



АВТОМАТТАНДЫРУ ЖӘНЕ БАСҚАРУ
АВТОМАТИЗАЦИЯ И УПРАВЛЕНИЕ
AUTOMATION AND CONTROL

DOI 10.51885/1561-4212_2022_3_40
MPHTI 50.47; 55.30.51; 76.09

**Б.Н. Азаматов¹, Д.Л. Алонцева¹, А.А. Борисов¹, Б. Маратулы¹, В.Б. Огай²,
А.А. Курманбаев²**

¹Восточно-Казахстанский технический университет им. Д. Серикбаева, г. Усть-Каменогорск, Казахстан

E-mail: azamatovy@mail.ru*

E-mail: dalontseva@ektu.kz

E-mail: borisov_alexander@mail.ru

E-mail: maratuly_b@ukk.nis.edu.kz

²Национальный центр биотехнологии, г. Нур-Султан, Казахстан

E-mail: ogay@biocenter.kz

E-mail: kurmanbayev@biocenter.kz

**МАГНЕТРОННОЕ НАПЫЛЕНИЕ НА ПОДЛОЖКИ ИЗ ТИТАНОВОГО СПЛАВА
МЕДНЫХ ПЛЕНОК С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ ПО ОТНОШЕНИЮ
К ПСЕВДОМОНАДАМ И СТАФИЛОКОККУ ПСЕВДОМОН ЖӘНЕ СТАФИЛОКОКК**

**БАКТЕРИЯЛАРЫНА ҚАТЫСТЫ
ТИТАН ҚОРЫТПАСЫНАН ЖАСАЛҒАН НЕГІЗГЕ БАКТЕРИЦИДТІК ҚАСИЕТТЕРІ БАР
МЫС ПЛЕНКАЛАРЫН МАГНЕТРОНДЫ ТОЗАҢДАТУ**

**MAGNETRON SPUTTERING ON TITANIUM ALLOY SUBSTRATES
OF COPPER FILMS WITH ANTIBACTERIAL PROPERTIES AGAINST PSEUDOMONAS
AND STAPHYLOCOCCUS**

Аннотация. Для приготовления покрытий использовалось магнетронное напыление постоянного тока. Режимы напыления подбирались с целью получить Cu-покрытия разной толщины и Cu-Ti пленку определенного состава. Оценку толщины и элементного состава покрытий проводили методом сканирующей электронной микроскопии с энергодисперсионным анализом, концентрацию ионов меди, выделяющихся в течение 1, 2, 3 и 4-х дней из покрытий в физиологическом растворе, определяли методом масс-спектрометрии. Антибактериальную активность образцов в отношении штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* измеряли через 24 часа *in vitro*, определяя зоны ингибирования данных бактерий. Было обнаружено, что бактерицидная активность более тонких Cu-Ti покрытий выше, чем у более толстых покрытий из чистой меди. Наибольшие зоны ингибирования бактерий *P. aeruginosa* (в среднем 28,8 мм) и бактерий *S. aureus* (в среднем 17,5 мм) наблюдались для двухкомпонентного покрытия 98 вес.% Cu и 2 вес.% Ti толщиной 5,5 мкм. Было установлено, что количество ионов меди, выделяющихся из Cu-покрытий, прямо пропорционально толщине покрытия и что высвобождение основного количества ионов меди (до 1530 мкг/л для Cu-Ti пленки) происходит в течение первых суток погружения в физиологический раствор. Подобраны режимы магнетронного напыления постоянного тока антибактериальных тонких пленок Cu-Ti на подложки из сплава Ti-6Al-4V. Полученные результаты перспективны для развития технологий получения покрытий для медицинских имплантатов с повышенными бактерицидными и биосовместимыми свойствами поверхности.

Ключевые слова: магнетронное напыление, антибактериальные покрытия, титановые имплантаты

Аңдатпа. Мақалада Ti-6Al-4V титан қорытпасынан жасалған төсемінде әр түрлі қалыңдығы бар Cu-Ti және мыс жабындары үшін *Staphylococcus aureus* пен *Pseudomonas aeruginosa* бактерияларына қатысты бактерицидтік қасиеттер мен босатылатын мыс иондардың сандық бағасы берілген. Әртүрлі қалыңдықтағы Cu жабындарын және белгілі бір құрамдағы Cu-Ti пленкаларын алу үшін әртүрлі режимдерді таңдап, тұрақты токтың магнетронды шашырауы қолданылды. Жабындардың қалыңдығы мен элементтік құрамын бағалау үшін энергия дисперсиялық талдаумен сканерлейтін электронды микроскопия әдісі қолданылды. Физиологиялық ерітіндідегі жабындардан 1, 2, 3 және 4 күн ішінде бөлінетін мыс иондарының концентрациясы масс-спектрометрия әдісімен анықталды. *P. aeruginosa* және *S. aureus* штаммдарына қатысты үлгілердің бактерияға қарсы белсенділігі *in vitro* 24 сағаттан кейін өлшеніп, осы бактериялардың ингибирлеу аймақтарын анықтадық. Жұқа Cu-Ti жабындарының бактерицидтік белсенділігі таза мыстан жасалған қалың жабындарға қарағанда жоғары екендігі анықталды. *P. aeruginosa* бактерияларының (орта есеппен 28,8 мм) және *S. aureus* бактерияларының (орта есеппен 17,5 мм) ең үлкен ингибирлеу аймақтары екі компонентті жабын үшін байқалды 98 салмақтағы.% Cu және 2 салмақтағы.% Ti қалыңдығы 5,5 мкм. Cu жабындыларынан бөлінетін мыс иондарының мөлшері жабынның қалыңдығына тура пропорционал екендігі және мыс иондарының негізгі мөлшерінің шығарылуы (Cu-Ti пленкасы үшін 1530 мкг/л дейін) тұзды ерітіндіге батырудың алғашқы күнінде болатындығы анықталды. Ti-6Al-4V қорытпасынан жасалған субстратта Cu-Ti бактерияға қарсы жұқа қабықшаларының тұрақты ток магнетронды тозаңдату режимдері таңдалған. Алынған нәтижелер жоғары бактерицидтік және биосәйкес беттік қасиеттері бар медициналық импланттарға арналған жабындарды алу технологияларын дамыту үшін келешегі зор.

