

СОЗДАНИЕ НАНОПОКРЫТИЙ РАЗЛИЧНОЙ МОРФОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА ТИТАНА НА ТИТАНОВОЙ МАТРИЦЕ ДЛЯ КОСТНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Е.Г. Земцова*, Е.В. Орехов, А.Ю. Арбенин, Р.З. Валиев, В.М. Смирнов

Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

*e-mail: ezimtova@yandex.ru

Аннотация. В данной работе был реализован подход к улучшению биосовместимости костных имплантатов, основанный на создании связей между имплантатом и живой тканью за счёт поверхностной модификации. Биоактивные поверхности на титановых носителях создавались за счёт создания мезопористого слоя пленки TiO_2 с развитой микронной структурой. Для направленного регулирования биомедицинских свойств поверхности нанометаллов применялся золь-гель метод. Этот метод позволил получить мезопористую плёнку оксида титана на поверхности металла в нанометровом диапазоне, которая значительно улучшает адгезию остеобластов (клеток костной ткани).

1. Введение

В наше время в ортопедии все чаще стали использовать изделия, созданные из разных сплавов. Однако применение необработанного металла или его сплава может отторгаться организмом. По этой причине очень важно чтобы материалы, используемые в медицине, были биосовместимы и биоактивны.

Исследование возможности образования химической связи между поверхностью искусственного имплантата, например титана, и костной тканью является одной из важнейших характеристик современных биоматериалов, предназначенных для ортопедии, реконструкционной хирургии и стоматологии. Важной задачей химического материаловедения является создание такой поверхности дентального имплантата, которая бы создавала рациональные условия для контактного остеогенеза (образования и развития костной ткани) как наиболее оптимального механизма образования органотипичного костного вещества на поверхности имплантата. Ранее было показано, что элементный состав поверхности имплантата и рельеф поверхности титана играет важную роль в образовании остеобластов (молодые костные клетки) и увеличении их остеосовместимости [1]. Можно утверждать, что качественные и количественные показатели остеоинтеграции напрямую зависят от топографии поверхности титанового имплантата, в том числе наноструктурированного, и ее химического состава [2]. В этой связи важным направлением в развитии медицинского материаловедения является разработка методов поверхностной модификации, которые позволят увеличить остеосовместимость металлических имплантантов и тканей организма. При этом могут реализовываться два способа создания связей между имплантатом и живой тканью:

- 1) механическое сцепление в результате прорастания ткани в структуру имплантата;
- 2) химическое взаимодействие ткани с компонентами элементного состава имплантата;

В рамках представленной работы исследовался второй подход к решению задачи повышения остеоинтеграции, реализованный за счёт поверхностной модификации с применением золь-гель технологии.

В литературе приводятся результаты работ по созданию монолитных и прозрачных пленок посредством золь-гель технологии на различных подложках [3], причем исследователи обычно в выводах акцентируют внимание на том, что ими были подобраны условия синтеза, приводящие к получению сплошных бездефектных пленок. Нами ставилась задача создать пленку в режиме *dip coating* (покрытие окунанием), синтезированную в условиях большого перепада температур и имеющую сетку из микротрещин, пронизывающую весь объем пленки. Такая текстура покрытия может повысить сцепление клеток с поверхностью титана и привести к ускоренной остеоинтеграции.

Большинство работ в России и в мире по созданию биосовместимых покрытий направлены или на создание текстуры поверхности или на нанесение соединений, ускоряющих остеоинтеграцию. Для модификации применяется ряд различных методов, основанных на изменении геометрии поверхности или изменении химического состава поверхностного слоя. Наша работа объединяет несколько направлений в одном покрытии с применением нового метода создания двухуровневой текстуры. Применение двухуровневой иерархии поверхности с регулируемой геометрией как на микро-, так и на наноуровне, в сочетании с введением промоторов остеоинтеграции (кальций-фосфатные структуры) в поверхностный слой может привести к успешному созданию нового имплантата с ускоренной остеоинтеграцией.

2. Экспериментальная часть.

Первым этапом работы стала отработка методики синтеза исходного золя оксида титана. В результате нами был выбран метод, описанный в работе [4], основанный на гидролизе тетраизопропоксида титана в присутствии диэтаноламина в изопропиловом спирте. Конечное весовое соотношение компонентов TTIP/ *i*-PrOH/ DEA/ H_2O = 227/773/105/36.

