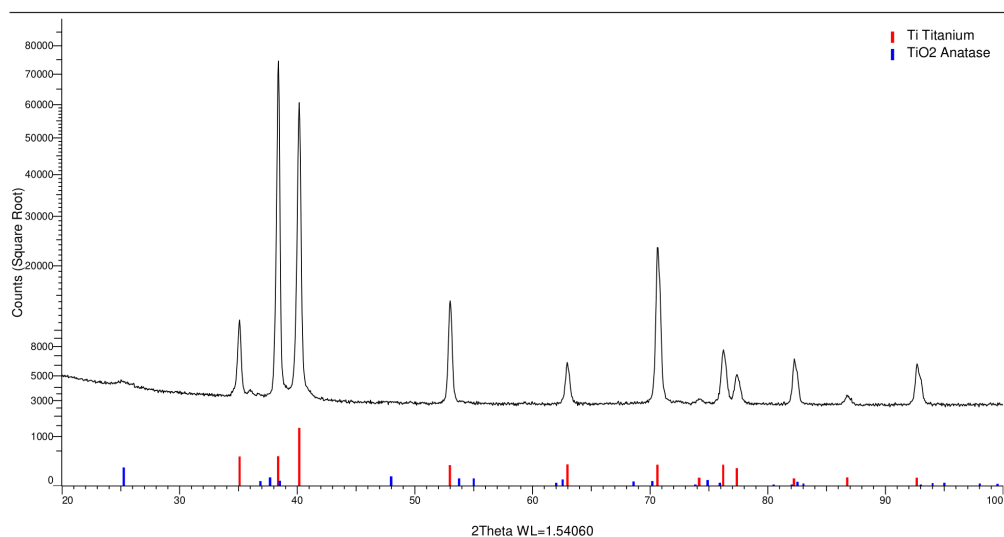


Рис. 25. Дифрактограмма покрытия  $\text{TiO}_2$  после прокаливания.

### 3.1.2. Обнаружение органических примесей в пленках оксида титана методом инфракрасной спектроскопии

В результате работы был исследован состав покрытия подложки, нанесенного методом золь-гель dip-coating. Так при сравнении линий на ИК-спектре (рис. 26) можно видеть, что после экстракции исчезает пик в области 3000-2880  $\text{cm}^{-1}$ , характерный для колебаний C-H. Вследствие этого мы можем говорить о действенности метода удаления органических компонентов экстракцией в кипящей воде.

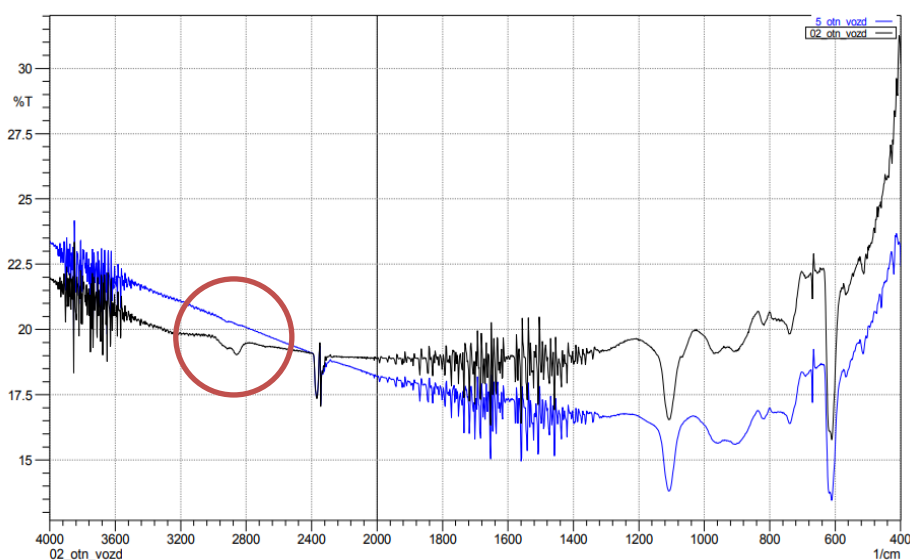


Рис. 26. ИК-спектр покрытий  $\text{TiO}_2$  до (черная линия) и после (синяя линия) экстракции.

### 3.1.3. Исследование зависимости структуры оксидной пленки от температуры синтетического раствора

При разработке синтеза покрытия ксерогеля  $\text{TiO}_2$  температура раствора, из которого подложка вытягивалась с помощью dip-coater'a с постоянной скоростью, варьировалась в пределах от 40°C до 65°C с шагом в 5°C. Результат представлен на рисунке 27 в виде микрофотографий, полученных с помощью оптического микроскопа. Было выявлено, что при 50°C структура пленки наиболее равномерна, а диаметр пор перспективен для повышения биомедицинских свойств в связи с размерами клеток остеобластов.

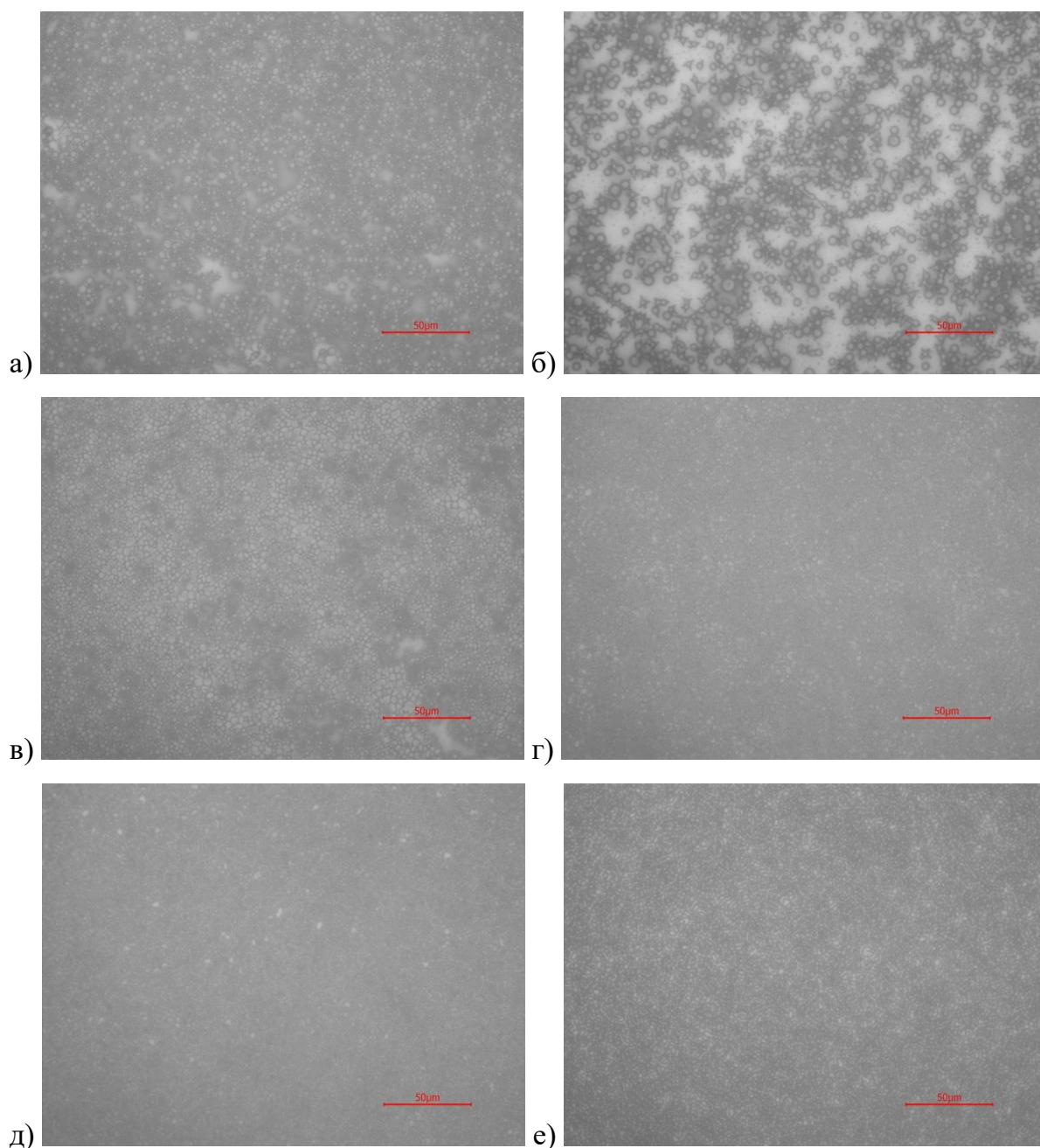


Рис. 27. Микрофотографии пленок ксерогеля  $\text{TiO}_2$ , полученных с использованием синтетических растворов различных температур: а)  $40^\circ\text{C}$ , б)  $45^\circ\text{C}$ , в)  $50^\circ\text{C}$ , г)  $55^\circ\text{C}$ , д)  $60^\circ\text{C}$ , е)  $65^\circ\text{C}$ .