Түйін сөздер: магнетронды тозаңдату, бактерияға қарсы жабындар, титан импланттары.

Abstract. The article presents a quantitative assessment of the released copper ions and bactericidal properties in relation to *Staphylococcus aureus* bacteria and *Pseudomonas aeruginosa* pseudomonads for copper coatings of different thicknesses and Cu-Ti films on Ti-6Al-4V titanium alloy substrates. To obtain coatings, DC magnetron sputtering was used and its parameters were selected in order to obtain Cu-coatings of different thicknesses and a Cu-Ti film of a certain composition. The thickness and elemental composition of the coatings were assessed by scanning electron microscopy with EDX, the concentration of copper ions released during 1, 2, 3 and 4 days from Cu films in saline was determined by mass spectrometry. It has been found that the antibacterial activity of thinner Cu-Ti coatings is higher than that of thicker pure copper coatings. The largest zones of inhibition of *P. aeruginosa* bacteria (average 28.8 mm) and bacteria *S. aureus* (average 17.5 mm) were observed for a two-component coating of 98 wt.% Cu and 2 wt.% Ti with a thickness of 5.5 μm . It was found that the amount of copper ions released from Cu-coatings is directly proportional to the thickness of the coating and that the release of the main amount of copper ions (up to 1530 $\mu\text{g/l}$, for Cu-Ti film) occurs during the first day of immersion in saline. The parameters of magnetron sputtering of antibacterial Cu-Ti thin films on Ti-6Al-4V alloy substrates were selected. The results are promising for the development of manufacturing technologies for medical implant coatings with increased bactericidal and biocompatible surface properties.

Keywords: magnetron sputtering, antibacterial coatings, titanium implants.

Введение. В настоящее время во всем мире активно развиваются технологии производства ортопедических и дентальных медицинских имплантатов с модифицированными поверхностями, чтобы ускорить выздоровление пациентов после операции, снизить риск послеоперационных осложнений, связанных с отторжением имплантата, и обеспечить длительный срок службы имплантата [1-3]. Модификация поверхности имплантата (травление, микродуговое окисление, нанесение тонких пленок или покрытий из биосовместимых или бактерицидных материалов и т. д.) может улучшить не только механические свойства поверхности имплантата и его стойкость к коррозии, но также повысить его биологическую активность и остеокондуктивность на клеточном уровне, а также повысить антибактериальные свойства поверхности имплантата. Используются различные комбинации различных материалов и способов нанесения покрытий для достижения оптимальных для конкретного имплантата химических и физических свойств

поверхности. В этом случае проблемой остается выбор материалов и композиции покрытия и способа его нанесения, чтобы получить покрытие с желаемой микроструктурой и свойствами.

Наиболее часто ортопедические и дентальные имплантаты изготавливаются из титановых сплавов [4], при этом сплав Ti-6Al-4V является одним из основных сплавов для практического использования. Так, Ti-6Al-4V сплав используется для изготовления костных имплантатов (протезов бедра, коленей, локтей и т.д.), зубных имплантатов и хирургических винтов [4-6]. Основные причины, которые привлекли производителей имплантатов к использованию Ti-6Al-4V сплава – это его биосовместимость с тканями человека (бионейтральность), наличие низкого модуля упругости (от 55 до 85 ГПа), близкого к модулю упругости костных тканей (от 20 до 30 ГПа), высокая коррозионная стойкость и способность к остеоинтеграции [7]. Считается, что остеоинтеграция происходит, когда между живой костью и металлом возникает прямой контакт в так называемой межфазной зоне. Межфазная зона, представляющая собой тонкую область (20...50 нм) между имплантатом из титанового сплава и живой костью, имеет решающее значение для развития остеоинтеграции, при этом первым этапом является отложение белков из плазмы крови на поверхностном оксидном слое. За этим следует формирование фибринового матрикса – структуры, которая действует как каркас для остеобластов (костеобразующих клеток) [8]. Поддерживаемые таким образом остеобласты формируют кость, которая расширяется, заполняя межфазную область так, что она растет вплотную к поверхности имплантата, вызывая остеоинтеграцию имплантата. Важным эффектом правильной остеоинтеграции является то, что имплантат надежно фиксируется в кости [7, 8]. Однако белковый слой, который первоначально формируется на Ti имплантатах после имплантации как часть связанных с имплантацией реакций хозяина, делает поверхность имплантата восприимчивой к бактериальной колонизации и образованию бактериальных биопленок [9].

К образованию устойчивых биопленок, которые трудно устранить с помощью обычных антибиотиков, как правило, приводят бактериальные инфекции, вызванные грамположительными видами *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* [9, 10]. Такие перипротезные бактериальные инфекции являются одним из наиболее частых осложнений после замены суставов Ti имплантатами и могут усугубить воспалительную реакцию, вызванную имплантатом, привести к серьезным осложнениям, требующим увеличения дозировки антибиотиков или проведения повторной операции, то есть наносят вред пациентам и создают нагрузку на системы здравоохранения во всем мире [9, 10]. При том, что ежегодно во всем мире выполняется более 1,5 миллиона замен первичных суставов [4], несмотря на антисептические меры и профилактику антибиотиками после операции, эти инфекции могут возникать у до 2 % пациентов после первичной тотальной замены тазобедренного сустава, у до 4 % пациентов после первичной тотальной замены коленного сустава и в еще большей степени после повторного (ревизионного) эндопротезирования [4, 6]. Кроме того, современное лечение перипротезной инфекции, такое как извлечение и тщательная очистка имплантатов, плюс системное введение высоких доз антибиотиков, может приводить к побочным заболеваниям, не гарантируя излечения [9, 10]. Антибактериальные поверхности способны уменьшить количество бактерий, задерживаемых на поверхности (например, за счет подходящей топологии поверхности), или уменьшить их рост и размножение на поверхности. [11], но самым эффективным способом борьбы с перипротезными бактериальными инфекциями при одновременном сохранении биосовместимости и способности к остеоинтеграции Ti имплантата может быть препятствование

формированию бактериальных биопленок на его поверхности.

