

УДК 615.472.5.032.13:544.6:539.232:546.82-31:620.3

## ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, РАСТВОРЕНИЕ *IN VITRO*, ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ОКСИДНЫХ И ОКСИНИТРИДНЫХ ПЛЕНОК ТИТАНА ДЛЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ СТЕНТОВ

Хлусов И.А.<sup>1,2</sup>, Пичугин В.Ф.<sup>2</sup>, Пустовалова А.А.<sup>2</sup>, Конищев М.Е.<sup>2</sup>, Дзюман А.Н.<sup>1</sup>, Эппле М.<sup>3</sup>, Ульбрихт М.<sup>3</sup>, Чичинскас Э.<sup>1</sup>, Гулая В.С.<sup>1</sup>, Вихарева В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия

<sup>3</sup> Университет Дуйсбург-Эссен, Эссен, Германия

### РЕЗЮМЕ

Изучено состояние оксидных и оксинитридных покрытий титана на стали L316 до и после их контакта с модельными биологическими жидкостями. Электрокинетическое исследование в водном растворе хлорида калия с концентрацией 1 ммоль показало значительное (более чем в 10 раз) снижение амплитуды электростатического потенциала тонких (200–300 нм) титановых пленок при изменении pH в интервале 5–9 единиц в течение 2 ч. Тем не менее при pH > 6,5 дзета-потенциал всех образцов оставался отрицательным. Длительный (5 нед) контакт образцов с SBF (simulated body fluid) вызывал коррозию стали и растворение пленок оксида и оксинитридов титана. Вместе с тем имели место преципитация ионов натрия и хлора и образование кристаллов хлорида натрия на образцах. Процесс преципитации солей из раствора значительно преобладал над растворением, поскольку возрастала масса образцов. Положительным является отсутствие кальцификации тестируемых искусственных поверхностей при длительном нахождении в SBF-растворе, что предполагает снижение риска быстрого тромбоза и потери функциональных свойств материалов. Согласно проведенному *in vitro* эксперименту, потенциальная биосовместимость тестируемых материалов после их контакта с SBF выстраивается следующим образом: Ti–O–N (1/3) > Ti–O–N (1/1), TiO<sub>2</sub> > сталь. Она может быть объяснена: антикоррозионными свойствами тонких пленок оксидов и оксинитридов титана; сохранением (для Ti–O–N) отрицательного заряда поверхности; меньшим приростом массы и толщины поверхностного слоя титановых пленок, связанным со скоростью процессов минерализации на межфазной границе раствор/твердое тело. В то же время исходные (до контакта с SBF) различия в смачиваемости образцов нивелировались. Модифицирующее влияние модельных биологических жидкостей на физико-химические особенности тестируемых материалов (увеличение шероховатости, снижение амплитуды или реверсия отрицательного потенциала поверхности, резкое повышение гидрофильности поверхности) следует учитывать при формировании оксидных и оксинитридных покрытий титана и прогнозировании их оптимальных биологических свойств как материалов для сердечно-сосудистых стентов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** магнетронное распыление, поверхность стали, дзета-потенциал, электростатический потенциал, шероховатость, масса и толщина покрытия, смачиваемость.

### Введение

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной заболеваемости и смертности населения. Одна из самых распространенных патологий в этой группе – ишемическая болезнь сердца (ИБС). Эффективным подходом к коррекции ИБС является коронар-

ная ангиопластика, заключающаяся в установке в артерии специального эндопротеза (стента), механически расширяющего просвет сосуда [1]. Однако повторное сужение просвета сосудов (рестеноз) и (или) образование тромбов при использовании различных типов стентов остаются главной проблемой сердечно-сосудистой хирургии во всем мире [2], приводящей к неуспеху дорогостоящей операции стентирования.

Большое распространение в клинической практике получили стенты с лекарственным покрытием (drug

✉ Хлусов Игорь Альбертович, тел./факс 8 (3822) -42-64-43; e-mail: khlusov63@mail.ru

eluting stents, DES), которые можно отнести к биоактивным медицинским изделиям. Однако в отдаленные сроки после установки DES на фоне длительно развивающихся рестенозов, редко представляющих угрозу для жизни больных, формируются тромбы [3]. Рост тромбов и отрыв их частей (эмболия) в 88% случаев могут приводить к смерти пациентов или инфаркту миокарда [4].

В связи с этим в последнее время вырос интерес к биоинертным покрытиям из оксидов и оксинитридов титана как альтернативе при модификации поверхности стентов [5]. Титанооксидные пленки улучшают био- и гемосовместимость металлической подложки, что имеет значение для имплантатов, контактирующих с кровью [6, 7]. Тем не менее физико-химические и биологические механизмы их биосовместимости до сих пор мало изучены.

Отдельные литературные данные посвящены физико-химическим свойствам поверхности (заряду, гидрофобности/гидрофильности, свободной поверхностной энергии, рельефу и т.п.) оксидов и оксинитридов титана [8], в том числе полученных способом реактивного магнетронного распыления [9], влияющим на исход их контакта с клетками крови и сосудистой стенки [10].

В то же время утверждения о био- и гемосовместимости покрытий из оксидов и оксинитридов титана основаны преимущественно на физике и химии твердого тела, без учета модулирующего влияния биологических жидкостей на параметры искусственных поверхностей. Вместе с тем вода [11] и электролиты считаются первыми молекулами, контактирующими с имплантатами, меняющими их поверхностные характеристики, в том числе через формирование электрокинетического (дзета-) потенциала.

Цель исследования – изучение состояния оксидных и оксинитридных покрытий титана на стали до и после контакта с модельной биологической жидкостью, потенциального вклада изменений физико-химических свойств их поверхности в механизмы био- и гемосовместимости эндопротезов сосудистой стенки.

## Материал и методы

Оксидные ( $\text{TiO}_2$ ) и оксинитридные ( $\text{Ti-O-N}$ ) покрытия титана были получены методом реактивного магнетронного распыления с использованием установки среднечастотного магнетронного осаждения «УВН-200МИ» (НИ ТПУ, г. Томск). В качестве подложки для нанесения односторонних покрытий использовались пластины с размерами  $10 \times 10$  мм и толщиной 1 мм, выполненные из медицинской стали марки L316. Параметры напыления: материал катода – Ti,

рабочее давление в камере – 0,1 Па, мощность – 1 кВт, сила тока – 3 А, скорость натекания рабочего газа – 5 мл в минуту, расстояние между подложкой и магнетроном – 100 мм. При формировании оксинитридных покрытий соотношение парциального давления газов  $\text{O}_2$  и  $\text{N}_2$  в рабочей камере магнетрона составило:  $p(\text{O}_2)/p(\text{N}_2) = 1/1$  или  $p(\text{O}_2)/p(\text{N}_2) = 1/3$ . Температура подложки в процессе осаждения составляла 120 °С, время напыления – 1 ч.

Контроль режимов осаждения пленок осуществлялся методом оптической эмиссионной спектроскопии в диапазоне длин волн 200–1000 нм с использованием спектрометра AvaSpec 3648 (Нидерланды). Идентификация линий оптических спектров проводилась с помощью баз данных NIST.

Толщина осажденных покрытий измерялась с использованием спектрального эллипсометрического комплекса «Эллипс-1891 САГ» (Россия) при фиксированном угле падения света 70° в интервале длин волн  $\lambda = 250\text{--}1000$  нм.

Шероховатость поверхности покрытий оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью профилометра-профилографа Talysurf 5-120 (Taylor-Hobson, Великобритания). Определяли индекс шероховатости  $R_a$  как среднее арифметическое отклонение профиля в пределах базовой длины 1,5 мм согласно ГОСТ 2789-73.