Следующим этапом работы стала отработка режима нанесения пленки на модельную подложку титан (нанотитан). Для этого был применён метод *dip coating*, основанный на вытягивании планарной подложки из раствора. При невысоких скоростях вытяжки существует две области, отвечающие капиллярной модели осаждения, учитывающей высыхание наносимой плёнки, и модели дренажа при вязкостном сопротивлении жидкости. В первом случае происходит снижение толщины плёнки со спадом скорости вытяжки, во втором — наоборот [5]. Для понимания процесса осаждения мы провели серию экспериментов по нанесению плёнки геля на подложки с разной скоростью вытяжки из синтетического раствора. Как видно из рис. 1, в области 50-100 мм/мин наблюдается линейный участок.

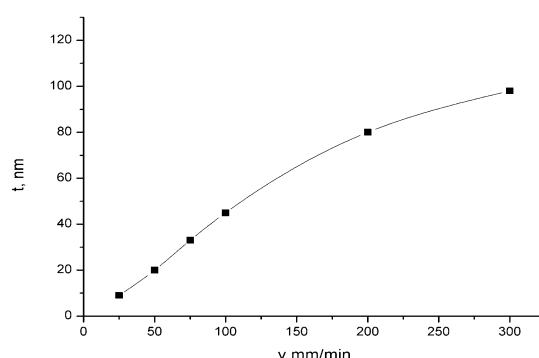


Рис. 1. Зависимость толщины плёнки от скорости вытяжки.

Точка 25 мм/мин отклоняется от линейной зависимости либо за счёт смешенного механизма осаждения, либо это стат-выпады, так как в данной области графика только одна точка. Выше 100 мм/мин наблюдаются заниженные значения, что объясняется невозможностью на данных скоростях полной компенсации вязкостным сопротивлением когезии жидкости. Для дальнейших исследований была выбрана скорость вытяжки 75 мм/мин, что является серединой линейного участка.

На следующем этапе отработывалось получение композита TiO_2 /фосфат кальция на основе осаждённых плёнок. В качестве метода синтеза гидроксиапатита, был взят способ взаимодействия дигидрофосфата аммония с растворимыми солями кальция, такими как ацетат или нитрат. Для достижения равномерности состава покрытия был применён метод *dip coating*, основанный на вытягивании образца из раствора. Получаемые таким образом пропитанные плёнки высушивались в эксикаторе, затем помещались в раствор дигидрофосфата аммония. После этого этапа производилась отмычка избытка реагента водой, далее образец прокаливался на воздухе. Данный метод позволил получить кальций-фосфатные структуры в плёнке диоксида титана (рис. 2).

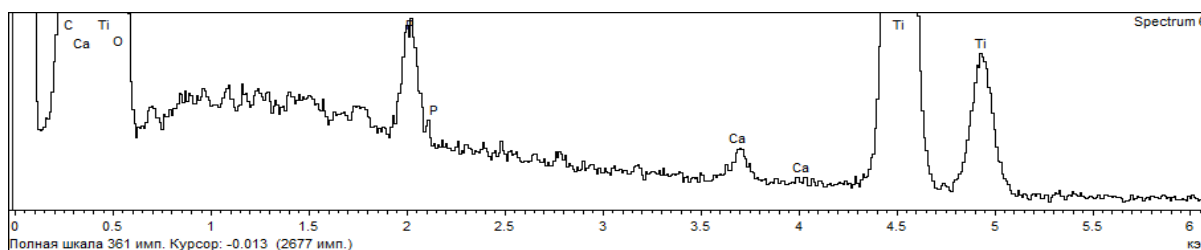


Рис. 2. Энергодисперсионный спектр образца нанесения геля TiO_2 с кальций-фосфатными включениями, полученными с применением $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Толщина оксидного покрытия варьировалась за счёт циклирования процесса нанесения из раствора методом *dip coating*. В результате работы были изготовлены образцы после 1 – 5 циклов обработки поверхности подложки титана (нанотитана). При анализе толщины покрытия с помощью спектральной эллипсометрии была выявлена линейная зависимость толщины композитной плёнки диоксида титана от количества наносимых слоёв (табл. 1).

Таблица 1. Прирост толщины плёнки при циклическом нанесении пленки TiO_2 .

Кол-во циклов	1	2	3	4	5
Толщина плёнки, нм	33	72	124	180	204
Прирост толщины, нм	33	39	52	56	24

Исследование остеосовместимости полученных образцов проводили в сравнении с образцом титана с собственным (реальным) оксидом титана. Оценку состояния клеток (характера адгезии и распластывания клеток на поверхности образцов) выполняли с помощью метода сканирующей электронной микроскопии.