Биопленки образуются, когда бактерии прикрепляются к поверхностям и выделяют внеклеточный полимерный матрикс, поэтому адгезия бактерий – это первый и самый важный шаг в этом процессе. Как только бактерии закрепляются на поверхности имплантата, они образуют биопленку и таким образом закрывают доступ к поверхности имплантата как со стороны иммунной системы хозяина, так и со стороны антибиотикотерапии, что способствует сохранению инфекции. Вышеупомянутый *Staphylococcus epidermidis* обладает сильной способностью образовывать прилипшие биопленки на искусственных поверхностях, таких как протезы суставов [12, 13].

В настоящее время развиваются исследования по приданию ортопедическим устройствам антибактериальных свойств путем покрытия их металлическими частицами (ионами меди, серебра, цинка, кобальта, алюминия и ртути), антибиотиками или антибактериальными растворами, а также антибактериальными биоактивными полимерами [11-19]. Наибольшие вызовы для внедрения этих технологий представляют цитотоксичность, плохая адгезия и неоднородность микроструктуры таких покрытий, а также сложность методов покрытия. Среди металлов с антибактериальными свойствами медь продемонстрировала превосходные антибактериальные свойства *in vitro* при сохранении приемлемого профиля цитотоксичности. Как отмечено авторами [12, 13], медь обладает меньшей токсичностью и более высокой цитосовместимостью по сравнению с другими металлами. Кроме того, медь метаболизируется и не накапливается в организме человека. Тонкая пленка, содержащая медь, может предотвратить раннее образование биопленки на поверхности имплантата и не допустить развития перипротезной инфекции, к тому же медь является относительно недорогим (например, по сравнению с серебром) материалом с отличной проводимостью, что облегчает различные способы ее нанесения на поверхность имплантата (например, электролитическое осаждение) и снижает стоимость технологии в целом. Было обнаружено [14], что осаждение меди (Cu) на поверхности Ti приводит к образованию пленок с антибактериальными свойствами, что было продемонстрировано, в частности, уменьшением количества планктонных и прилипших бактерий *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus*.

Авторы данного исследования развивают технологию производства титановых имплантатов – эндопротезов с многослойными покрытиями из биосовместимых материалов, таких как гидроксипатит, титан, цирконий, тантал, нанесенными на поверхность имплантата микроплазменным напылением [15-18]. Метод микроплазменного напыления позволяет получить толстые (от 100 мкм до 700 мкм) покрытия с контролируемой путем обоснованного подбора параметров напыления пористостью слоев и шероховатостью поверхности. Основной идеей данного исследования было магнетронное напыление тонких Cu или Cu-Ti пленок на поверхность титановых имплантатов с биосовместимыми микроплазменными покрытиями, чтобы обеспечить имплантатам защиту от роста бактериальных тонких пленок. Однако, несмотря на большое количество исследований тонкопленочных медных покрытий и методов их нанесения, нет полной ясности с желаемым количеством освобождаемой меди. Все исследователи отмечают, что свойства медного покрытия сильно зависят от состояния поверхности титановой подложки, от количества меди в покрытии и от способа нанесения покрытия, из которых самым распространенным является магнетронное напыление [19-23]. Авторы исследований [19-23] показали, что полученные методами магнетронного напыления, обычно с использованием импульсного магнетронного распыления, двухкомпонентные тонкие пленки Cu-Ti показывают явно выраженную антимикробную активность (для E.

coli и *S. aureus*), но их активность и цитотоксичность связаны с содержанием Cu в пленке, причем оптимальное содержание Cu в покрытии указывается разными авторами по-разному, варьируясь в очень широких пределах от 20 вес. % Cu и до 80 вес. % Cu. Представляется целесообразным сравнить антибактериальные свойства покрытий из чистой меди и с небольшим содержанием титана.

Целью данного исследования была оценка количества освобождающейся меди и антибактериальных свойств по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* (in vitro) для медных покрытий разной толщины и для Cu-Ti пленки состава 98 вес. % Cu и 2 вес. % Ti на подложках из титанового сплава, чтобы подобрать оптимальные режимы получения данных покрытий способом магнетронного напыления постоянного тока.

Материалы и методы исследования. Магнетронное напыление меди на диски из титанового сплава осуществляли на установке EPOS-PVD-440 (Beams&Plasmas, Россия), снабжённой тремя магнетронами постоянного тока (магнетрон-479) и одним ВЧ-магнетроном (13,56 МГц). Напыляемый материал имел форму металлической мишени из чистой меди и титана (472X132X18). Покрытие одновременно напыляли с помощью одного и двух магнетронов постоянного тока. Напыление покрытия Cu-Ti производилось в течение 10 минут с ротацией напыляемой подложки. Для получения медных покрытий разной толщины, чтобы оценить влияние количества меди в покрытии на антибактериальные свойства покрытия, использовали разное время напыления: 55 минут и 400 минут при прочих одинаковых параметрах напыления постоянного тока.