### 3.1.4. Анализ структуры оксидного покрытия методом сканирующей электронной микроскопии

Полиэтиленгликоль, входящий в состав синтетического раствора, повышает его вязкость и структурирует покрытие. При шоковой сушке (hot-plating) происходит снятие напряжения путем растрескивания по дефектам пленки. Впоследствии органические примеси удаляются кипячением в воде в течение 30 минут. На рисунке



28 представлена микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа, показывающая морфологию синтезированного покрытия.

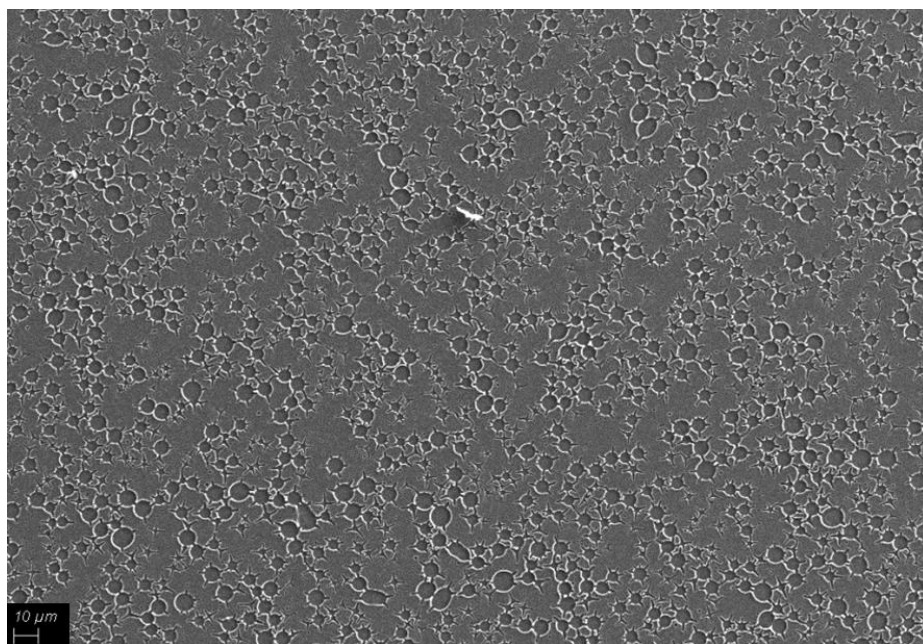


Рис. 28. Микрофотография пленки ксерогеля  $\text{TiO}_2$ .

Микрофотография на рисунке 29 показывает, что синтезируемое покрытие имеет неровности не только на микро-, но и на нано-уровне, что значительно улучшает качество имплантата, повышая его биоактивность.

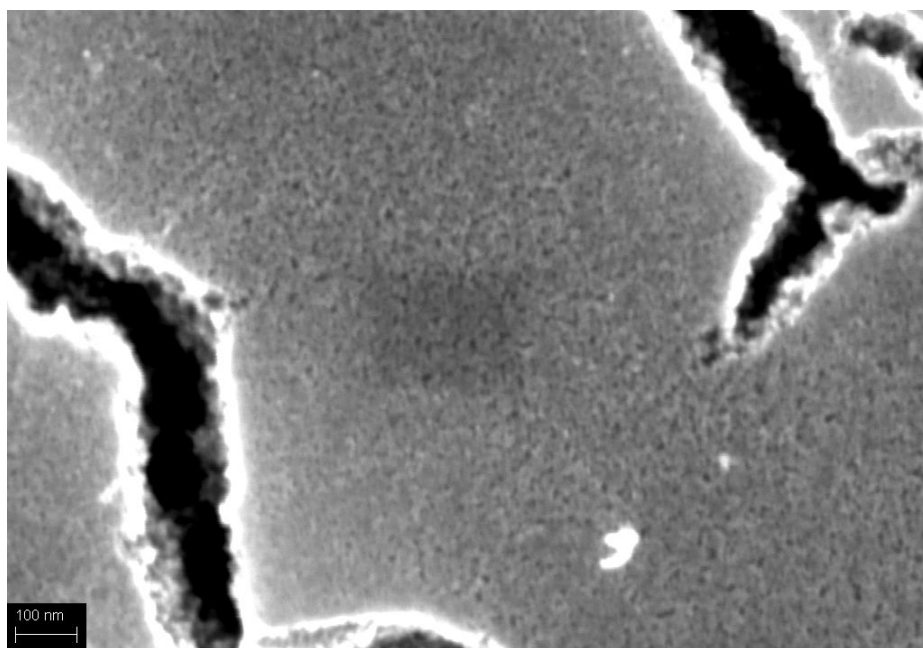


Рис. 29. Микрофотография нанометровой структуры пленки ксерогеля  $\text{TiO}_2$ .

### 3.2. Анализ поверхности композитной пленки $\text{TiO}_2/\text{Ag}$

Методом темплатного электрохимического синтеза, представленным в разделе 2.1.2, был получен композит  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  с применением в качестве темплата пленок  $\text{TiO}_2$  со звездообразными перфорациями.

#### 3.2.1. Исследование структуры покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ методом сканирующей электронной микроскопии

На рисунке 30 можно видеть результат электроосаждения серебра на пленке  $\text{TiO}_2$  при использовании постоянного тока. При помощи СЭМ была выявлена крайне низкая повторяемость электрохимическим депозитом рисунка темплата.

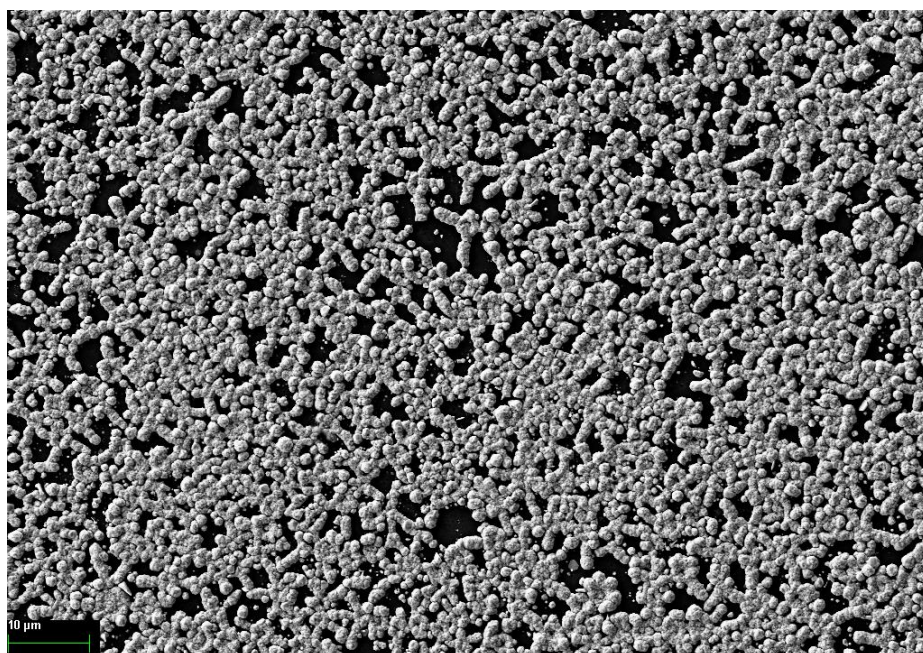


Рис. 30. Микрофотография электрохимически осажденного при постоянном токе серебра на пленке ксерогеля  $\text{TiO}_2$ .

Тогда как при использовании импульсного тока, характеристики которого представлены в разделе 2.1.2, серебро осаждалось на титан, повторяя геометрию перфораций (рис. 31).