3. Результаты и обсуждения

Изначально с помощью сканирующей электронной микроскопии был исследован образец после одного цикла нанесения оксидной плёнки. На микрофотографии мы

отчётливо видим глобулы ксерогеля перемежающиеся с устьями пор, размер которых лежит в нанометровом диапазоне 5 – 20 нм (рис. 3).

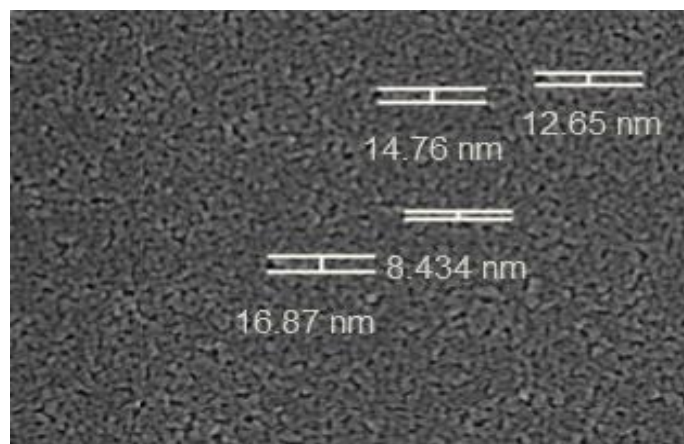


Рис. 3. Электронная микрофотография высокого разрешения композитной плёнки, с 1 циклом dip coating TiO_2 , после рафинирования.

Однако на микронном уровне не наблюдается изменения рельефа поверхности плёнки. На малом увеличении можно видеть, что плёнка имеет сплошную структуру (рис. 4). Данный тип нанесения покрытия не приводит к созданию двухуровневой организации рельефа поверхности.

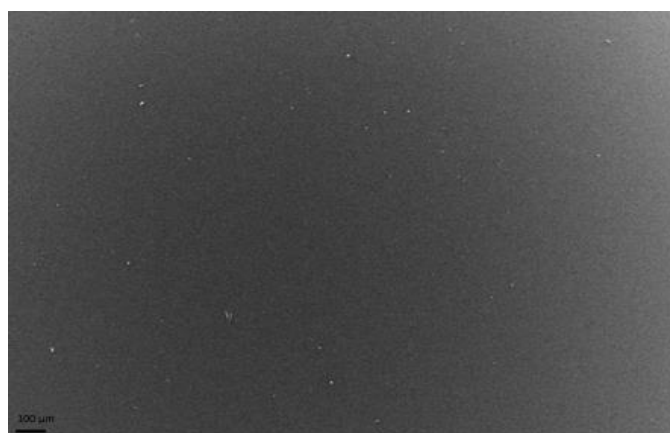


Рис. 4. Электронная микрофотография низкого разрешения композитной плёнки, с 1 циклом dip coating TiO_2 , после рафинирования.

Проанализировав образцы с толщиной композитной плёнки (покрытия) от 70 до 200 нм нами было выявлено, что наиболее развитой поверхность на микронном уровне обладают плёнки с толщиной 200 нм (после пяти циклов нанесения плёнки геля TiO_2 методом dip coating). Дальнейший рост толщины плёнки приводит к падению её механической устойчивости, и покрытие скалывается с поверхности подложки титана.

Следует отметить, что образец полученный с пятью циклами нанесения плёнки геля TiO_2 методом dip coating (толщина 200 нм), также обладает порами размером 5-20 нм, (рис. 5), как и плёнка после одного цикла нанесения геля TiO_2 .

Благодаря такому строению плёнки формируется развитый рельеф поверхности покрытия на наноуровне. Микрофотографии данного образца полученная с помощью сканирующей электронной микроскопии малого увеличения выявили развитую структуру поверхности покрытия и на микронном уровне (рис. 6).

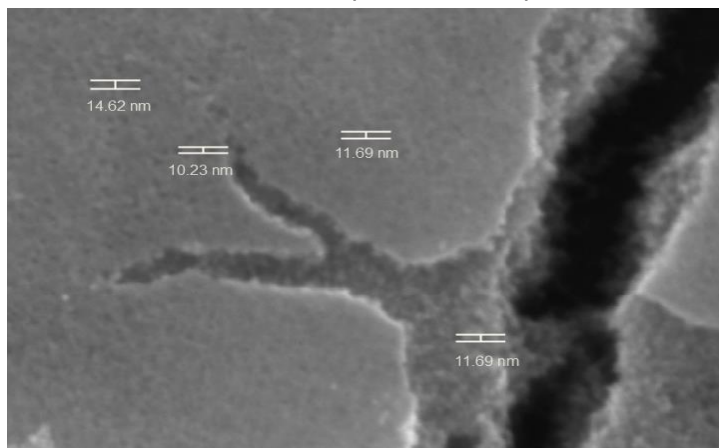


Рис. 5. Электронная микрофотография высокого разрешения композитной плёнки, с 5 циклами dip coating TiO_2 , после рафинирования.