Режимы и условия магнетронного напыления были следующими: в качестве рабочего газа использовался аргон; расход рабочего газа (аргона) составлял 62 мл/мин; базовое давление в камере – $7 \cdot 10^{-6}$ мбар; рабочее давление в камере – $2 \cdot 10^{-3}$ мбар; расстояние от Cu-мишени до Ti подложки – 150 мм; сила разрядного тока – 4,2 А; разрядное напряжение – 310 В.

В качестве подложки использовался титановый сплав Ti-6Al-4V (ГОСТ 26492-85, аналог grade 5, DOT, Rostock, Германия), в виде прутков в состоянии поставки диаметром 10 мм, из которых на станке с числовым программным управлением (ЧПУ) CTX 510 ecoline (DMG MORI AG, Германия) нарезались диски толщиной 2 мм.

Непосредственно перед магнетронным напылением образцы очищали в дистиллированной воде в ультразвуковой ванне Stegler 22DT (Shenzhen Bestman Instrument Co., Ltd., China) в течение 30 минут и сушили на воздухе в течение 40-60 минут, затем подвергали очистке ионным источником ИИ-400 (Beams&Plasmas, Россия), установленным в вакуумной камере магнетронной установки, со следующими параметрами: давление базовое в камере – $7 \cdot 10^{-6}$ мбар; давление рабочее в камере – $1,8 \cdot 10^{-3}$ мбар; расход рабочего газа (аргон) – 124 мл/мин; разрядное напряжение – 280 В, разрядный ток – 1,7 А, расстояние от ионного источника до образца – 150 мм; время обработки – 20 минут, после чего непосредственно проводилось магнетронное напыление.

Исследование микроструктуры и оценку толщины покрытий проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6390LV (JEOL, Япония) с приставкой энергодисперсионного анализа (EDX) INCA. ENERGY (Oxford Instruments, Великобритания).

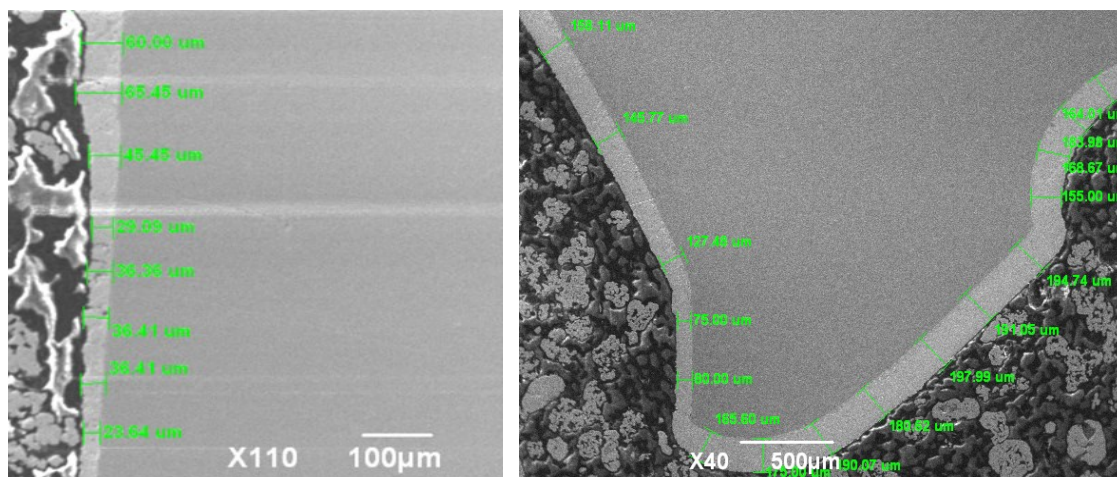
Для in vitro исследования антибактериальных свойств покрытий и поверхности титанового сплава без покрытия были использованы бактериальные культуры *Staphylococcus aureus* (грамположительные) с титром $9,1 \times 10^{10}$ колониеобразующих единиц (КОЕ) на мл и *Pseudomonas aeruginosa* с титром 6×10^7 КОЕ/мл после культивирования в течение 14 часов при температуре $+30 \pm 1$ °С в жидком питательном бульоне, перемешиваемом с частотой 150 об/мин. Биологически нейтральный полипропиленовый (ПП) диск

использовали в качестве контрольного. Перед экспериментом образцы стерилизовали под УФ-лампой. Оптическую плотность выращенных за ночь культур измеряли при оптической плотности 600 нм (ОП600), которая для *Pseudomonas aeruginosa* составила 0,44 ед. и для *Staphylococcus aureus* – 0,47 ед. Приготовленную суспензию бактерий (с оптической плотностью OD 0,44 для *Pseudomonas aeruginosa* и OD 0,47 для *Staphylococcus aureus*) помещали в чашки Петри с питательным агаром, образующим слой толщиной 5 мм, экспонировали с дисками исследуемых материалов и инкубировали в течение 24 ч при температуре $+37\pm 1$ °С. Антибактериальную активность образцов в отношении штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* определяли через 24 часа по зоне подавления роста тест-культур в миллиметрах. Результаты представляют собой среднее значение 4-х независимых серий измерений (разница между ними менее 2-3 %).

Концентрация меди, выделяющейся из Cu-пленок, нанесенных на подложки Ti-6Al-4V, измерялась при помощи масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой ICP-MS Agilent 7500cx (Agilent Technologies, США). Образцы погружали в среду физиологического раствора 0,9 % хлорида натрия (NaCl). Концентрацию ионов Cu^{2+} (мкг/л) в растворе измеряли через 1, 2, 3 и 4 дня на трех образцах для каждого вида покрытия.