Морфология поверхности и элементный состав покрытий исследовались на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) ESEM Quanta 400 FEG (Нидерланды). Встроенный EDX-анализатор (EDS analysis system Genesis 4000, S-UTW-Si(Li)detector), работающий в условиях высокого вакуума ( $10^{-5}$  Па), позволил выполнить элементный анализ поверхности.

Рентгеноструктурные исследования проведены с применением дифрактометра Bruker D8 Advance (Германия). Кристаллические фазы определялись в  $2\theta$  геометрии в излучении  $\text{Cu-K}\alpha$  ( $\lambda = 0,15418$  нм). Все покрытия исследовались при следующих условиях: параметры анализирующего пучка 40 кВ и сила тока 20 мА, диапазон углов 4–70°, шаг сканирования 0,02°, время экспозиции – 6 с. Идентификация фаз осуществлялась с использованием базы данных Международного центра дифракционных данных (International Center for Diffraction Data, ICDD) и программы CSM (Crystallographica Search-Match). Объемные доли различных фаз рассчитывались по характеристикам дифракционных максимумов с использованием программы Powder Cell 2.4 и базы данных кристаллических структур неорганических веществ ICSD (Inorganic Crystal Structure Database). Рентгенофазовый

анализ (РФА) покрытий проводился на дифрактометре Shimadzu XRD-7000 (Япония).

Основные характеристики покрытий, согласно элементному анализу, представлены в табл. 1. По данным рентгеновской дифрактометрии, основной кристаллической фазой всех покрытий, несмотря на прирост концентрации азота в составе реактивного газа и в покрытии, является диоксид титана в форме анатаза (22–60%) и рутила (38–68%).

Таблица 1

Элементный состав (атомные %) исследованных образцов покрытий			
Элемент	Образец покрытия		
	TiO <sub>2</sub>	Ti–O–N при $p(\text{O}_2)/p(\text{N}_2) = 1/1$	Ti–O–N при $p(\text{O}_2)/p(\text{N}_2) = 1/3$
N	–	5,71	6,16
Ti	15,59	14,02	13,83
O	84,41	80,27	80,01

Для выявления типов химических связей, присутствующих в покрытиях оксидов и оксинитридов титана (TiO<sub>2</sub>, Ti–O–N), был применен метод инфракрасной (ИК) спектроскопии. Спектры оптического поглощения были получены на приборе Termo Nicolet 5700 (Франция) в диапазоне 400–4000 см<sup>-1</sup>.

Электростатический потенциал и плотность электрических зарядов на поверхности осажденных покрытий измеряли на воздухе, как описано нами ранее [12], электронным прибором (НИИ интроскопии ТПУ, г. Томск), обеспечивающим возможность измерения электрического поля слабо заряженных тел на основе усовершенствованного метода М. Егучи (метод подъемного электрода) на расстоянии 0,5 мм от поверхности покрытия.

Краевой угол смачиваемости  $\theta$  поверхности определяли при комнатной температуре методом «sessile drop» на приборе DSA20 EasyDrop (Германия) с применением деионизированной воды, как описано ранее [13].

Экспериментально дзета-потенциал ( $\zeta$ -потенциал) макроскопической поверхности получается из измерений потенциала (тока) протекания (ТП). В этом случае разность давления прикладывается параллельно поверхности покрытия (тангенциальный режим). ТП

измеряется в относительно широком щелевом канале, образованном двумя одинаковыми противоположащими поверхностями. Два образца с покрытиями крепились к противоположным поверхностям регулируемого зазора ячейки установки SurPASS (Австрия). В качестве электролита использовался водный раствор хлорида калия (KCl) с начальной концентрацией 1 ммоль. рН электролита изменялся в интервале 5–9 единиц (с шагом 0,5 единиц) добавлением в течение 2 ч водного раствора КОН (0,1 моль). Перед измерениями раствор протекал через канал достаточно длительное время (15 мин) для того, чтобы образец пришел в состояние равновесия. Максимальное значение разности давления составило 400 мбар в объеме электролита 550 мл. В использованном интервале давлений и размеров ячейки течение раствора электролита имело ламинарный характер. Скорость течения электролита линейно зависит от разности гидростатического давления и описывается формулой Гагена–Пуазейля [14]. Потенциал и сила тока протекания измерялись с использованием Ag/AgCl-электродов. Для уменьшения поляризации электродов направление протекания потока периодически менялось.

Растворение образцов выполняли в стационарных условиях, имитирующих зону асептического воспаления, неизбежно возникающего после введения биосовместимых изделий и сопровождающегося застоем биологических жидкостей в месте имплантации. Образцы выдерживали в течение 5 нед в растворителе, имитирующем неорганическую часть плазмы крови человека (simulated body fluid, SBF). Исходный состав реагентов для SBF (Nacalai tesque, Киото, Япония) представлен в табл. 2 и близок к стандартному варианту, разработанному в 1990 г. Т. Kokubo и соавт. [15]. Каждый образец помещали в стерильную закрывающуюся пластиковую пробирку с растворителем и культивировали в термостате при температуре 37 °С. Объем растворителя (4 мл) определяли согласно рекомендациям ISO 10993-5, исходя из суммарной площади поверхности образцов (2 см<sup>2</sup>). Контролем служил растворитель без исследуемых образцов.

Таблица 2

Содержание реагентов в 1 л SBF-раствора		
Реагент	Степень чистоты, приготовление	Количество, г
NaCl	99,5%	7,996
NaHCO <sub>3</sub>	99,5–100,3% (после высушивания)	0,350
KCl	99,5%	0,224
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	99,0%	0,228
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	98,0%	0,305
1 ммоль/м <sup>3</sup> HCl	87,28 мл 35,4% HCl растворить в 1 л	40 см <sup>3</sup>
CaCl <sub>2</sub>	95,0% (использовать после высушивания при 120 °С в течение 12 ч)	0,278
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99,0%	0,071
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	99,9% (после высушивания)	6,057

1 кмоль/м<sup>3</sup> HCl

87,28 мл 35,4% HCl растворить в 1 л

Титруют для коррекции pH

Примечание. Растворитель – ультрачистая деионизированная вода.

Таблица 3

Масса исследуемых образцов с различными покрытиями на стали до и после культивирования в SBF, мг ( $Me(Q_1-Q_3)$ , $n = 3$ )			
№ группы	Образец	Исходная масса образцов (до растворения)	Прибавка массы образцов после 5 нед растворения
1	Сталь	1103 (1084–1155)	0,11 (0,05–0,13)*
2	TiO <sub>2</sub> -покрытие	1190 (1186–1194)	0,10 (0,10–0,12)*
3	Ti–O–N-покрытие при $p(O_2)/p(N_2) = 1/1$	1137 (1102–1158)	0,04 (0,03–0,06)* $p_2 < 0,01$
4	Ti–O–N-покрытие при $p(O_2)/p(N_2) = 1/3$	1149 (1107–1172)	0,02 (0,01–0,03)* $p_2 < 0,01$

Примечание.  $n$  – число исследованных образцов (проб); \* – статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия с исходной массой образцов согласно  $t$ -критерию Вилкоксона;  $p_2$  – статистически значимые различия с TiO<sub>2</sub>-покрытием согласно  $U$ -критерию Манна–Уитни.