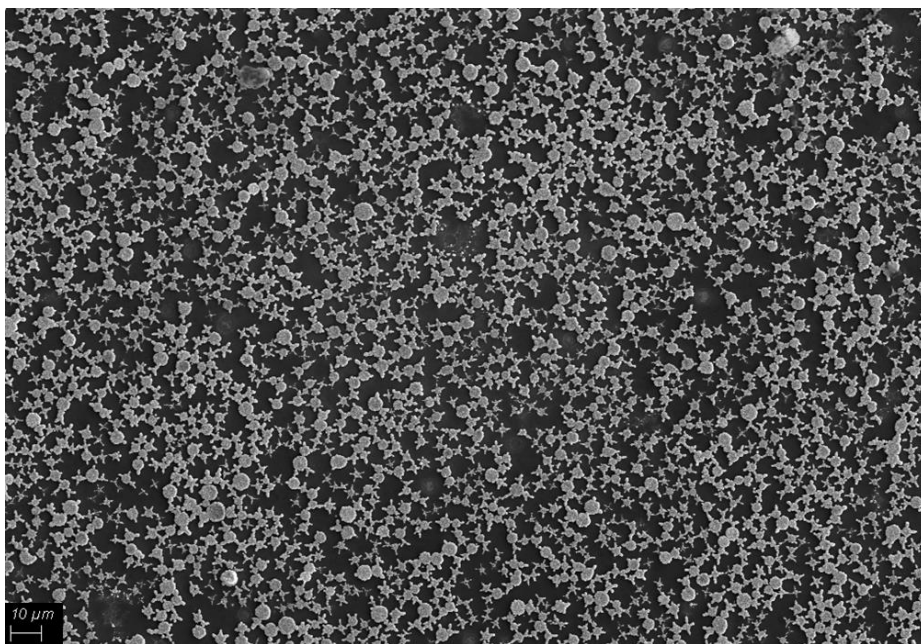


Рис. 31. Микрофотография электрохимически осажденного при импульсном токе серебра на пленке ксерогеля  $\text{TiO}_2$ .

### 3.2.2. Определение элементного состава композиционного покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , полученного темплатным электрохимическим синтезом, методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии

Композит  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  был исследован методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии с помощью приставки рентгеновского микроанализа к сканирующему электронному микроскопу. По элементным картам титана и серебра (рис. 32) видно, что серебро преимущественно осаждается в перфорации диоксидной пленки, повторяя ее структуру, что говорит об успешности проведения темплатного электрохимического синтеза.

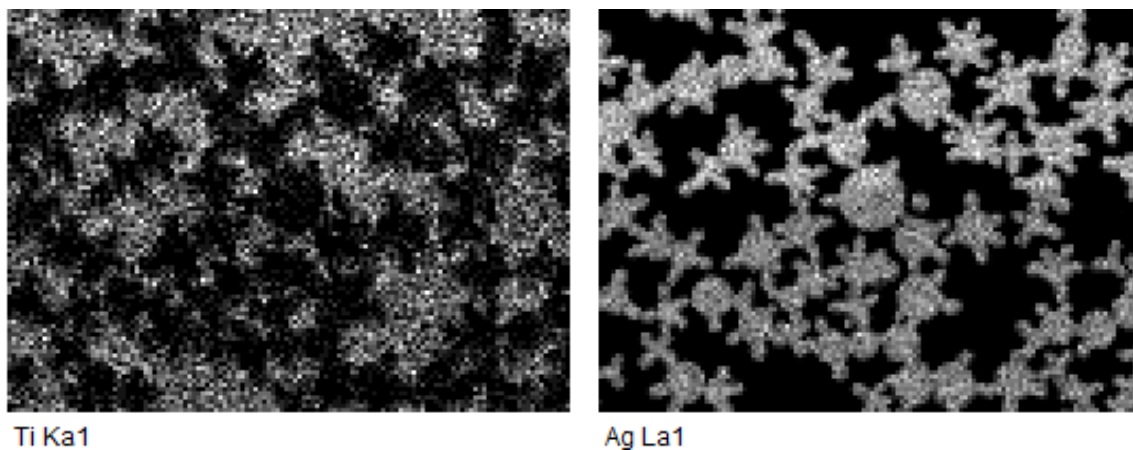


Рис. 32. Элементные карты композита  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$

### 3.3. Исследование композитного покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Методом темплатного электрохимического синтеза, представленным в разделе 2.1.3, был получен композит  $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  с применением в качестве темплата текстурированных пленок  $\text{TiO}_2$ .

#### 3.3.1. Определение фазового состава осаждаемых электрохимически фосфатов кальция методом рентгенофазового анализа

Была получена корреляция фазового состава от условий электрохимического осаждения. На рисунке 33 представлена дифрактограмма фазового состава при различных потенциалах.

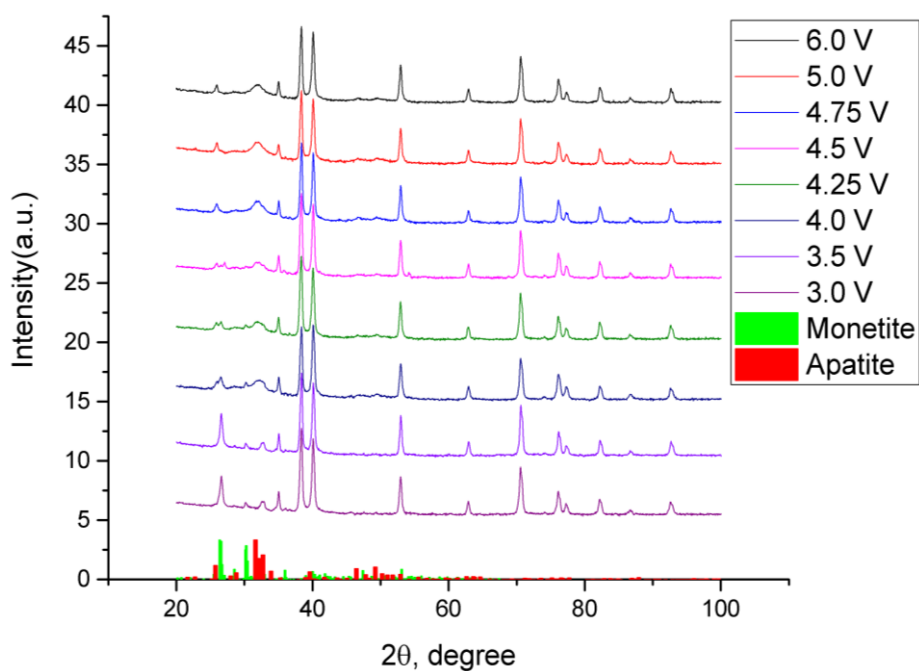


Рис. 33. Дифрактограмма распределения фаз фосфата кальция.

Были проинтегрированы характеристические пики дифрактограммы (рис. 34), в результате чего в первом приближении мы можем судить о зависимости фазового состава от потенциала. Так, по выраженным пикам в области значений  $2\theta$  24-28 при потенциалах 3.0, 3.5 В мы можем наблюдать преимущественно фазу монетита, при потенциале 4.0, 4.25, 4.5 В наблюдаются конкурирующие реакции образования обеих фаз, при потенциалах 4.75, 5.0, 6.0 В проявляется предпочтительно фаза гидроксиапатита.