Результаты и их обсуждение. Результаты измерения толщины медной пленки по изображениям сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), полученной при времени магнетронного напыления 55 минут и 400 минут представлены на рис. 1, а и б соответственно. На рис. 1 изображение титанового сплава однородное темно-серое, медного покрытия – светло серое. Так как образцы запаивались в эпоксидную смолу, то ее изображение также представлено на рис. 1, а слева и на рис. 1, б вокруг шероховатой поверхности образца. Как видно по рис.1, средняя толщина Cu покрытия составила $41,6\pm 0,5$ мкм для времени напыления 55 мин и $159,5\pm 1,5$ мкм для времени напыления 400 мин. Таким образом, зависимость времени магнетронного напыления и толщины покрытия, как и предполагалось, линейная, что дает возможность в будущем формировать покрытия заданной толщины из определенных материалов, варьируя параметры напыления.

Из рис. 1 также видно, что магнетронное напыление постоянного тока позволяет достаточно равномерно напылить медную пленку на шероховатую поверхность имплантата, что весьма перспективно для разработки технологий создания многослойных покрытий с нижними слоями из биосовместимых материалов, верхними – из бактерицидной медной пленки.



*a**б*

Рисунок 1. СЭМ-изображения медной пленки на поверхности титанового сплава, полученной магнетронным напылением: *a* – в течение 55 мин.; *б* – 400 мин.

Средняя толщина покрытия Cu-Ti составила $5,5 \pm 0,15$ мкм, что позволяет назвать данное покрытие тонкой пленкой. Следует отметить, что наблюдалась некоторая неоднородность толщины покрытия, возможно, обусловленная условиями напыления. Впервые для создания такого двухкомпонентного покрытия применялся магнетрон не импульсного, но постоянного тока и была разработана оригинальная схема магнетронного напыления, позволяющая получить покрытие желаемого состава. Результаты энергодисперсионного анализа, представленные на рис. 2 и в табл. 1, показывают, что желаемое соотношение компонентов покрытия (98 вес. % Cu и 2 вес. % Ti) было достигнуто. В дальнейшем планируется продолжить исследования по подбору параметров и условий магнетронного напыления постоянного тока, чтобы обеспечить получение тонких пленок равномерной и контролируемой толщины и состава.

Таблица 1. Данные (в вес. %) нормализованных результатов энергодисперсионного анализа всех элементов в спектрах покрытия Cu-Ti, указанных на рис. 2, *a*

Спектр	В стат.	Ti	Cu	Итог
Спектр 1	Да	1.59	98.41	100.00
Спектр 2	Да	5.60	94.40	100.00
Спектр 3	Да	1.68	98.32	100.00
Спектр 4	Да	1.69	98.31	100.00
Спектр 5	Да	1.75	98.25	100.00
Спектр 6	Да	1.62	98.38	100.00
Среднее		2.32	97.68	100.00
Станд. отклонение		1.61	1.61	
Макс.		5.60	98.41	
Мин.		1.59	94.40	

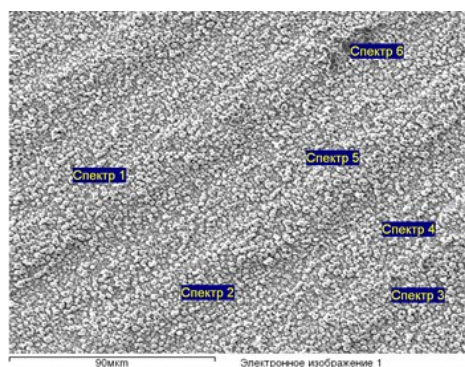
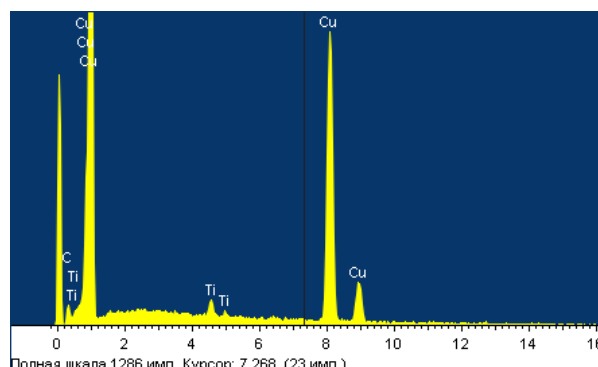
*a**б*

Рисунок 2. Результаты энергодисперсионного анализа:
a – вид поверхности покрытия Cu-Ti с указанием участков элементного анализа (места съемки спектров); *б* – результаты анализа спектра 6

Результаты масс-спектрометрических измерений выделения (высвобождения) ионов Cu^{2+} (мкг/л) из Cu и Cu-Ti покрытий в среду физиологического раствора через 1, 2, 3 и 4 дня после погружения в раствор представлены на рис. 3.

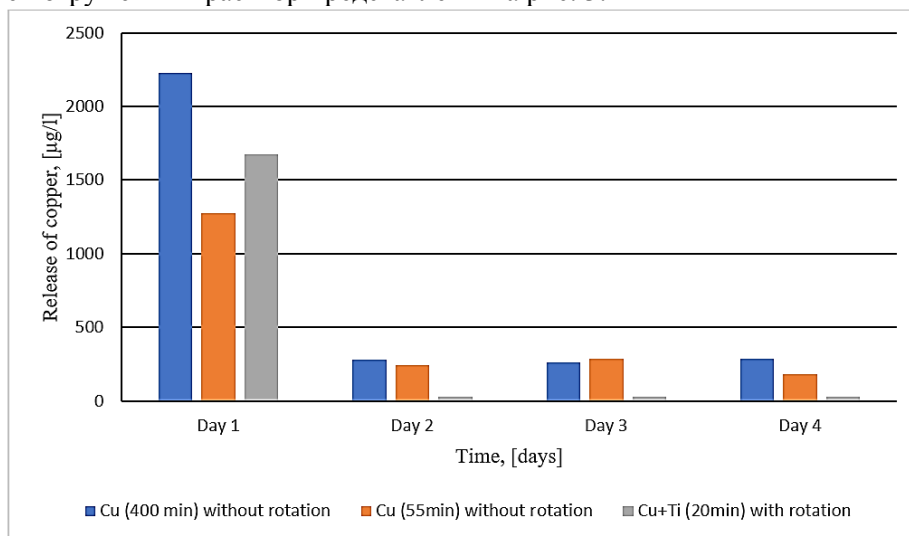


Рисунок 3. Концентрация (мкг/л) ионов меди, выделившихся в 0,9 % раствор NaCl из Cu-пленок разной толщины (толстая – левые столбики, тонкая – средние столбики) и Cu-Ti (правые столбики диаграммы) через 1, 2, 3 и 4 дня после погружения в раствор