В конце 1, 2, 3, 4 и 5-й нед культивирования все растворы забирали и заменяли свежей порцией SBF. В забранных порциях определяли pH, а также концентрации биологически активных (ионизированных) натрия, калия и кальция, общего (связанного с органическими и неорганическими ионами) кальция, фосфатного иона (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, неорганический фосфат) с помощью наборов Thermo Fisher Scientific Inc. (США) на биохимическом автоматическом анализаторе Konelab 60i (США). После 3 и 5 нед растворения образцы вынимали, сушили при температуре 120 °С в течение 1 ч, определяли их массу (табл. 3) и физические свойства поверхности. В растворах вольтамперометрическим способом [16] определяли концентрацию железа, составляющего до 71 весового процента (вес.%) от элементного состава стальной подложки. Массу образцов выявляли при взвешивании на электронных весах GR 202 (Япония)

I класса точности по ГОСТ 24104-201 (среднее квадратичное отклонение при взвешивании 0,023–0,047 мг).

Полученные результаты выражали как среднее арифметическое  $M$  и стандартное отклонение  $SD$  или как медиану  $Me$ , 25%-й ( $Q_1$ ) и 75%-й ( $Q_3$ ) квартили. При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова). Оценку достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, проводили с использованием непараметрических  $t$ -критерия Вилкоксона или  $U$ -теста Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Согласно данным СЭМ, оксидные и оксинитридные покрытия титана на стали являются однородны-

ми, без видимых дефектов (трещин, пор, кратеров и др.). Основные элементы структуры покрытия представлены скоплениями мелких и одинаковых по форме частиц («зерен») куполообразной формы с диаметром порядка нескольких десятков и сотен нанометров (табл. 4), окруженных рентгеноаморфной зоной. Зерна имеют «тонкую» структуру и являются агломератами столбчатых субнанокристаллических элементов с линейными размерами порядка 8–15 нм (субструктура), перпендикулярных к границе раздела подложка/пленка.

Сталь является проводником, при измерении электрических свойств ее поверхности на заземленной подложке заряд «стекает» и электростатический потенциал считается нулевым. Наноструктурные нестехиометрические пленки оксида титана являются диэлектриками и полупроводниками [6], обладают третьими свойствами, что способствует накоплению отрицательного заряда на их поверхности (табл. 5).

Следует ожидать заметного влияния pH биологической среды на знак и величину заряда поверхности полученных покрытий, относящихся к классу амфотерных оксидов. Действительно, при помещении исследуемых образцов в хлорид калия на их поверхности формировался двойной электрический слой между искусственной поверхностью и электролитом, толщина которого зависела от взаимодействия одновалентных ионов и определяла величину  $\zeta$ -потенциала. Для изученных покрытий и стальной подложки он изменялся в интервале от +20 до –70 мВ с ростом pH с 5 до 9 единиц. При значениях водородного показателя более 6,5 поверхность всех образцов имела отрицательный заряд.

Однако направленность диффузионных процессов оказалась различной. Для пленок оксида и оксинитридов титана имела место существенная нейтрализация поверхностного отрицательного заряда, по-видимому, в результате осаждения катионов калия и протонов водорода. Напротив, поверхность стали адсорбировала из раствора преимущественно анионы хлора и гид-

роксильные группы, что предполагает исходный положительный заряд некоторых участков ее поверхности за счет катионов железа и легирующих металлов

(хром, никель, марганец). Считается, что положительный поверхностный заряд медицинской стали обуславливает ее недостаточную гемосовместимость [17].

Таблица 4

Физические параметры пленок оксида и оксинитридов титана на стали ( $M \pm SD$ )				
Параметр	Стальная подложка	Покрытие		
		TiO <sub>2</sub>	Ti–O–N при $p(O_2)/p(N_2) = 1/1$	Ti–O–N при $p(O_2)/p(N_2) = 1/3$
Интервал размерности «зерен» покрытия, нм	–	14–134	14–55	10–50
Дзета-потенциал при pH = 7,0, мВ	–56 ± 3	–50 ± 6	–21 ± 2*	–48 ± 11

Примечание. Представлены данные пяти измерений; \* – статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ) с соответствующими показателями стальной подложки согласно  $U$ -критерию Манна–Уитни.

Таблица 5

Изменение значений толщины $L$ , шероховатости $R_a$ , электростатического потенциала $V$ и контактного угла смачивания водой $\theta_w$ TiO <sub>2</sub> - и Ti–O–N-покрытий до и после 5-недельной инкубации в SBF ( $M \pm SD$ )				
Материал ( $n = 5$ )	Сталь	TiO <sub>2</sub> покрытие	Ti–O–N покрытие при $p(O_2)/p(N_2) = 1/1$	Ti–O–N покрытие при $p(O_2)/p(N_2) = 1/3$
	1	2	3	4
до растворения после SBF	–	150 ± 5	$L$ , нм 270 ± 7	290 ± 8
		205 ± 5*	282 ± 10	300 ± 8
до растворения после SBF	35 ± 6	39 ± 6	$R_a$ , нм 35 ± 5	36 ± 5
	58 ± 6*	54 ± 6*	60 ± 5*	57 ± 5*
до растворения после SBF	0 ± 2	–538 ± 33	$V$ , мВ –806 ± 44	–836 ± 39
	244 ± 16*	17 ± 2*	16 ± 2*	–49 ± 3*
		$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$	$p_{1-3} < 0,001$
до растворения после SBF	73,7 ± 1,8	90,0 ± 3,3	$\theta_w$ , град 105,7 ± 0,9	112,1 ± 1,8
	48,2 ± 3,1*	39,8 ± 3,5*	33,4 ± 2,2*	43,3 ± 4,5*

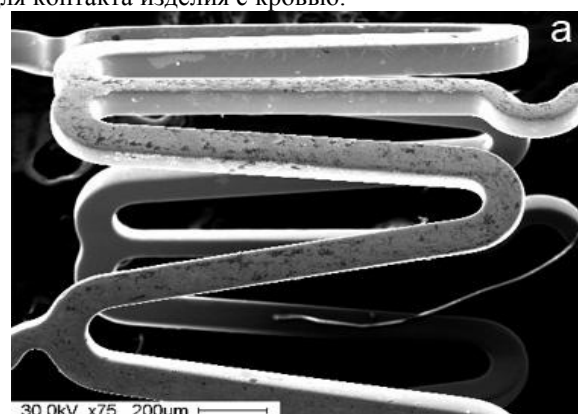
Примечание.  $n$  – число исследованных образцов; \* – статистически значимые различия с исходными (до растворения) значениями,  $p_1$ – $p_3$  – с соответствующим группами согласно  $U$ -критерию Манна–Уитни.

Электрокинетические исследования показывают, что после краткосрочного контакта с модельной биологической жидкостью (хлорид калия) знак заряда  $\zeta$ -потенциала всех образцов одинаков (см. табл. 4). Таким образом, не только протеины [18], но, прежде всего, молекулы воды и электролитов регулируют электростатические свойства поверхности имплантатов через формирование диффузионного двойного электрического слоя, модифицируя их взаимодействие с биологическими структурами.

Наличие на межфазной границе металл/электролит двойного электрического слоя оказывает существенное влияние на скорость коррозии металлов. Любой металлический сплав, окруженный биологической системой, будет корродировать и высвобождать токсичные для организма ионы легирующих элементов [19]. Нитриды металлов успешно применяются в качестве защитных покрытий от износа и коррозии имплантатов и эндопротезов [20].

Поверхность стального стента для клинического применения до контакта с кровью органолептически проигрывает таковой на изделии с оксинитридным покрытием титана (рис. 1). Отмечаются многочислен-

ные участки коррозии, увеличивающие шероховатость поверхности, что может иметь негативное значение для контакта изделия с кровью.