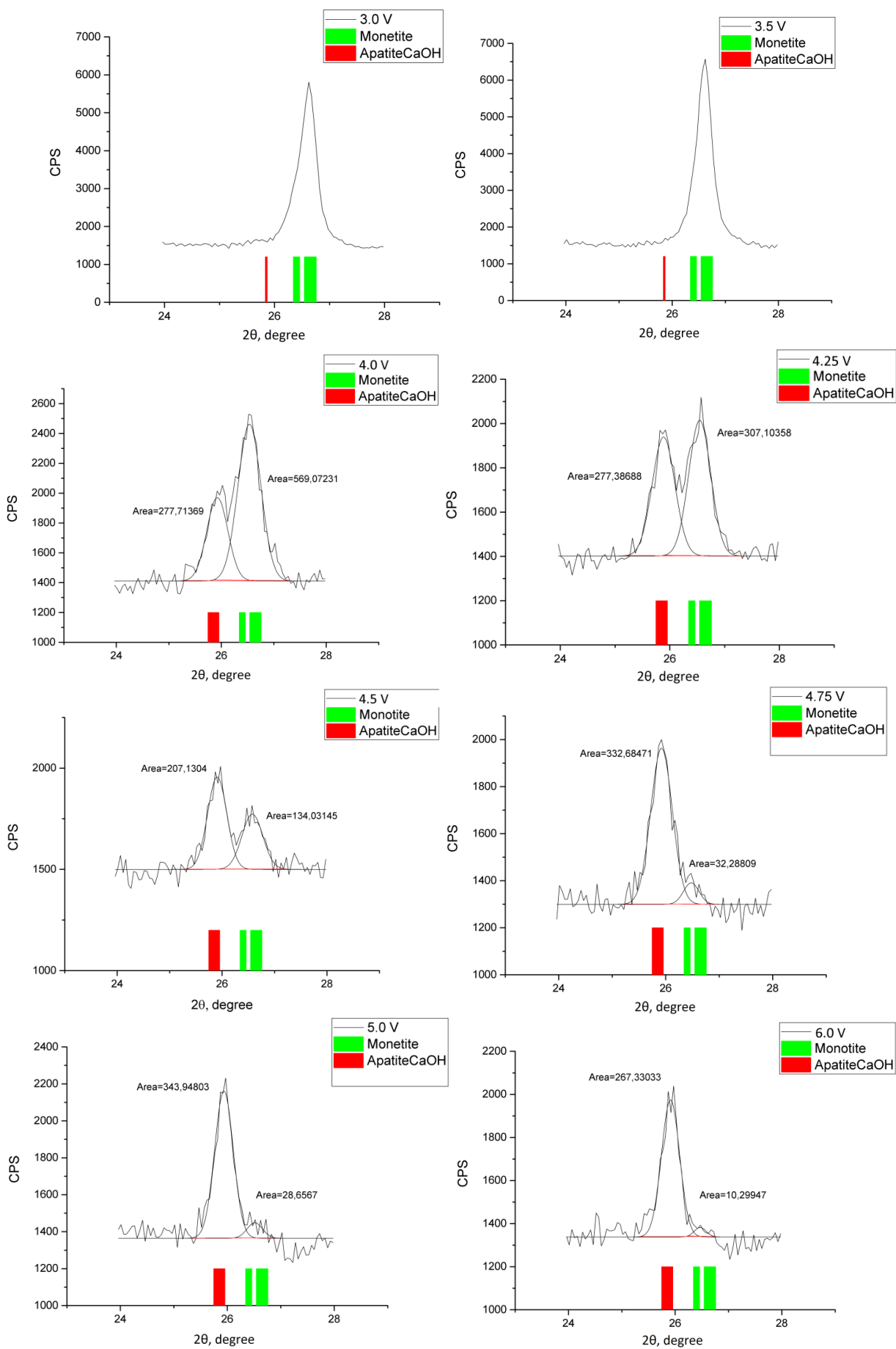


Рис. 34. Соотношение площадей пиков фаз монетита и гидроксиапатита.

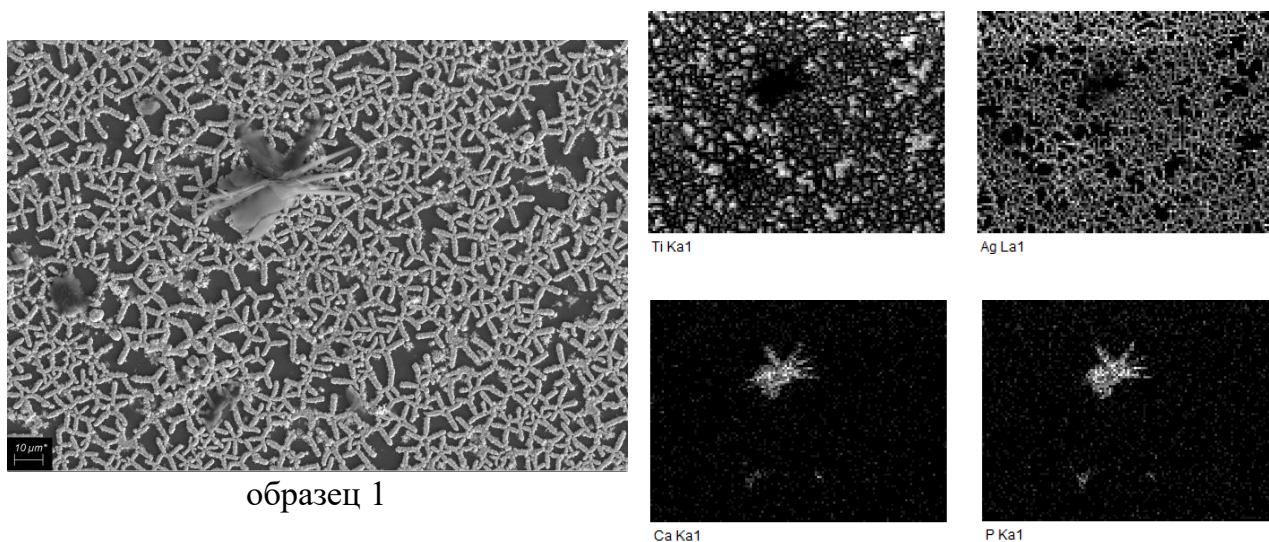
### 3.3.2. Исследование структуры и элементного состава композиционного покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ методом сканирующей электронной микроскопии и методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии

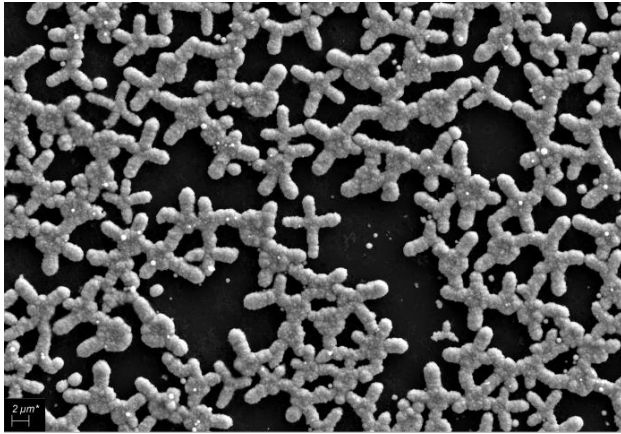
Была проведена серия экспериментов синтеза гидроксиапатита методом электрохимического осаждения при различных условиях (табл. 2).

Табл. 2. Условия синтеза гидроксиапатита.

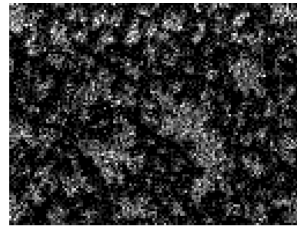
№ образца	Состав электролита	Режим осаждения			
		12 В	-2 В	0 В	
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{KH}_2\text{PO}_4$	6 В ( $\tau = 2$ мин)			
2	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	6 В ( $\tau = 2$ мин)			
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	6 В ( $\tau = 15$ мин)			
4	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	12 В ( $\tau = 1$ мин)			
5	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{KH}_2\text{PO}_4$	1200 циклов	12 В	-2 В	0 В
			$\tau = 3$ мс	$\tau = 2$ мс	$\tau = 85$ мс
6	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{KH}_2\text{PO}_4$	3600 циклов	12 В	-2 В	0 В
			$\tau = 3$ мс	$\tau = 2$ мс	$\tau = 85$ мс

С помощью сканирующего электронного микроскопа были получены микрофотографии образцов, а также составлены их элементные карты (рис. 35) методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии с помощью приставки рентгеновского микроанализа к сканирующему электронному микроскопу.