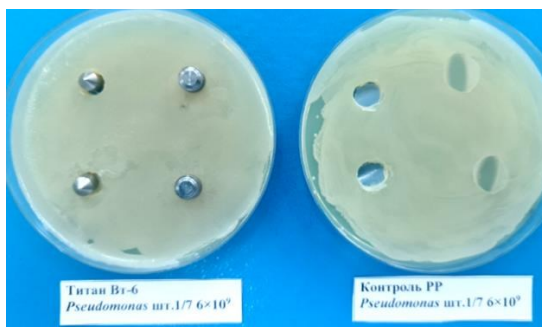
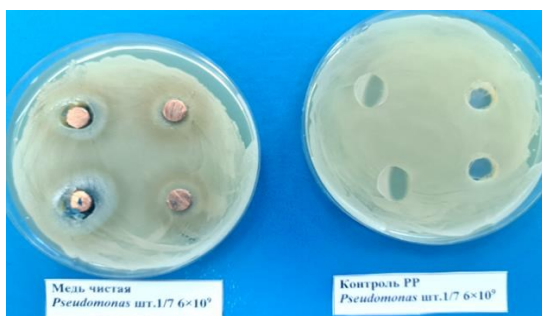
Как видно из рис. 3, количество выделившихся ионов меди после 1 дня погружения в физиологический раствор составляет около 2225 мкг/л для толстой пленки и около 1273 мкг/л для тонкой пленки, тогда как к концу четвертого дня количество высвободившихся ионов меди резко снижается для обеих пленок и составляет 180 мкг/л для тонкой пленки и 240 мкг/л для толстой пленки. Это говорит о том, что количество освобождающихся ионов меди прямо пропорционально толщине покрытия и, главное, что большинство ионов меди высвобождается в течение первых суток контакта с физиологическим раствором, тогда как к концу 4-х суток их количество уменьшается в 7 раз для более толстого покрытия и в 3 раза для более тонкого. Наиболее интересным результатом является то, что количество Cu^{2+} , освободившихся в течение первых 24 часов из пленки Cu-Ti, превосходит количество ионов меди, высвободившихся из тонкой пленки чистой меди, и составляет величину порядка 1530 мкг/л, падая практически до нуля уже к концу вторых суток, при том, что толщина двухкомпонентной пленки примерно в 5 раз меньше, чем у тонкого покрытия из чистой меди. Даже небольшое количество титана (2 %) в составе тонкой двухкомпонентной пленки оказалось способным изменить динамику высвобождения ионов, при этом тонкая двухкомпонентная пленка превосходит чисто медные покрытия по количеству высвобождающихся ионов за промежуток 1 сутки. Таким образом, с целью увеличения количества выделяющихся ионов меди за короткий промежуток после получения покрытия явно предпочтительнее создавать более тонкие двухкомпонентные покрытия, нежели увеличивать толщину медных покрытий.

Результаты исследования антимикробной активности медных пленок и титанового сплава без покрытия представлены в табл. 2, как результаты измерения областей подавления роста бактериальных штаммов, и на рис. 4, как изображения роста тест-штаммов бактерий на металлических дисках, включая изображения контрольного

полипропиленового (PP) диска. Было решено испытывать только более тонкое покрытие из чистой меди, чтобы сопоставление результатов с данными о тонкой пленке Ti-Cu было более оправданным.

Таблица 2. Зоны ингибирования роста суточных тест-культур бактерий псевдомонад и стафилококка

Образцы	Зоны ингибирования тестовых культур, мм									
	<i>P.aeruginosa</i>					<i>S.aureus</i>				
	1	2	3	4	Среднее значение	1	2	3	4	Среднее значение
Пленка Cu-Ti на Ti диске	21	26	32	36	28,8	17	18	18	17	17,5
Тонкое Cu покрытие на Ti диске	12,5	14	18,5	22	16,8	12	14	17	19	15,5
Ti-6Al-4V без покрытия	Нет ингибирования					Нет ингибирования				
PP контрольный	Нет ингибирования					Нет ингибирования				



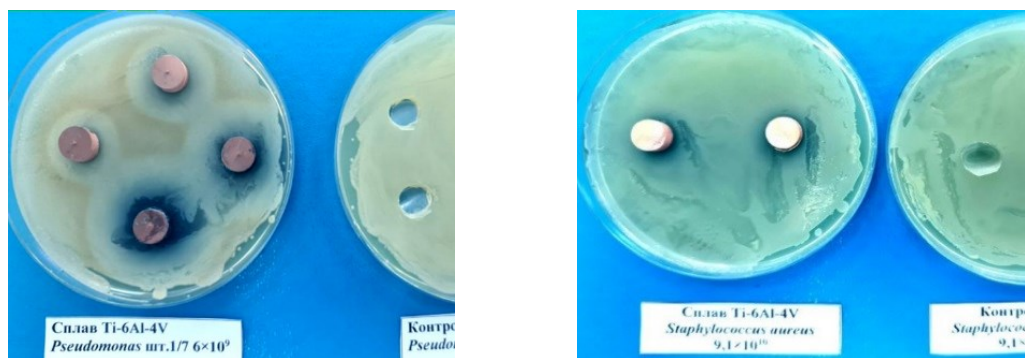


Рисунок 4. Рост тест-штаммов бактерий на металлических дисках

Из данных табл. 2 видно, что для пленки Cu-Ti зона ингибирования бактерий *P. aeruginosa* была максимальной и составила в среднем 28,8 мм (при максимальных наблюдаемых значениях 36 мм), а для *S. aureus* зона ингибирования составила в среднем 17,5 мм (при максимальных наблюдаемых значениях 18 мм).