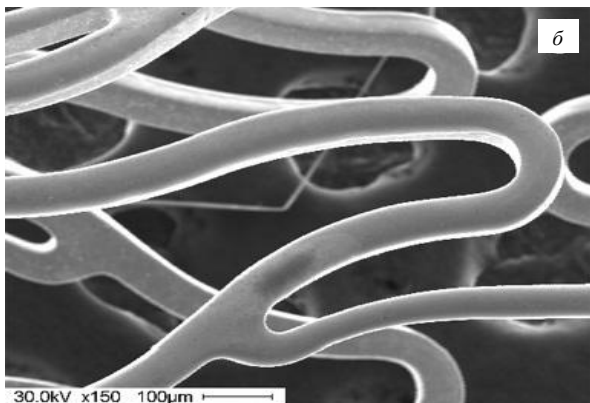


Рис. 1. Внешний вид стальных стентов (*a*) после нанесения пленки из оксинитрида титана (*б*). Ув. 75 (*a*) и 150 (*б*)

В связи с этим был проведен эксперимент, посвященный изучению 5-недельного влияния модельной биологической жидкости (SBF) на физико-химические свойства исследуемых образцов. Количественный химический анализ показал 2–5-кратный выход ионов железа из стальной подложки в раствор на протяжении всего периода наблюдений (табл. 6). Следует отметить, что

к 3-й нед содержание железа в SBF в 8 раз превышало его предельно допустимую концентрацию в воде (0,3 мг/л).

TiO<sub>2</sub>- и Ti–O–N- (1 : 1) покрытия статистически значимо снижали (до контрольного значения) уровень коррозии металла на 3-й нед эксперимента. В свою очередь, Ti–O–N-пленка (1 : 3) улучшала, как минимум, на 1 нед коррозионную стойкость образцов. Другими словами, пленки оксида или оксинитрида титана тормозили коррозию стали, что может снижать риск металлоза вокруг стентов после их имплантации в просвет кровеносных сосудов. Тем не менее краткосрочный защитный эффект покрытий подразумевает возможность их растворения и обнажения подложки за счет ионообмена с SBF, протекающего в двойном электрическом слое на поверхности образцов.

Интересным оказался факт статистически значимого ( $p_T < 0,05$ ) увеличения массы всех образцов при их продолжительном нахождении в SBF (см. табл. 3), который может быть связан с преципитацией (обратным осаждением) ионов и солей на искусственной поверхности. Наибольшую прибавку массы показала стальная подложка. TiO<sub>2</sub>-покрытие не влияло на изме-

нение массы, Ti–O–N-пленки в 2,5–5 раз уменьшали осаждение компонентов раствора на образцы.

Кальцификация имплантатов, взаимодействующих с кровью, является нежелательным явлением для имплантационной хирургии [10]. Как следствие, был изучен элементный состав SBF до и в динамике 5-недельного контакта с изучаемыми образцами. Интерес представляли калий (для интерпретации результатов измерения дзета-потенциала), натрий (наибольшая концентрация в биологических жидкостях), а также кальций и неорганический фосфор как источник потенциальной минерализации и окостенения зон имплантации. Не выявлено статистических различий в химическом составе SBF и корреляций между его показателями, представленными в табл. 7. Было сделано заключение, что исходный раствор в течение всего исследования оставался стабильным.

Растворение тестируемых образцов в течение 5 нед практически не меняло состав SBF, определяемого еженедельно. Исключение составила 2-я нед эксперимента, когда было отмечено достоверное снижение содержания ионов натрия (на 2–3 ммоль) и, в меньшей степени, калия (только для TiO<sub>2</sub>-покрытия) в условиях контакта с тестируемыми образцами (табл. 7). Как результат, было сделано предположение об увеличении массы образцов, контактирующих с SBF (см. табл. 3), вследствие обратного осаждения одновалентных катионов на тестируемых поверхностях. Принципиальным является отсутствие изменений в содержании кальция и фосфат-ионов, что подразумевает их незначительное участие в ионообмене с поверхностями образцов.

Таблица 6

Концентрация ионов железа в SBF-растворителе в динамике 5-недельного растворения образцов, мг/л ( $Me(Q_1-Q_3)$ )				
№ группы	Тестируемый материал	Время растворения, нед		
		1-я	3-я	5-я
1	Растворитель (контроль), $n = 3$	0,48 (0,47–0,50)		
2	Сталь	1,13 (1,13–2,32) $n = 3$ $p_1 < 0,05$	2,37 (1,99–2,39) $n = 5$ $p_1 < 0,01$	1,21 (0,84–1,85) $n = 3$ $p_1 < 0,05$
3	TiO <sub>2</sub> -покрытие	1,14 (1,0–1,29) $n = 3$ $p_1 < 0,05$	0,8 (0,48–1,70) $n = 5$ $p_2 < 0,01$	2,62 (1,92–2,84) $n = 3$ $p_1 < 0,01; p_2 < 0,05$
4	Ti–O–N-покрытие при $p(O_2)/p(N_2) = 1/1$	1,45 (0,75–2,0) $n = 3$ $p_1 < 0,05$	0,85 (0,81–1,0) $n = 5$ $p_2 < 0,01$	2,26 (1,31–2,84) $n = 3$ $p_1 < 0,02$
5	Ti–O–N-покрытие при $p(O_2)/p(N_2) = 1/3$	0,63 (0,47–0,72) $n = 3$ $p_2 < 0,05; p_3 < 0,05$	1,90 (1,80–2,07) $n = 5$ $p_1 < 0,01; p_3 < 0,03$ $p_4 < 0,02$	2,13 (1,47–2,24) $n = 3$ $p_1 < 0,01$

Примечание.  $n$  – число исследованных образцов (проб);  $p_1$ – $p_4$  – статистически значимые различия с соответствующими группами согласно  $U$ -критерию Манна–Уитни.

Таблица 7

Концентрации ионов (ммоль) и pH в SBF-растворе после 2-недельного контакта со стальными образцами, несущими оксидное или оксинитридные покрытия титана ( $M \pm SD$ )						
Группа ( $n = 5$ )	$K^+$	$Na^+$	pH	$Ca^{2+}$	Ca общий	$PO_4^{3-}$
SBF-контроль (1–5 нед)	$5,46 \pm 0,05$	$151,80 \pm 1,64$	$7,074 \pm 0,059$	$2,28 \pm 0,12$	$2,39 \pm 0,06$	$0,932 \pm 0,008$
Стальная подложка	$5,38 \pm 0,08$	$149,40 \pm 1,14^*$ $p < 0,03$	$7,102 \pm 0,029$	$2,25 \pm 0,04$	$2,39 \pm 0,02$	$0,928 \pm 0,016$
TiO <sub>2</sub> -покрытие	$5,32 \pm 0,04^*$ $p < 0,01$	$148,80 \pm 0,84^*$ $p < 0,01$	$7,078 \pm 0,019$	$2,22 \pm 0,04$	$2,42 \pm 0,02$	$0,928 \pm 0,008$
Ti–O–N-покрытие при $p(O_2)/p(N_2) = 1/1$	$5,42 \pm 0,04$	$150,40 \pm 1,82$	$7,100 \pm 0,022$	$2,28 \pm 0,03$	$2,45 \pm 0,02$	$0,932 \pm 0,011$
Ti–O–N-покрытие при $p(O_2)/p(N_2) = 1/3$	$5,40 \pm 0,02$	$149,80 \pm 0,84^*$ $p < 0,04$	$7,102 \pm 0,018$	$2,25 \pm 0,03$	$2,45 \pm 0,03$	$0,932 \pm 0,011$

Примечание.  $n$  – число исследованных образцов (проб); \* – статистически значимые различия с TiO<sub>2</sub> покрытием согласно  $U$ -критерию Манна–Уитни.