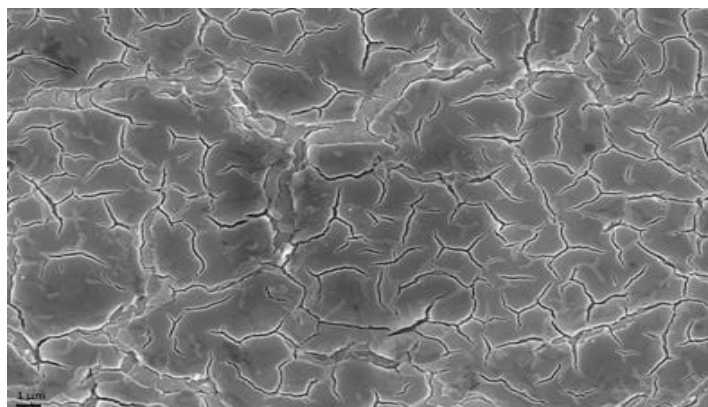


Рис. 6. Электронная микрофотография низкого разрешения композитной плёнки, с 5 циклами dip coating TiO_2 , после рафинирования.

В результате нами было получено покрытие с развитым рельефом поверхности как на микронном уровне, возникающем за счет эрозии изначально сплошной пленки, так и на наноуровне – за счет зернистости самой пленки.

В работе также было исследовано влияние структурных характеристик экспериментальных образцов с двухуровневой организацией рельефа поверхности покрытия на биомедицинские свойства для дальнейшего получения имплантатов с повышенными биоактивными свойствами.

Цитологические исследования показали, что полученные композитные покрытия на титане имеют лучшее сродство к клеткам остеобластам MC3T3-E1, чем чистый титан без покрытия. Несмотря на то, что концентрация клеток при нанесении на поверхность образцов была одинаковая, на поверхности чистого титана выявлены только единичные клетки остеобластов (рис. 7а). Это свидетельствует о невысоких адгезионных свойствах поверхности данного образца для исследуемой клеточной линии. Для образца после одного цикла нанесения композитной плёнки на титан (толщина 30 нм) характерно формирование сплошного клеточного монослоя остеобластов на поверхности с хорошей адгезией (рис. 7 б). Образец же с сеткой трещин (после пяти циклов нанесения) показал не только высокие адгезионные свойства поверхности для исследуемой клеточной линии, а также одновременно с адгезией мы смогли наблюдать сплошной слой клеток с остеоцитными каналами (рис. 7в). Это явление указывает на способность данной поверхности к ускоренному

остеосинтезу, что может быть объяснено наличием двухуровневой иерархии структуры, образованной микронными трещинами и нанометровыми порами, а также наличием в порах ксерогеля фосфата кальция.

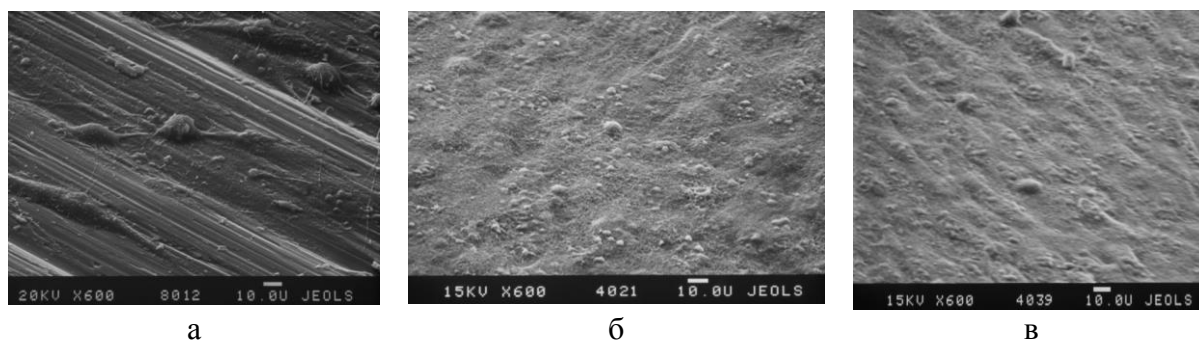


Рис. 7. Электронная микрофотография поверхности после инкубации остеобластов: а — исходный титан, б — образец с 1 циклом обработки, в — образец с 5 циклами обработки.