Относительно тонкие чисто медные покрытия меньше влияли на подавление роста бактерий. Зона отсутствия роста бактерий *P. aeruginosa* для этой серии образцов составила в среднем 16,8 мм (табл. 2) при наблюдаемом максимуме в 22 мм, а для *S. aureus* соответственно 15,5 мм и 19 мм.

Таким образом, культура *P. aeruginosa* оказалась более чувствительной к действию меди по сравнению с культурой *S. aureus*, которая также отрицательно реагировала на выделение ионов меди, но ее зоны ингибирования были несколько меньше (табл. 2).

Образец титанового сплава Ti-6Al-4V не влиял на рост и развитие исследуемых бактерий в течение заданного времени.

Примечательно, что образцы с более тонким двухкомпонентным покрытием Cu-Ti оказали большее ингибирующее воздействие на бактерии обоих штаммов, нежели образцы с более толстым (в 5 раз) покрытием из чистой меди, что согласуется с тем фактом, что концентрация освобожденных ионов меди из данного Cu-Ti покрытия была выше на 257 мкг/л в течение 24 часов испытаний (рис. 3).

На рис. 4 вокруг образцов с напыленным слоем меди можно заметить выделения синего цвета, предположительно, это комплексы меди hexaquo ($\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$), которые обладают характерным синим цветом и наблюдались в работе [19].

Результаты данного исследования в целом хорошо согласуются с результатами, полученными ранее авторами [19-23], которые методами импульсного магнетронного распыления получали тонкие пленки Cu-Ti с варьирующимся в пределах от 20 вес. % до 80 вес. % содержанием Cu, демонстрирующие явно выраженную антимикробную активность по отношению к *E. coli* и *S. Aureus*. Касательно процентного содержания меди следует отметить, что требуются дальнейшие исследования по подбору как оптимального состава пленки, так и параметров ее напыления. Например, Норамбуэна и др. [20] тестировали антибактериальные свойства *S. epidermidis* тонких пленок оксида титана (TiO) и пленок TiCuO, содержащих 20 %, 40 % или 80 % Cu, нанесенных с использованием мощного импульсного магнетронного распыления (HiPIMS) на Ti6Al4V диски, и обнаружили, что диски, покрытые TiCuO с 80 вес.% меди, показали большее снижение плотности биопленок и планктонных клеток по сравнению с другими тестируемыми композициями и низкую клеточную цитотоксичность по отношению к остеобластам

человека *in vitro*. Ранее Станак и др. [21] также сообщали об антибактериальном эффекте тонких пленок Ti-Cu в сочетании с достаточным ростом клеток остеобластов человека. Тонкие пленки Ti – Cu были приготовлены с помощью трех различных методов магнетронного распыления: магнетронного распыления постоянного тока (dc-MS), двойного магнетронного распыления (dual-MS), а также двойного высокоомощного импульсного магнетронного распыления (dual-HiPIMS). В целом исследования [22, 23] подтвердили концепцию, согласно которой тонкопленочное Ti-Cu покрытие Ti имплантата может обеспечить локальную антибактериальную среду, как наблюдается в данном исследовании, оставаясь при этом относительно нетоксичным для линии клеток остеобластов человека, что открывает широкие перспективы для высказанной авторами исследования идеи о создании многослойных покрытий для медицинских имплантатов – эндопротезов с повышенными свойствами биосовместимости, обеспечиваемыми нижними слоями покрытий из титана, циркония, тантала, и устойчивых к образованию бактериальных пленок за счет верхнего слоя тонкой пленки Cu-Ti. Также существенно, что показана возможность использовать магнетронное напыление постоянного тока для получения пленок заданного состава.

Заключение. Выполнена оценка количества освобождающейся меди и антибактериальных свойств по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* (*in vitro*) для медных покрытий разной толщины и для Cu-Ti пленки состава 98 вес. % Cu и 2 вес. % Ti на подложках из титанового сплава. Установлено, что бактерицидная активность более тонких Cu-Ti покрытий выше, чем у более толстых покрытий из чистой меди. Наибольшие зоны ингибирования бактерий *P. aeruginosa* (в среднем 28,8 мм) и бактерий *S. aureus* (в среднем 17,5 мм) наблюдаются для двухкомпонентного покрытия Cu -Ti толщиной 5,5 мкм. Установлено, что количество ионов меди, выделяющихся из Cu-покрытий, прямо пропорционально толщине покрытия и что высвобождение основного количества ионов меди (до 1530 мкг/л для Cu-Ti пленки) происходит в течение первых суток погружения в физиологический раствор. Подобраны режимы магнетронного напыления постоянного тока антибактериальных тонких пленок Cu-Ti на подложки из сплава Ti-6Al-4V. Полученные результаты перспективны для развития технологий получения покрытий для медицинских имплантатов с повышенными бактерицидными и биосовместимыми свойствами поверхности.

Благодарность. Данное исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP13268737).