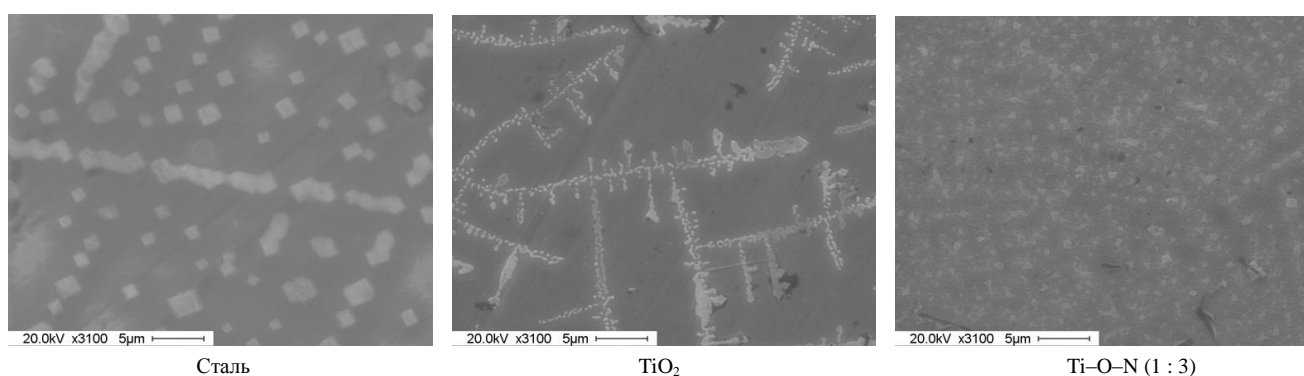


Рис. 2. СЭМ-изображения кристаллов солей на поверхности стали, TiO<sub>2</sub>- и Ti–O–N- (1 : 3) покрытиях после 5-недельного растворения в SBF. Кристаллы черного цвета (инвертированные изображения)

Сканирующая электронная микроскопия образцов после 5 нед в SBF (рис. 2) показало интенсивное образование кубических кристаллов на поверхности стали (до 15–18% зоны интереса). Для образцов с покрытиями площадь кристаллообразования достигала 7–11%. С увеличением содержания азота в атмосфере до 75% ( $p(O_2)/p(N_2) = 1/3$ ) кристаллы на Ti–O–N-покрытии (рис. 2) более мелкие и не формируют крупных кластеров.

EDX-анализ Ti–O–N-пленки ( $p(O_2)/p(N_2) = 1/3$ ) покрытия после 5-недельного растворения в SBF позволил сделать качественную оценку элементов, находящихся на поверхности образца. Помимо элементов исследуемого покрытия (Ti, O, N) в спектре появились пики Na и Cl. Другие элементы (K, Mg, Ca), имеющие в растворе SBF меньшую концентрацию, присутствовали в осадке в следовых количествах.

Согласно полученным результатам, в условиях длительного контакта с синтетической биологической жидкостью (моделирование перимплантационного отека) на тестируемых образцах формируется двойной электрический слой. С одной стороны, наблюдается корро-

зия стали и растворение тонких пленок оксида и оксинитридов титана (см. табл. 6), что сопровождается уменьшением содержания азота в покрытиях с 5–6 ат. % (см. табл. 1) до 0,15 ат. % (рис. 3). С другой стороны, имеет место обратное отложение натрия и хлора на образцы с образованием кристаллов хлорида натрия. Процесс преципитации солей из раствора значительно преобладает над растворением образцов, поскольку увеличиваются масса образцов (см. табл. 3) и толщина покрытий (см. табл. 5). Следует подчеркнуть большую прибавку толщины TiO<sub>2</sub>-покрытия в сравнении с Ti–O–N-пленками (табл. 5), что подтверждает данные табл. 3.



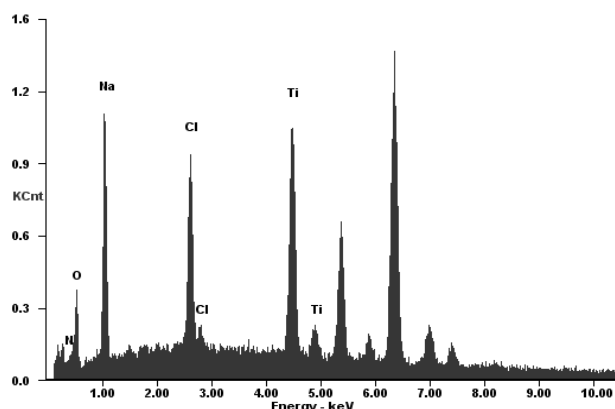


Рис. 3. EDX-спектр покрытия Ti–O–N после 5 нед растворения в SBF. По оси ординат – атомные %

Положительным моментом является отсутствие кальцификации тестируемых искусственных поверхностей при длительном нахождении в SBF-растворе, что предполагает минимальный риск быстрого образования тромбов и потери функциональных свойств стентов. Тем не менее минерализация образцов значительно меняет их физико-химические свойства, обуславливающие их био- и гемосовместимость: способствует значительному увеличению шероховатости поверхности, снижению амплитуды или даже реверсии отрицательного потенциала поверхности, резкому повышению гидрофильности поверхности (см. табл. 5). При этом исходная (до контакта с SBF) поверхность практически всех образцов (за исключением стали) гидрофобна.

Покрyтия из оксида титана снижают риск негативных реакций компонентов крови на металлическую подложку [6]. Но точные параметры, определяющие гемо- и биосовместимость материалов в ряду известных физико-химических характеристик твердого тела, тем более идеальный материал для стентирования до сих пор не найдены [10, 21].

## Заключение

Проведенные нами тесты показывают значительное модифицирующее влияние модельной биологической жидкости на поверхностные индексы твердых тел и покрытий (см. табл. 5), реализуемое, по-видимому, через формирование двойного электрического слоя. С позиций существующих литературных данных, длительный контакт всех образцов с SBF явно ухудшает их гемосовместимость и усиливает реакцию фибробластов (табл. 8), во многом выравнивая критические физико-химические особенности поверхности стали и покрытий из оксида и оксинитридов титана (см. табл. 5), имеющие значение для контакта с кровью и сосудистой стенкой.

Тем не менее исследователи отмечают тромборезистентность и снижение на 47% гиперплазии неointимы на стентах с окисью нитрида титана по сравнению с «голометаллическими» изделиями из нержавеющей стали медицинского назначения L316 [22]. При этом Ti–O–N-покрытие в большей степени, чем TiO<sub>2</sub>, обладает антикоагуляционной активностью [23].

Потенциальная гемо- и биосовместимость тестируемых материалов после *in vitro* контакта с биологической жидкостью выстраивается следующим образом: Ti–O–N (1/3) > Ti–O–N (1/1), TiO<sub>2</sub> > сталь. Однако интерпретация возможного биологического отклика несколько меняется (см. табл. 7, 8) и может быть объяснена для тонких пленок оксидов и оксинитридов титана: 1) антикоррозионными свойствами (см. табл. 6); 2) сохранением (для Ti–O–N) отрицательного заряда поверхности; 3) возможно, меньшим приростом массы (см. табл. 3) и толщины (см. табл. 5) поверхностного слоя, связанного со скоростью процессов минерализации на межфазной границе раствор/твердое тело.