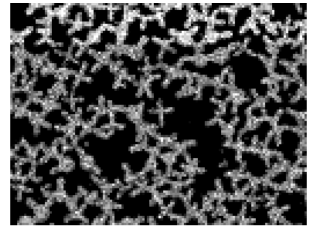




образец 2



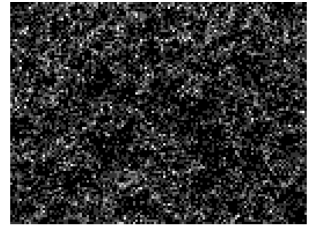
Ti Ka1



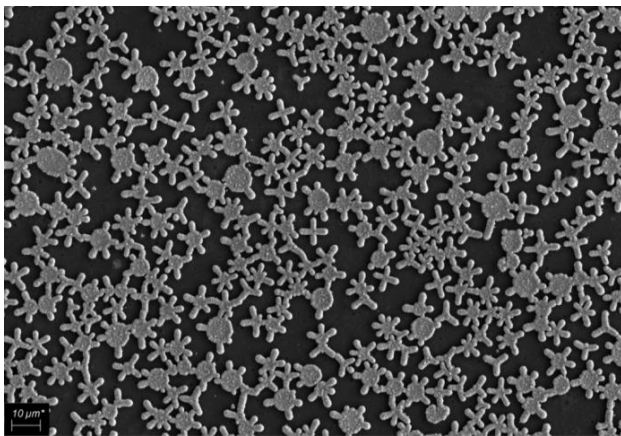
Ag La1



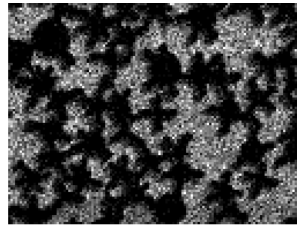
Ca Ka1



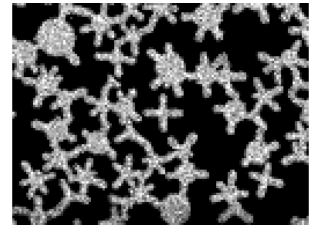
P Ka1



образец 3



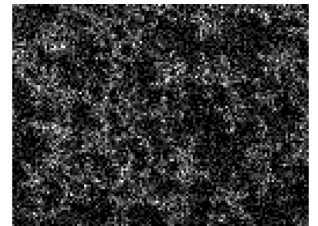
Ti Ka1



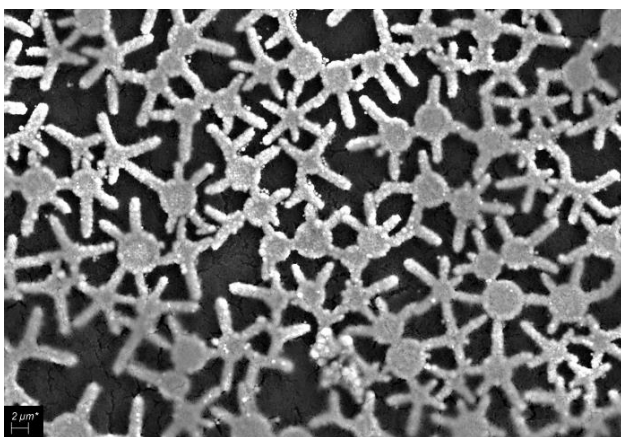
Ag La1



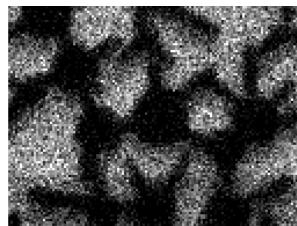
Ca Ka1



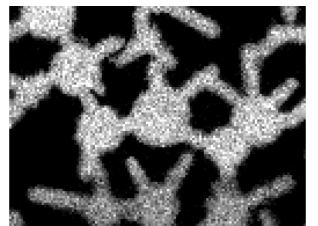
P Ka1



образец 4



Ti Ka1



Ag La1



Ca Ka1



P Ka1

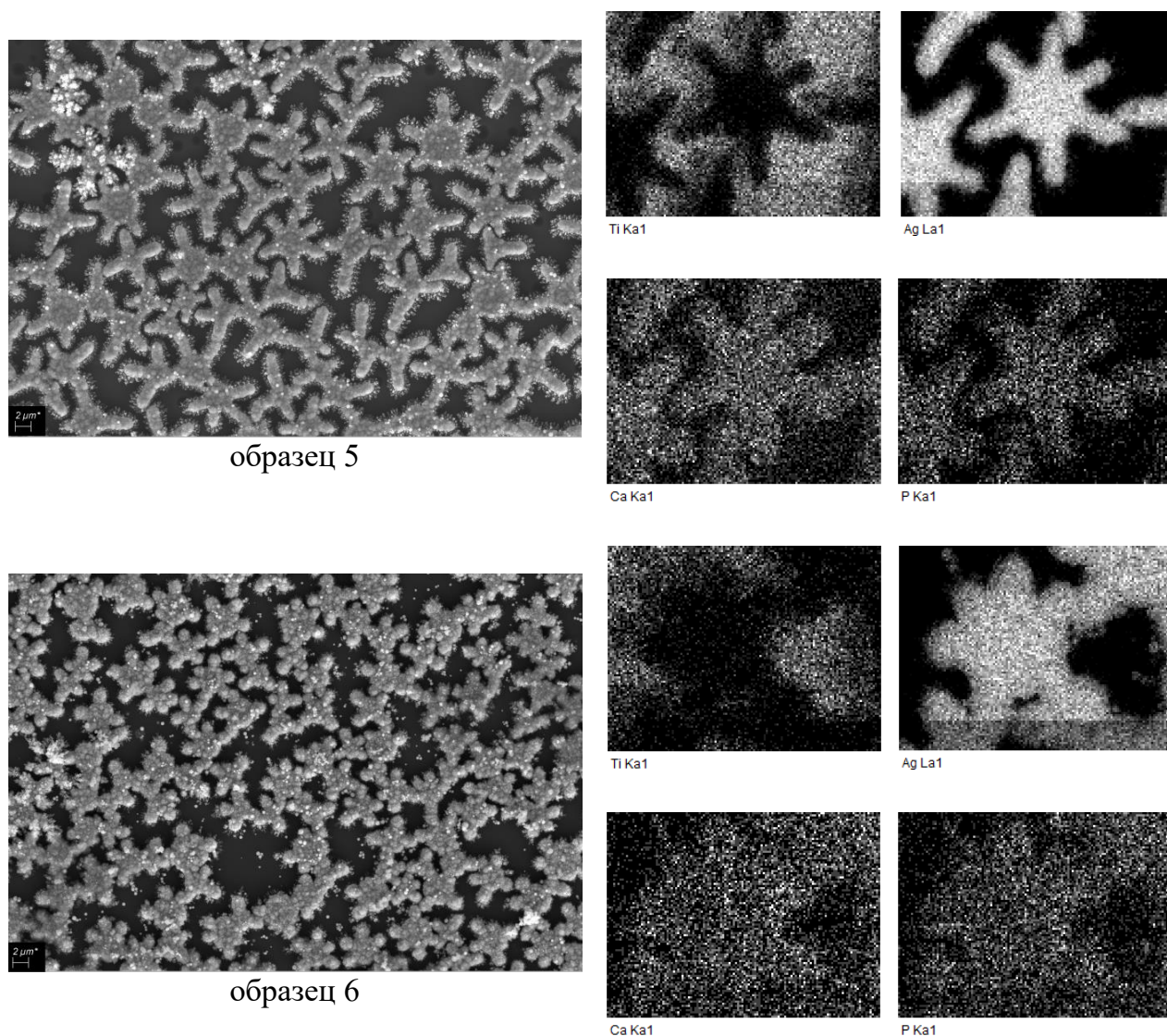


Рис. 35. Микрофотографии и элементные карты композита  $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , электрохимически осажденного при различных условиях синтеза.

На микрофотографии образца 1 наблюдается образование кристаллита гидроксиапатита, что подтверждается элементными картами кальция и фосфора. Для образца 2 использовали тот же режим, однако вместо калиевой соли в качестве источника дигидрофосфат-ионов вводили аммониевую, что повысило повторяемость структуры. Затем было увеличено время осаждения с 2 до 15 мин, что в некоторой степени улучшило повторяемость осажденной фазой рисунка темплата (образец 3). При осаждении образца 4 напряжение повысили до 12 В, а время сократили до 1 мин: как видно по микрофотографии и элементным картам увеличение напряжения не способствует темплатному осаждению.



По аналогии с электрохимическим осаждением серебра было выдвинуто предположение, что циклический режим улучшит качество покрытия. Так, вновь был использован электролит с дигидроортофосфатом калия, синтез проводился в импульсном режиме. Максимальная локализация кальция и фосфора достигнута на образце 5, что указывает на наиболее эффективные параметры темплатного электрохимического синтеза гидроксиапатита. Однако при этом выявлено, что увеличение количества циклов не способствует повторению темплатного рисунка (образец 6).