В работах ряда исследователей отмечалось, что наличие нано- и микрорельефа действительно позитивно сказывается на биомедицинских свойствах имплантатов [6, 7].

Данная работа является значимым научным исследованием которая вносит вклад в разработку нового поколения клинически значимых металлических биоматериалов (биоактивные и биосовместимые имплантаты). Данные материалы играют существенную роль в повышении качества и продолжительности жизни человека и применяются в медицине (стоматология, ортопедия, травматология) для поддержания жизнедеятельности и нормального функционирования организма.

4. Выводы

В результате проведённого исследования было показано, что плёнки с размером пор 5-20 нм, наполненные кальций-фосфатными структурами, обладают значительным цитологическим откликом: наличие такого покрытия вызывает улучшение адгезии остеобластов. В случае же получения данной плёнки с микронными трещинами за счёт возникновения двухуровневой иерархии рельефа покрытия сокращается индукционный период начала дифференцировки остеобластов. Таким образом следует заключить, что нами были получены биоактивные покрытия, пригодные для ускорения приживления костных имплантатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы”, соглашение № 14.604.21.0084 (уникальный идентификационный номер RFMEFI 60414X0084).

Литература

- [1] Qizhi Chen, George A. Thouas // *Materials Science and Engineering R* **87** (2015)
- [2] K. Kajihara, K. Nakanishi, K. Tanaka, K. Hirao, N. Soga // *Journal of the American Ceramic Society* **81**(10) (1998) 2670.
- [3] K.E. Karakitsou, X.E. Verykios // *Journal of Physical Chemistry* **97** (1993) 1184.
- [4] Y. Takahashi, Y. Matsuoka // *Journal of Materials Science* **23** (1988) 2259.
- [5] M. Faustini, B. Louis, P. A. Albouy, M. Kuemmel, D. Grosso // *The Journal of Physical*

Chemistry C **114(17)** (2010) 7637.

[6] L. Zhao, S. Mei, P.K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu // *Biomaterials* **31** (2010) 5072.

[7] A.Yu. Arbenin, E.G. Zemtsova, R.Z. Valiev, V.M. Smirnov // *Russian Journal of General Chemistry* **84(12)** (2014) 2453.

THE CREATION OF NANOCOATINGS OF VARIOUS MORPHOLOGY ON THE BASIS OF TITANIUM DIOXIDE ON A TITANIUM MATRIX FOR BONE IMPLANT

E.G. Zemtsova*, J.V. Orekhov, A.Yu. Arbenin, R.Z. Valiev, V.M. Smirnov

Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, Universitetskii pr. 26, St. Petersburg, 198504, Russia,

*e-mail: ezimtsova@yandex.ru

Abstract. In this work, we have implemented the approach to improve the biocompatibility of bone implants based on creating relationships between the implant and the living tissue due to surface modification. Bioactive surface for titanium media was created through the creation of a mesoporous layer of TiO₂ films with well-developed micron-sized structure. For the directional regulation of biomedical properties of the surface of nanometals used Sol-gel method. This method allowed us to obtain a mesoporous film of titanium oxide on the metal surface in the nanometer diapazone, which greatly improves the adhesion of osteoblasts (bone cells).

Acknowledgement. This work was supported by Russian Ministry of Education and Science in the framework of the Federal target program “ Research and development on priority directions of development of scientific-technological complex of Russia for 2014-2020 “ contract No. 14.604.21.0084 (unique identifying number RFMEFI 60414X0084).

References

[1] Qizhi Chen, George A. Thouas // *Materials Science and Engineering R* **87** (2015)

[2] K. Kajihara, K. Nakanishi, K. Tanaka, K. Hirao, N. Soga // *Journal of the American Ceramic Society* **81(10)** (1998) 2670.

[3] K.E. Karakitsou, X.E. Verykios // *Journal of Physical Chemistry* **97** (1993) 1184.

[4] Y. Takahashi, Y. Matsuoka // *Journal of Materials Science* **23** (1988) 2259.

[5] M. Faustini, B. Louis, P. A. Albouy, M. Kuemmel, D. Grosso // *The Journal of Physical Chemistry C* **114(17)** (2010) 7637.

[6] L. Zhao, S. Mei, P.K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu // *Biomaterials* **31** (2010) 5072.

[7] A.Yu. Arbenin, E.G. Zemtsova, R.Z. Valiev, V.M. Smirnov // *Russian Journal of General Chemistry* **84(12)** (2014) 2453.