Таблица 8

Прогноз гемосовместимости и биосовместимости тестируемых образцов после модифицирующего влияния SBF на физико-химические свойства их поверхности			
Материал	Результат после контакта с SBF-раствором	Возможная биологическая реакция	
		Кровь (гемосовместимость)	Стромальные клетки (биосовместимость)
Заряд поверхности			
Сталь	Рост амплитуды положительного заряда поверхности	Снижение гемосовместимости [17]	Усиление адгезии фибробластов [24], снижение распластывания и функциональной активности стромы костного мозга [25]
Оксиды титана	Реверсия отрицательного заряда	Снижение антитромбогенной активности поверхности [7]	
Оксинитриды титана	Реверсия или редукция отрицательного заряда		
Гидрофильность			
Сталь	Повышение	Гидрофильные поверхности способствуют прилипанию моноцитов крови, их дифференцировке в фиброциты [26]	Усиление адгезии и пролиферации фибробластов [27, 28]
Оксиды и оксинит-	Повышение	Ухудшение антикоагуляционных свойств [23]	

риды титана					
Гидрофобность					
Сталь	Снижение	Снижение адсорбции протеинов [29]		Уменьшение площади прилипания фибробластов [30]	
Оксиды и оксинитриды титана	Снижение	Уменьшение адсорбции протеинов и гемостатических свойств [31]			
Рельеф поверхности					
Сталь	Увеличение	Ухудшение гемосовместимости [21], повышенная коагуляции крови [32]		Повышенная <i>in vitro</i> жизнеспособность, адгезия [33] и пролиферация фибробластов [34]	
Оксиды и оксинитриды титана					

Существенные различия в исходной (до контакта с SBF) гидрофильности/гидрофобности поверхности образцов, активно обсуждаемые в литературе, даже на уровне простых модельных экспериментов теряют, на наш взгляд, актуальность вследствие амфифильных свойств биологических жидкостей.

Модифицирующее влияние модельных биологических жидкостей на физико-химические свойства твердых тел (увеличение шероховатости, снижение амплитуды или даже реверсия отрицательного потенциала поверхности, резкое повышение гидрофильности поверхности) следует учитывать при формировании оксинитридных покрытий титана и прогнозирования их оптимальных биологических свойств как материалов для сердечно-сосудистых стентов.

*Авторы выражают благодарность М.А. Сурmeneвой, младшему научному сотруднику кафедры теоретической и экспериментальной физики ТПУ, за приготовление SBF-раствора.*

#### Литература

1. Беленков Ю.И., Самко А.Н., Батыралиев Т.А., Перцуков И.В. Коронарная ангиопластика: взгляд через 30 лет // Кардиология. 2007. № 9. С. 4–14.
2. Holmes J. State of the art in coronary intervention // Am. J. Cardiol. 2003. V. 91. P. 50A–53A.
3. Virmani R., Guagliumi G., Farb A., Musumeci G., Grieco N., Motta T., Mihalek L., Tespili M., Valsecchi O., Kolodgie F.D. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? // Circulation. 2004. V. 109, № 6. P. 701–705.
4. Gamicci G. What is an optimal stent? Biological requirements of drug eluting stents // Kardiovaskulare Medizin. 2008. V. 11. P. 22–25.
5. Karjalainen P.P., Biancari F., Ylitalo A., Raeber L., Billinger M., Hess O., Airaksinen K.E.J. Pooled analysis of trials comparing titanium-nitride-oxide-coated stents with paclitaxel-eluting stents in patients undergoing coronary stenting // J. Invasive Cardiol. 2010. V. 22, № 7. P. 322–326.
6. Nan H., Ping Y., Xuan C., Yongxang L., Xiaolan Z., Guangjun C., Zihong Z., Feng Z., Yuanru C., Xianghuai L., Tingfei X. Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthesized by ion beam enhanced deposition // Biomaterials. 1998. V. 19, № 7–9. P. 771–776.
7. Wan G., Lv B., Jin G., Maiz M.F., Zhou J., Huang N. Direct correlation of electrochemical behaviors with anti-thrombogenicity of semiconducting titanium oxide films // J. Biomater. Appl. 2014. V. 28, № 5. P. 719–728. doi: 10.1177/0885328213476911.

8. Subramanian B., Muraleedharan C.V., Ananthakumar R., Jayachandran M. A comparative study of titanium nitride (TiN), titanium oxynitride (TiON) and titanium aluminum nitride (TiAlN), as surface coatings for bio implants // Surf. Coat. Technol. 2011. V. 205. P. 5014–5020.
9. Barybin A.A., Zav'yalov A.V., Shapovalov V.I. A nonisothermal physicochemical model of synthesis of oxynitrides by reactive sputtering techniques // Glass Physics and Chemistry. 2012. V. 38, № 4. P. 396–401.
10. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine / ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 851 p.
11. Andrade J.D., Gregonis D.E., Smith L.M. Polymer–water interface dynamics // Physicochemical aspects of polymer surfaces / ed. K.L. Mittal. N. Y.: Plenum Press, 1981. P. 911–922.
12. Khlusov I.A., Khlusova M.Yu., Pichugin V.F., Sharkeev Yu.P., Legostaeva Ye.V. Artificial niches for stromal stem cells as a potential instrument for the design of the surface of biomimetic osteogenic materials // Russian Physics Journal. 2014. V. 56, № 10. P. 1206–1211.
13. Bykova Yu., Weinhardt V., Kashkarova A., Lebedev S., Baumbach T., Pichugin V., Zaitsev K., Khlusov I. Physical properties and biocompatibility of UHMWPE-derived materials modified by synchrotron radiation // J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2014. V. 25, № 8. P. 1843–1852. doi: 10.1007/s10856-014-5222-4.
14. Yaroshchuk A., Luxbacher T. Interpretation of electrokinetic measurements with porous films: role of electric conductance and streaming current within porous structure // Langmuir. 2010. V. 26, № 13. P. 10882–10889.
15. Dorozhkin S.V., Dorozhkina E.I., Eppl M. A model system to provide a good in vitro simulation of biological mineralization // Crystal Growth & Design. 2004. V. 4, № 2. P. 389–395.
16. Trace Elements and Nanoparticles / I.A. Khlusov, G.B. Slepchenko, G.T. Dambaev, L.V. Zagrebina, S.S. Shestov, S.A. Antipov, T. A. Feduschak, M.Yu. Khlusova, O.V. Kokorev, A.Ye. Yermakov, M.A. Uymin, A.M. Nekrasova. N. Y.: Nova Science Publishers Inc., 2011. 93 p.
17. Сосудистое и внутриорганное стентирование: руководство / под ред. Л.С. Кокова и др. М.: Изд. дом «ГРААЛЬ», 2003. 384 с.
18. Cai K., Frant M., Bossert J., Hildebrand G., Liefelth K., Jandt K.D. Surface functionalized titanium thin films: zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2006. V. 50. P. 1–8.
19. Hallab N., Merritt K., Jacobs J.J. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants // J. Bone Joint Surg. Am. 2001. V. 83A, № 3. P. 428–436.
20. Hubler R., Cozza A., Marcondes T.L., Souza R.B., Fiori F.F. Wear and corrosion protection of 316-L femoral implants by deposition of thin films // Surf. Coat. Technol. 2001. V. 1078. P. 142–144.
21. Mani G., Feldman M.D., Patel D., Agrawal C.M. Coronary