Хотя осажденный гидроксиапатит повторяет геометрию темплата, по элементным картам кальция и фосфора видно, что гидроксиапатит все еще сильно распространен по поверхности покрытия за пределами областей, покрытых серебром. Поэтому для завершения подбора оптимального режима электрохимического осаждения гидроксиапатита планируется в будущем совмещение условий синтеза образцов 3 и 5: при использовании аммониевой соли в стационарном режиме по микрофотографиям наблюдается воспроизведение морфологии темплата, в то время как применение калиевой соли при постоянном токе сопровождается образованием кристаллитов, а переход на циклический режим способствует осаждению гидроксиапатита четко на серебряные структуры без рассеивания фосфата по поверхности. Кроме того дальнейшее направление работы предполагает цитологическое исследование синтезируемых композитных покрытий.

Такие покрытия перспективны для имплантологии, поскольку характеризуются следующими особенностями: наличие двухуровневой упорядоченности рельефа, состоящей из микро- и нано-неровностей, повышает биоактивность имплантата, т.к. ускоряет адгезию и способствует началу процесса дифференцировки остеобластов; слой антибактериального агента серебра препятствует развитию инфекции, воспалению и как следствие отторжению имплантата; наличие кристаллохимического аналога минеральной части костной ткани гидроксиапатита способствует улучшенной фиксации имплантата в кости и сокращению периода приживления.

### 3.3.3. Цитологическое исследование клеточной линии остеобластов МС3Т3-Е1 на поверхности композитного покрытия $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Для первичной оценки биоактивности синтезируемых покрытий был проведен анализ адгезии остеобластов на поверхности образцов с использованием клеточной линии остеобластов МС3Т3-Е1. Оценку адгезионных свойств проводили путем сравнения микрофотографий двух образцов, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 36): а) – полированный титан, б) – образец с композитным покрытием  $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

По микрофотографиям на рисунке 36 (б) видно, что образец с нанесенным композитом характеризуется не только высокими адгезионными свойствами, но и способностью к развитию сплошного клеточного слоя, что указывает на возможность ускоренного остеосинтеза на подобной поверхности. Это объясняется наличием слоя гидроксиапатита и двухуровневой иерархии структуры. Кроме того по микрофотографиям можно сделать вывод об отсутствии цитотоксичности у полученного композитного покрытия.

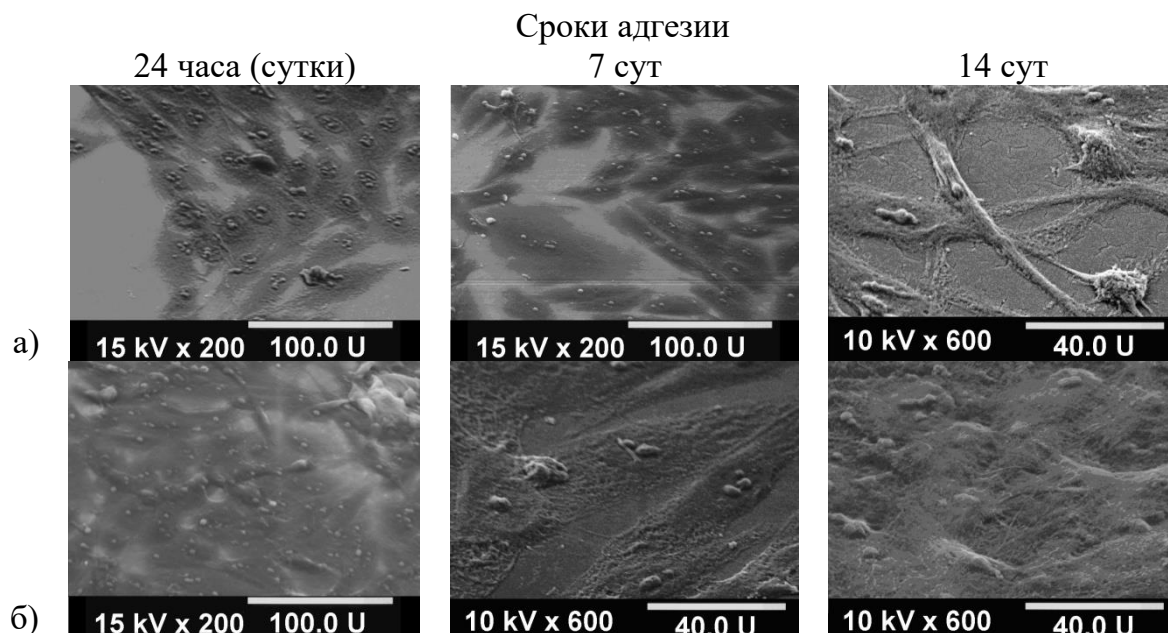


Рис. 36. Микрофотографии подложек после адгезии и распространения клеточной линии МС3Т3-Е1: а) на полированном титане; б) на образце с композитным покрытием  $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

## Заключение

В результате выполнения данной работы был разработан метод электрохимического темплатного синтеза гидроксиапатита на композите  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$ , полученного последовательным применением метода dip-coating и электрохимического осаждения. В связи с наличием двухуровневой упорядоченности рельефа, состоящей из микро- и нано-шероховатостей, а также химическим составом полученный композит перспективен для костной имплантации.

Результаты научной работы были опубликованы в статье и представлены на научных конференциях:

1. A.Yu. Arbenin, E.G. Zemtsova, S.S. Ermakov, A.M. Gaskov, P.I. Baburova, D.N. Sokolova, S.V. Yaroshenko and V.M. Smirnov. Three-component working electrode micron-sized Ag particles/ $\text{TiO}_2$  layer/Ti: template electrochemical synthesis and potential use as electrochemical sensor for glutathione detection //Materials Research Express, 2020, **7**, 035401.
2. Smirnov V.M., Arbenin A.U., Sokolova D.N. Research of the phase composition of calcium phosphate, obtained by electrochemical method, depending on the conditions of deposition //XI International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2019», p. 132.
3. Смирнов В.М., Арбенин А.Ю., Земцова Е.Г., Соколова Д.Н. Исследование структуры и фазового состава покрытий на основе оксида титана и фосфатов кальция, перспективных для костной имплантации // XXVI Всероссийская Конференция Молодых Учёных с Международным Участием «Актуальные Проблемы Биомедицины - 2020», p. 476-477.

## Выводы

1. Методом dip-coating с применением золь-гель технологии были получены образцы с покрытием  $\text{TiO}_2$  с различными температурами синтетического раствора (40-60°C). Выявлено оптимальное значение 50°C, при котором структура пленки наиболее равномерна, а диаметр пор перспективен для повышения биомедицинских свойств в связи с размерами клеток остеобластов.
2. Выявлена зависимость фазового состава фосфатов кальция от условий электрохимического осаждения. Показано, что при потенциале свыше 4.5 В преимущественно осаждается фаза гидроксиапатита, имитирующего минеральную составляющую костной ткани.
3. Разработана методика темплатного электрохимического синтеза композитного покрытия  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  с матрицей  $\text{TiO}_2$ . Показано, что применение импульсного режима осаждения серебра позволяет реализовать темплатный синтез.
4. Разработана методика темплатного электрохимического синтеза композитного покрытия  $\text{TiO}_2/\text{Ag}/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Установлено, что повторение шаблона реализуется при импульсном осаждении гидроксиапатита.
5. Проведена сравнительная оценка адгезионных свойств чистого полированного титана и синтезируемого композитного покрытия. Показано, что на образце с композитным покрытием сформировался выраженный клеточный монослой с высокими адгезионными свойствами к поверхности для клеточной линии остеобластов MC3T3-E1.

## **Благодарности**

Выражается благодарность научному руководителю профессору, д.х.н. Смирнову В.М., старшему научному сотруднику, к.х.н. Арбенину А.Ю., доценту, к.х.н. Земцовой Е.Г., аспиранту Орехову Е.В. за руководство и помощь при выполнении данной работы, а также МРЦ по направлению «Нанотехнологии», РЦ «Рентгенодифракционные методы исследования», РЦ «Инновационные технологии композитных материалов», РЦ «Оптические и лазерные методы исследования вещества» за предоставленное оборудование.