- stents: A materials perspective // *Biomaterials*. 2007. V. 28. P. 1689–1710.
22. *Windecker S., Mayer I., De Pasquale G., Maier W., Dirsch O., De Groot P., Wu Y.P., Noll G., Leskosek B., Meier B., Hess O.M.* Stent coating with titanium-nitride-oxide for reduction of neointimal hyperplasia // *Circulation*. 2001. V. 104. P. 928–933.
23. *Yi X., Nan H., Hong S.* Blood Compatibility of Titanium Oxide Films Modified by Hydrogen Plasma Reduction // *Journal of Inorganic Materials*. 2008. V. 23, № 6. P. 1246–1252.
24. *Hamdan M., Blanco L., Khraisat A., Tresguerres I.F.* Influence of titanium surface charge on fibroblast adhesion // *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2006. V. 8, № 1. P. 32–38.
25. *Qiu Q., Sayer M., Kawaja M., Shen X., Davies J.E.* Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. V. 42, № 1. P. 117–127.
26. *Pilling D., Vakil V., Gomer R.H.* Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes // *J. Immunol. Methods*. 2009. V. 351, № 1–2. P. 62–70.
27. *Webb K., Hlady V., Tresco P.* Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeleton organization // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. V. 41. P. 422–430.
28. *Kovacs P., Davidson G.A.* Medical Applications of Titanium and its Alloys: The Material and Biological Issues. ASTM STP 1272 / ed. S.A. Brown and J.E. Lemons. Am. Society for Testing and Materials, 1996. P. 163–178.
29. *Prime K.L., Whitesides G.M.* Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): A model system using self-assembled monolayers // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 10714–10721.
30. *Ruardy T.G., Schakenraad J.M., Van der Mei H.C., Busscher H.J.* Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surfaces // *J. Biomed. Mater. Res.* 1995. V. 29. P. 1415–1423.
31. *Hyde G.K., Stewart S.M., Scarel G., Parsons G.N., Shih C.C., Shih C.M., Lin S.J., Su Y.Y., Monteiro-Riviere N.A., Narayan R.J.* Atomic layer deposition of titanium dioxide on cellulose acetate for enhanced hemostasis // *Biotechnol. J.* 2011. V. 6, № 2. P. 213–223. doi: 10.1002/biot.20100034.
32. *Yang W.E., Hsu M.L., Lin M.C., Chen Z.H., Chen L.K., Huang H.H.* Nano/submicron-scale TiO<sub>2</sub> network on titanium surface for dental implant application // *J. Alloys. Compd.* 2009. V. 479, № 1–2. P. 642–647.
33. *Demetrescu I., Pirvu C., Mitran V.* Effect of nanotopographical features of Ti/TiO(2) electrode surface on cell response and electrochemical stability in artificial saliva // *Bioelectrochemistry*. 2010. V. 79, № 1. P. 122–129. doi: 10.1016/j.bioelechem.2010.02.001.
34. *Ponsonnet L., Reybier K., Jaffrezic N., Comte F., Lagneau C., Lissac M., Martelet C.* Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour // *Materials Science and Engineering C*. 2003. V. 23. P. 551–560.

Поступила в редакцию 13.01.2015 г.

Утверждена к печати 15.04.2015 г.

**Хлусов Игорь Альбертович** (✉) – д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ; профессор кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Пичугин Владимир Федорович** – д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Пустовалова Алла Александровна** – аспирант, инженер кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Конищев Максим Евгеньевич** – ассистент кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Дзюман Анна Николаевна** – канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

**Эппле Матиас** – профессор, директор Института неорганической химии, университет Дуйсбург-Эссен (Эссен, Германия).

**Ульбрихт Матиас** – профессор, директор Института технической химии II, университет Дуйсбург-Эссен (Эссен, Германия).

**Чичинскас Эдуардас** – студент 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

**Гулая Валерия Сергеевна** – студентка 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

**Вихарева Валерия Владимировна** – студентка 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

✉ **Хлусов Игорь Альбертович**, тел./факс 8 (3822) 42-64-43; e-mail: khlusov63@mail.ru

## ELECTROKINETIC PROPERTIES, *IN VITRO* DISSOLUTION, AND PROSPECTIVE HEMO- AND BIOCOMPATIBILITY OF TITANIUM OXIDE AND OXYNITRIDE FILMS FOR CARDIOVASCULAR STENTS

Khlusov I.A.<sup>1,2</sup>, Pichugin V.F.<sup>2</sup>, Pustovalova A.A.<sup>2</sup>, Konischev M.E.<sup>2</sup>, Dzyuman A.N.<sup>1</sup>, Eppe M.<sup>3</sup>, Ulbricht M.<sup>3</sup>, Cicinskas E.<sup>1</sup>, Gulaya V.S.<sup>1</sup>, Vikhareva V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Duisburg-Essen University, Essen, Germany

### ABSTRACT

A state of titanium oxide and oxynitride coatings on L316 steel has been studied before and after their contact with model biological fluids. Electrokinetic investigation in 1 mmol potassium chloride showed significant (more than 10 times) fall of magnitude of electrostatic potential of thin (200–300 nm) titanium films at pH changing in the range of 5–9 units during 2 h. Nevertheless, zeta-potential of all samples had negative charge under pH > 6.5. Long-term (5 weeks) contact of samples with simulated body fluid (SBF) promoted steel corrosion and titanium oxide and oxynitride films dissolution. On the other hand, sodium and chloride ions precipitation and sodium chloride crystals formation occurred on the samples. Of positive fact is an absence of calcification of tested artificial surfaces in conditions of long-term being in SBF solution. It is supposed decreasing hazard of fast thrombosis and loss of materials functional properties. According to *in vitro* experiment conducted, prospective biocompatibility of materials tested before and after their contact with SBF lines up following manner: Ti–O–N (1/3) > Ti–O–N (1/1), TiO<sub>2</sub> > Steel. It may be explained by: 1) the corrosion-preventive properties of thin titanium oxide and oxynitride films; 2) a store of surface negative charge for Ti–O–N (1/3) film; 3) minor augmentation of mass and thickness of titanium films connected with speed of mineralization processes on the interface of solution/solid body. At the same time, initial (before SBF contact) differences of samples wettability became equal. Modifying effect of model biological fluids on physicochemical characteristics of materials tested (roughness enhancement, a reduction or reversion of surface negative potential, sharp augmentation of surface hydrophilicity) should took into account under titanium oxide and oxynitride films formation and a forecast of their optimal biological properties as the materials for cardiovascular stents.

**KEY WORDS:** magnetron sputtering, steel surface, zeta-potential, electrostatic potential, roughness, coating mass and thickness, wettability.

*Bulletin of Siberian Medicine*, 2015, vol. 14, no. 2, pp. 55–66

### References

1. Belenkov Yu.I., Samko A.N., Batyraliev T.A., Pershukov I.V. Koronarnaya angioplastika: vzglyad cherez 30 let [Coronary angioplasty: a view through 30 years]. *Kardiologia – Cardiology*, 2007, no. 4, pp. 4–14.
2. Holmes J. State of the art in coronary intervention. *Am. J. Cardiol.*, 2003, vol. 91, pp. 50A–53A.
3. Virmani R., Guagliumi G., Farb A., Musumeci G., Grieco N., Motta T., Mihalsik L., Tsepili M., Valsecchi O., Kolodgie F.D. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation*, 2004, vol. 109, no. 6, pp. 701–705.
4. Gamicci G. What is an optimal stent? Biological requirements of drug eluting stents. *Kardiovaskulare Medizin*, 2008, vol. 11, pp. 22–25.
5. Karjalainen P.P., Biancari F., Ylitalo A., Raeber L., Billinger M., Hess O., Airaksinen K.E.J. Pooled analysis of trials comparing titanium-nitride-oxide-coated stents with paclitaxel-eluting stents in patients undergoing coronary stenting. *J. Invasive Cardiol.*, 2010, vol. 22, no. 7, pp. 322–326.
6. Nan H., Ping Y., Xuan C., Yongxang L., Xiaolan Z., Guangjun C., Zihong Z., Feng Z., Yuanru C., Xianghuai L., Tingfei X. Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthesized by ion beam enhanced deposition. *Bio-materials*, 1998, vol. 19, no. 7–9, pp. 771–776.
7. Wan G., Lv B., Jin G., Maitz M.F., Zhou J., Huang N. Direct correlation of electrochemical behaviors with anti-thrombogenicity of semiconducting titanium oxide films. *J. Biomater. Appl.*, 2014, vol. 28, no. 5, pp. 719–728. doi: 10.1177/0885328213476911.
8. Subramanian B., Muraleedharan C.V., Ananthakumar R., Jayachandran M. A comparative study of titanium nitride (TiN), titanium oxynitride (TiON) and titanium aluminum nitride (TiAlN), as surface coatings for bio implants. *Surf. Coat. Technol.*, 2011, vol. 205, pp. 5014–5020.
9. Barybin A.A., Zav'yalov A.V., Shapovalov V.I. A nonisothermal physicochemical model of synthesis of oxynitrides by reactive sputtering techniques. *Glass Physics and*