## Список используемой литературы

---

1. Awad N.K., Edwards S.L., Morsi Y.S. A review of TiO<sub>2</sub> NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – V. 76. – P. 1401-1412.
2. Oh S., Daraio C., Chen L.H. [et al.]. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes // *Journal of Biomedical Materials Research: A*. – 2006. – V. 78 (A). – P. 97-103.
3. Han C.-M., Kim H.-E., Koh Y.-H. Creation of hierarchical micro/nano-porous TiO<sub>2</sub> surface layer onto Ti implants for improved biocompatibility // *Surface and Coatings Technology*. – 2014. – V. 251. – P. 226-231.
4. Yadav H.M., Kim J.S., Pawar S.H. Developments in photocatalytic antibacterial activity of nano TiO<sub>2</sub>: a review // *The Korean Journal of Chemical Engineering*. – 2016. – V. 33 (7). – P. 1989-1998.
5. Bucci-Sabattini V., Cassinelli C., Coelho P.G. [et al.]. Effect of titanium implant surface nanoroughness and calcium phosphate low impregnation on bone cell activity in vitro // *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. – 2010. – V. 109 (2). – P. 217-224.
6. Tian B., Chen W., Yu D. [et al.]. Fabrication of silver nanoparticle-doped hydroxyapatite coatings with oriented block arrays for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2016. – V. 61. – P. 345-359.
7. Campoccia D., Montanaro L., Arciola C.R. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces // *Biomaterials*. – 2013. – V. 34 (34). – P. 8533-8554.
8. Pareek V., Gupta R., Panwar J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – V. 90. – P. 739-749.

- 
9. Li T., Lee J., Kobayashi T. [et al.]. Hydroxyapatite coating by dipping method, and bone bonding strength // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 1996. – V. 7(6). – P. 355-357.
10. Yang G.L., He F.M., Hu J.A. [et al.]. Biomechanical comparison of biomimetically and electrochemically deposited hydroxyapatite-coated porous titanium implants // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2010. – V. 68(2). – P. 420-427.
11. Su Y., Cockerill I., Zheng Y. [et al.]. Biofunctionalization of metallic implants by calcium phosphate coatings // *Bioactive Materials*. – 2019. – V. 4. – P. 196-206.
12. Brinker C.J., Scherer G.W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. – Boston: Academic Press, 2013. – 908 p.
13. Максимов А.И. Основы золь-гель-технологии нанокompозитов: монография / Максимов А.И., Мошников В.А., Таиров Ю.М. [и др.]. – СПб.: Изд-во СПбГЭТУ "ЛЭТИ", 2007. – 156 с.
14. Калюжный С.В. Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов / под редакцией С.В. Калюжного. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 528 с.
15. Помогайло А.Д. Полимерный золь-гель синтез гибридных нанокompозитов. // *Коллоидный журнал*. – 2005. – Т. 67 (6). – С. 726-747.
16. Meyerhofer D. Characteristics of resist films produced by spinning // *Journal of Applied Physics*. – 1978. – V. 49 (7). – P. 3993-3997.
17. Hellstrom S.L. Basic models of spin coating. (Submitted as coursework for Physics 210. – Stanford University, 2007.
18. Attia S.M., Wang J., Wu G. [et al.]. Review on Sol-Gel Derived Coatings: Process, Techniques and Optical Applications // *Journal of Materials Science and Technology*. – 2002. – V. 18(3) – P. 211-217.

- 
19. Pokropivny V. Introduction in nanomaterials and nanotechnology / Pokropivny V., Lõhmus R., Hussainova I. [et al.]; University of Tartu. – Tartu: Tartu Press, 2007. – 225 p.
20. Belleville P.F., Floch H.G., Berger M. Sol-gel Optical coatings processed by the laminar-flow coating technique // Sol-Gel Optics II, SPIE – the International Society for Optical Engineering. – 1992. – V. 1758. – P. 40-48.
21. Scriven L.E. Physics and Applications of Dip Coating and Spin Coating // Materials Research Society Symposium Proceedings. – 1988. – V. 121. – P. 717-729.
22. Rahaman M.N. Ceramic Processing. – Boca Raton, Florida: CRC Taylor & Francis, 2007. – 473 p.
23. Varela A.I.G. Sol-Gel Glass Coating Synthesis for Different Applications: Active Gradient-Index Materials, Microlens Arrays and Biocompatible Channels / Varela A.I.G., Aymerich M., García D.N. [et al.]. // Recent Applications in Sol-Gel Synthesis, edited by Chandra U. – Rijeka, Croatia: InTechOpen, 2017. – 308 p.
24. Brinker C.J., Hurd A.J., Ward K.J. Ultrastructure Processing of Advanced Ceramics / edited by Mackenzie J.D., Ulrich, D.R. – New York: Wiley, 1988. – 223 p.
25. Стрельцов Е.А. Электрохимическое осаждение тонких пленок и наноструктур полупроводниковых халькогенидов металлов // Вестник БГУ. – 2011. – Сер. 2. – № 3. – С.15-19.
26. Tian B., Tang S., Wang C.-D. [et al.]. Bactericidal properties and biocompatibility of a gentamicin-loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/carbonated hydroxyapatite coating // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2014. – V. 123. – P. 403-412.
27. Fielding G.A., Roy M., Bandyopadhyay A. [et al.]. Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings // Acta biomaterialia. – 2012. – V. 8 (8). – P. 3144-3152.
28. Zheng K., Setyawati M.I., Leong D.T. [et al.]. Antimicrobial silver nanomaterials // Coordination Chemistry Reviews. – 2018. – V. 357. – P. 1-17.



- 
29. He Y., Kang Z., Chen D. Integrating nanodiamonds to improve anticorrosion property and conductivity simultaneously of Ag composite films via layer by layer spin-spray deposition // *Applied Surface Science*. – 2020. – V. 505. – P. 144643.
30. Liang R., Xu Y., Zhao M. [et al.]. Properties of silver contained coatings on CoCr alloys prepared by vacuum plasma spraying // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – V. 106. – P. 110156.
31. Lu X., Zhang B., Wang Y. [et al.]. Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition // *Journal of the Royal Society Interface*. – 2011. – V. 8 (57). – P. 529-539.
32. Fu C., Zhang X., Savino K. [et al.]. Antimicrobial silver-hydroxyapatite composite coatings through two-stage electrochemical synthesis // *Surface and Coatings Technology*. – 2016. – V. 301. – P. 13-19.
33. Brunette D.M. *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications* / Brunette D.M., Tengvall P., Textor M. [et al.]. – Springer Science & Business Media, 2001. – 1019 p.
34. Kim H.-L., Jung G.-Y., Yoon J.-H. [et al.]. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering // *Materials Science and Engineering: C*. – 2015. – V. 54. – P. 20-25.
35. Szcześ A., Hołysz L., Chibowski E. [et al.]. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2017. – V. 249. – P. 321-330.
36. Vijayaraghavan T.V., Bensalem A. Electrodeposition of apatite coating on pure titanium and titanium alloys // *Journal of Materials Science Letters*. – 1994. – V. 13 (24). – P. 1782-1785.
37. Renghini C., Girardin E., Fomin A.S. [et al.]. Plasma sprayed hydroxyapatite coatings from nanostructured granules // *Materials Science and Engineering: B*. – 2008. – V. 152 (1-3). – P. 86-90.

- 
38. Kar A., Raja K.S., Misra M. Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO<sub>2</sub> for implant applications // *Surface and Coatings Technology*. – 2006. – V. 201 (6). – P. 3723-3731.
39. Kuo M.C., Yen S.K. The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature // *Materials Science and Engineering: C*. – 2002. – V. 20 (1-2). – P. 153-160.
40. Eliaz N., Sridhar T.M., Kamachi M.U. [et al.]. Electrochemical and electrophoretic deposition of hydroxyapatite for orthopaedic applications // *Surface Engineering*. – 2005. – V. 21 (3). – P. 238-242.
41. Уласевич С.А., Позняк С.К., Кулак А.И. [и др.]. Электрохимическое осаждение биоактивных кальцийфосфатных композиционных покрытий // *Свиридовские чтения: сб. ст. Вып. 8*. – Минск, 2012. – С. 168-177.
42. Стив Д.В. Этвуд Д.Л. Супрамолекулярная химия: [в 2 томах] / перевод с английского; под редакцией Цивадзе А.Ю. – М: ИКЦ «Академкнига», 2007. – Т. 2. – 416 с.
43. Gibson L.T. Mesosilica materials and organic pollutant adsorption: part A removal from air // *Chemical Society Reviews*. – 2014. – V.43. – P. 5163-5172.
44. Pérez-Page M., Yu E., Li J. [et al.]. Template-based syntheses for shape controlled nanostructures // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2016. – V. 234. – P. 51-79.
45. Penner R.M., Martin C.R. Preparation and electrochemical characterization of ultramicroelectrode ensembles // *Analytical Chemistry*. – 1987. – V. 59. – P. 2625-2630.
46. Tsai W.C., Wan C.C., Wang, Y.Y. Frequency Effect of Pulse Plating on the Uniformity of Copper Deposition in Plated Through Holes // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2003. – V. 150 (5), P. 267-272.
47. Oh J., Tak Y., Lee J. Electrodeposition of Cu<sub>2</sub>O Nanowires Using Nanoporous Alumina Template // *Electrochemical and Solid State Letters*. – 2004. – V. 7 (3). – P. 27-30.

- 
48. Yin A.J., Li J., Jian W. [et al.]. Fabrication of highly ordered metallic nanowire arrays by electrodeposition // *Applied Physics Letters*. – 2001. – V. 79 (7). – P. 1039-1041.
49. Nasirpouri F. *Electrodeposition of Nanostructured Materials*. – Springer Series in Surface Sciences, 2016. – 325 p.
50. Brånemark P.-I., Adell R., Breine U. [et al.]. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies // *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. – 1969. – V.3 (2). – P. 81-100.
51. Минина А.Н. Основы дентальной имплантации. Учебно-методическое пособие / А.Н.Минина, Т.Н.Чернина. – Витебск: ВГМУ, 2013 – 76 с.
52. Brånemark P. Introduction to osseointegration. *Tissue-integrated Prostheses: Osseointegration in clinical Dentistry* / Brånemark P., Zarb G., Albrektsson T. – Chicago: Quintessence, 1985. – 350 p.
53. Иванов П.В., Макарова Н.И., Булкина Н.В. [и др.]. Современные представления об остеоинтеграции дентальных имплантатов (обзор литературы) // *Известия ВУЗов. Поволжский регион. Медицинские науки*. – 2018. – № 4 (48). – С. 191-202.
54. Albrektsson T., Johansson C. Osteoinduction, Osteoconduction and Osseointegration // *European Spine Journal*. – 2001. – V. 10 (2). – P. 96-101.
55. Карлов А.В. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики / Карлов А.В., Шахов В.П. – Томск: СТУ, 2001. – 480 с.
56. Sunny M.C., Sharma C.P. Titanium-protein interaction: changes with oxide layer thickness // *Journal of Biomaterials applications*. – 1991. – V. 6 (1). – P. 89-98.
57. Williams C.P., Hogg T. Using deep structure to locate hard problems // *Proceedings AAAI-92, San Jose*. – 1992. – P. 472-477.
58. Narayanan G., Vernekar V.N., Kuyinu E.L. [et al.]. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – V. 107. – P. 247-276.

---

59. Lenis J.A., Toro L.J., Bolívar F.J. Multi-layer bactericidal silver-calcium phosphate coatings obtained by RF magnetron sputtering // *Surface and Coatings Technology*. – 2019. – V. 367. – P. 203-211.

60. Deshmukh S.P., Patil S.M., Mullani S.B. [et al.]. Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – V. 97. – P. 954-965.

61. Букина Ю.А., Сергеева Е.А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра // *Вестник Казанского технологического университета*, 2012. – V. 15 (14). – P. 170-172.

62. Durango-Giraldo G., Cardona A., Zapata J.F. [et al.]. Titanium dioxide modified with silver by two methods for bactericidal applications // *Heliyon*. – 2019. – V. 5 (5). – e01608.

63. Fordham W.R., Redmond S., Westerland A. [et al.]. Silver as a Bactericidal Coating for Biomedical Implants // *Surface and Coatings Technology*. – 2014. – V. 253. – P. 52-57.

64. Zimmerli W., Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. – 2012. – V. 65 (2). – P. 158-168.

65. Bruellhoff K., Fiedler J., Möller M. [et al.]. Surface Coating Strategies to Prevent Biofilm Formation on Implant Surfaces // *The International Journal of Artificial Organs*. – 2010. – V. 33 (9). – P. 646-653.

66. Khalid H.F., Tehseen B., Sarwar Y. [et al.]. Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties // *Journal of Hazardous Materials*. – 2019. – V. 364. – P. 441-448.

67. Vladkova T., Angelov O., Stoyanova D. [et al.]. Magnetron co-sputtered TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub>/Ag nanocomposite thin coatings inhibiting bacterial adhesion and biofilm formation // *Surface and Coatings Technology*. – 2020. – V. 384. – P. 125322.

- 
68. Chernousova S., Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2013. – V. 52 (6). – P. 1636-1653.
69. Anjali Das C.G., Ganesh Kumar V., Stalin Dhas T. [et al.]. Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – P. 101593.
70. Siddiqi K.S., Husen A., Rao R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2018. – V. 16 (1).
71. Abou El-Nour M.M.K, Eftaiha A., Al-Warthan A. [et al.]. Synthesis and applications of silver nanoparticles // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2010. – V. 3 (3). – P. 135-140.
72. Barrère F., Mahmood T.A., Groot K. [et al.]. Advanced biomaterials for skeletal tissue generation: Instructive and smart functions // *Materials Science and Engineering R: Reports*. – 2008. – V. 59. – P. 38-71.
73. Fratzl P., Weinkamer R. Nature's hierarchial materials // *Progress in Materials Science*. – 2007. – V. 52. – P. 1263-1334.
74. Gittens R.A., Olivares-Navarrete R., Schwartz Z. [et al.]. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – V. 10. – P. 3363-3371.
75. Davies J.E., Ajami E., Moineddin R. [et al.]. The roles of different scale ranges of surface implant topography on the stability of the bone/implant interface // *Biomaterials*. – 2013. – V. 34. – P. 3535-3546.
76. Takahashi Y., Matsuoka Y. Dip-coating of TiO<sub>2</sub> films using a sol derived from Ti(O-i-Pr)<sub>4</sub>-diethanolamine-H<sub>2</sub>O-i-PrOH system // *Journal of Materials Science*. – 1988. – V. 23. – P. 2259-2266.
77. Li T.-T., Ling L., Lin M.-C. [et al.]. Effects of ultrasonic treatment and current density on the properties of hydroxyapatite coating via electrodeposition and its in vitro

---

biomineralization behavior // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – V. 105. – P. 110062.

78. Kar A., Raja K.S., Misra M. Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO<sub>2</sub> for implant applications // *Surface and Coatings Technology*. – 2006. – V. 201 (6). – P. 3723-3731.

79. Nur A., Setyawan H., Widjaja A. [et al.]. Electrochemical Processes for the Formation of Hydroxyapatite Powders // *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*. – 2014. – V. 9 (3). – P. 168-174.

80. Ковба Л.М. Рентгенофазовый анализ / Ковба Л.М., Трунов В.К. – [2-е изд., доп. и перераб.] – М.: МГУ, 1976. – 232 с.

81. Басов А.А. Проверка соотношения неопределенностей при дифракции электронов: метод. указания к лаб. работе по атомной физике № 4-3 для студентов ИЯЭиТФ всех форм обучения / Басов А.А., Хорьков С.В., Яшина А.Н.; НГТУ им. Р.Е. Алексеева – Нижний Новгород, 2015. – 11 с.

82. Тарасевич Б.Н. Основы ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье: Подготовка проб в ИК-спектроскопии: учебное пособие к спецпрактикуму по физико-химическим методам для студентов-дипломников кафедры органической химии. – М.: Изд-во МГУ, 2012. – 22 с.

83. Larkin P.J. Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation / Elsevier, 2011. – 230 p.

84. Бёккер Ю. Спектроскопия / перевод с немецкого Казанцевой Л.Н.; под редакцией Пупышева А.А., Поляковой М.В. – М.: Техносфера, 2009. – 528 с.

85. Притыченко А.Н. Микроскопический метод исследования: учебно-методическое пособие для студентов ветеринарного и биотехнологического факультетов, слушателей ФПКиПК, специалистов АПК / Притыченко А.Н., Медведев А.П., Вербицкий А.А. [и др.]. – Витебск: УО ВГАВМ, 2011. – 76 с.

---

86. Губарев Ф.А. Оптическая микроскопия: Лекция – Томск: Томский политехнический университет, 2017.

87. Оура К. Введение в физику поверхности / Оура К., Лифшиц В.Г., Саранин А.А. [и др.]; перевод с немецкого Зотов А.В., Саранин А.А.; под редакцией Сергиенко В.И. – М.: Наука, 2006. – 490 с.

88. Жу У. Растровая электронная микроскопия для нанотехнологий. Методы и применение [Электронный ресурс] / Жу У., Уанга Ж.Л. – М.: Лаборатория знаний, 2017. – 601 с.