- Chemistry*, 2012, vol. 38, no. 4, pp. 396–401.
10. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, Elsevier Academic Press, 2004. 851 p.
  11. Andrade J.D., Gregonis D.E., Smith L.M., ed. Mittal K.L. Polymer–water interface dynamics. *Physicochemical aspects of polymer surfaces*. N. Y., Plenum Press, 1981. P. 911–922.
  12. Khlusov I.A., Khlusova M.Yu., Pichugin V.F., Sharkeev Yu.P., Legostaeva Ye.V. Artificial niches for stromal stem cells as a potential instrument for the design of the surface of biomimetic osteogenic materials. *Russian Physics Journal*, 2014, vol. 56, no. 10, pp. 1206–1211.
  13. Bykova Yu., Weinhardt V., Kashkarova A., Lebedev S., Baumbach T., Pichugin V., Zaitsev K., Khlusov I. Physical properties and biocompatibility of UHMWPE-derived materials modified by synchrotron radiation. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2014, vol. 25, no. 8, pp. 1843–1852. doi: 10.1007/s10856-014-5222-4.
  14. Yaroshchuk A., Luxbacher T. Interpretation of electrokinetic measurements with porous films: role of electric conductance and streaming current within porous structure. *Langmuir*, 2010, vol. 26, no. 13, pp. 10882–10889.
  15. Dorozhkin S.V., Dorozhkina E.I., Epple M. A model system to provide a good in vitro simulation of biological mineralization. *Crystal Growth & Design*, 2004, vol. 4, no. 2, pp. 389–395.
  16. Khlusov I.A., Slepchenko G.B., Dambaev G.T., Zagrebina L.V., Shestov S.S., Antipov S.A., Feduschak T.A., Khlusova M.Yu., Kokorev O.V., Yermakov A.Ye., Uymin M.A., Nekrasova A.M. *Trace Elements and Nanoparticles*. N. Y., Nova Science Publishers Inc., 2011. 93 p.
  17. *Sosudistoe i vnutriorgannoe stentirovanie. Rukovodstvo [Vessel and intraorgan stenting. Guidebook]*. Kokov L.S. (ed.) et al. Moscow, Publishing house GRAAL Publ., 2003. 384 p.
  18. Cai K., Frant M., Bossert J., Hildebrand G., Liefelth K., Jandt K.D. Surface functionalized titanium thin films: zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, vol. 50, pp. 1–8.
  19. Hallab N., Merritt K., Jacobs J.J. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2001, vol. 83A, no. 3, pp. 428–436.
  20. Hubler R., Cozza A., Marcondes T.L., Souza R.B., Fiori F.F. Wear and corrosion protection of 316-L femoral implants by deposition of thin films. *Surf. Coat. Technol.*, 2001, vol. 1078, pp. 142–144.
  21. Mani G., Feldman M.D., Patel D., Agrawal C.M. Coronary stents: A materials perspective. *Biomaterials*, 2007, vol. 28, pp. 1689–1710.
  22. Windecker S., Mayer I., De Pasquale G., Maier W., Dirsch O., De Groot P., Wu Y.P., Noll G., Leskosek B., Meier B., Hess O.M. Stent coating with titanium-nitride-oxide for reduction of neointimal hyperplasia. *Circulation*, 2001, vol. 104, pp. 928–933.
  23. Yi X., Nan H., Hong S. Blood Compatibility of Titanium Oxide Films Modified by Hydrogen Plasma Reduction. *Journal of Inorganic Materials*, 2008, vol. 23, no. 6, pp. 1246–1252.
  24. Hamdan M., Blanco L., Khraisat A., Tresguerres I.F. Influence of titanium surface charge on fibroblast adhesion. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.*, 2006, vol. 8, no. 1, pp. 32–38.
  25. Qiu Q., Sayer M., Kawaja M., Shen X., Davies J.E. Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, vol. 42, no. 1, pp. 117–127.
  26. Pilling D., Vakil V., Gomer R.H. Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes. *J. Immunol. Methods*, 2009, vol. 351, no. 1–2, pp. 62–70.
  27. Webb K., Hlady V., Tresco P. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeleton organization. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998. V. 41. P. 422–430.
  28. Kovacs P., Davidson G.A., eds. Brown S.A. and Lemons J.E. Medical Applications of Titanium and its Alloys: The Material and Biological Issues. ASTM STP 1272. *Am. Society for Testing and Materials*, 1996. P. 163–178.
  29. Prime K.L., Whitesides G.M. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): A model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, pp. 10714–10721.
  30. Ruardy T.G., Schakenraad J.M., Van der Mei H.C., Busscher H.J. Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995, vol. 29, pp. 1415–1423.
  31. Hyde G.K., Stewart S.M., Scarel G., Parsons G.N., Shih C.C., Shih C.M., Lin S.J., Su Y.Y., Monteiro-Riviere N.A., Narayan R.J. Atomic layer deposition of titanium dioxide on cellulose acetate for enhanced hemostasis. *Biotechnol. J.*, 2011, vol. 6, no. 2, pp. 213–223. doi: 10.1002/biot.20100034.
  32. Yang W.E., Hsu M.L., Lin M.C., Chen Z.H., Chen L.K., Huang H.H. Nano/submicron-scale TiO<sub>2</sub> network on titanium surface for dental implant application. *J. Alloys. Compd.*, 2009, vol. 479, no. 1–2, pp. 642–647.
  33. Demetrescu I., Pirvu C., Mitran V. Effect of nanotopographical features of Ti/TiO<sub>2</sub> electrode surface on cell response and electrochemical stability in artificial saliva. *Bioelectrochemistry*, 2010, vol. 79, no. 1, pp. 122–129. doi: 10.1016/j.bioelechem.2010.02.001.
  34. Ponsonnet L., Reybier K., Jaffrezic N., Comte F., Lagneau C., Lissac M., Martelet C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering C*, 2003, vol. 23, pp. 551–560.

**Khlusov Igor A.** (✉), Siberian State Medical University, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Pichugin Vladimir F.**, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Pustovalova Alla A.**, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Konishchev Maksim Ye.**, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Dzyuman Anna N.**, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Epple Matthias**, Institute of Inorganic Chemistry, Duisburg-Essen University, Germany.

**Ulbricht Matthias**, Institute of Technical Chemistry II, Duisburg-Essen University, Germany.

**Cicinskas Eduardas**, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Gulaya Valeriya S.**, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Vikhareva Valeriya V.**, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Khlusov Igor A.**, Ph./Fax +7 (3822) 42-64-43; e-mail: khlusov63@mail.ru