References

1. Cizek J., Matejcek J.: Medicine Meets Thermal Spray Technology: A Review of Patents // *J Therm Spray Tech* – 2018. – Т. 27, № 8. – С. 1251-1259.
2. Civantos A., Dominguez C., Pino R.J., Setti G., Pavon J.J., Martinez-Campos E., Garcia F.J.G., Rodriguez J.A., Allain J.P., Torres Y.: Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and *in vitro* cells behavior towards increased osseointegration // *Surf Coat Technol* – 2019. – Т. 368. – С. 164-174.
3. Liu W., Liu S., Wang L.: Surface Modification of Biomedical Titanium Alloy: Micromorphology, Microstructure Evolution and Biomedical Applications // *Coatings* – 2019. – Т. 9. – С. 249.
4. Wilson, J. Metallic biomaterials: State of the art and new challenges. In *Fundamental Biomaterials: Metals*; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing: Shaston, UK, 2018; pp. 1-33.
5. Nicholson J.W.: Titanium Alloys for Dental Implants: A Review // *Prosthesis* – 2020. – Т. 2. – С. 100-116.
6. Kaur, M.; Singh, K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications // *Mater. Sci. Eng. C* – 2019. – Т. 102. – С. 844-862.

7. John, A.A.; Jaganathan, S.K.; Supriyanto, E.; Manikandan, A. Surface modification of titanium and its alloys for the enhancement of osseointegration in orthopaedics // *Curr. Sci.* – 2016. – Т. 111. – S. 1003–1015.
8. Murr, L.E. Strategies for creating living, additively manufactured, open-cellular metal and alloy implants by promoting osseointegration, osteoinduction and vascularization: An overview // *J. Mater. Sci. Technol.* – 2019. – Т. 35 – S. 231-241.
9. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions // *Biomater.* – 2012. – Т. 2 – S. 176-194.
10. Lindeque B, Hartman Z, Noshchenko A, Cruse M. Infection after primary total hip arthroplasty // *Orthopedics.* – 2014. – Т. 37, №8. – S. 257-265.
11. Akhavan, B.; Wise, S.; Bilek, M. Substrate-regulated growth of plasma-polymerized films on carbide-forming metals // *Langmuir* – 2016. – Т. 32 – S. 10835-10843.
12. Wojcieszak, D.; Kaczmarek, D.; Antosiak, A.; Mazur, M.; Rybak, Z.; Rusak, A.; Osekowska, M.; Poniedzialek, A.; Gamian, A.; Szponar, B. Influence of Cu-Ti thin film surface properties on antimicrobial activity and viability of living cells // *Mater. Sci. Eng. C* – 2015. – Т. 56 – S. 48-56.
13. D. Wojcieszak, M. Osekowska, D. Kaczmarek, B. Szponar, M. Mazur, P. Mazur, A. Obstarczyk Influence of Material Composition on Structure, Surface Properties and Biological Activity of Nanocrystalline Coatings Based on Cu and Ti // *Coatings* – 2020. – Т. 10. – S. 343; doi:10.3390/coatings10040343
14. U. Walschus, A. Hoene, M. Patrzyk, S. Lucke, B. Finke, M. Polak, G. Lukowski, R. Bader, C. Zietz, A. Podbielski, J. B. Nebe and M. Schlosser A Cell-Adhesive Plasma Polymerized Allylamine Coating Reduces the In Vivo Inflammatory Response Induced by Ti6Al4V Modified with Plasma Immersion Ion Implantation of Copper // *J. Funct. Biomater.* – 2017. – Т. 8. – S. 30; doi:10.3390/jfb8030030
15. Alontseva D. L., Azamatov B., Voinarovych S., Kyslytsia O., Koltunowicz T.N., Toxanbayeva A. Development of Technologies for Manufacturing Medical Implants Using CNC Machines and Microplasma Spraying of Biocompatible Coatings // *Przegląd Elektrotechniczny*, – 2020. – Т. 96. – № 4. – S. 154–157. doi:10.15199/48.2020.04.32.
16. Alontseva D., Ghassemieh E., Voinarovych S., Kyslytsia O., Polovetski, N. Prokhorenkova, Kadyroldina A.T.: Manufacturing and characterization of robot assisted microplasma multilayer coating of Titanium implants // *Johnson Matthey Technol Rev* – 2020. – Т. 64. – № 2. – S. 180–191.
17. Alontseva D.L., Abilev M.B., Zhilkashinova A.M., Voinarovych S.G., Kyslytsia O. N., Ghassemieh E., Russakova A., Łatka L.: Optimization of hydroxyapatite synthesis and microplasma spraying of porous coatings onto titanium implants // *Advances in Materials Science* – 2018. – Т. 18. – № 3,57 – S. 79-94.
18. Voinarovych, S. G., Alontseva, D. L., Kyslytsia, O. N., Kaliuzhnyi, S., Khozhanov, A. R., Krasavin, A. and Kolesnikova, T. Fabrication and Characterization of Zr Microplasma Sprayed Coatings for Medical Applications // *Advances in Materials Science*, – 2021. – Т. 21. – № 2. – S. 93-105. doi:10.2478/adms-2021-0013
19. V. Stranak, H. Wulff, P. Ksirova, C. Zietz, S. Drache, M. Cada, Z. Hubicka, R. Bader, M. Tichy, C.A. Helm, R. Hippler, Ionized vapor deposition of antimicrobial Ti–Cu films with controlled copper release // *Thin Solid Films* – 2014. – Т. 550. – S. 389-394
20. G. A. Norambuena, R. Patel, M. Karau, C. C. Wyles, P. J. Jannetto, K. E. Bennet, A. D. Hanssen, R. J. Sierra Antibacterial and Biocompatible Titanium-Copper Oxide Coating May Be a Potential Strategy to Reduce Periprosthetic Infection: An In Vitro Study *Clin Orthop Relat Res* (2017) 475:722–732 DOI 10.1007/s11999-016-4713-7 (Volume 475, Number 3, March 2017 Titanium-Copper Oxide Antibacterial Coating)
21. M. Osekowska, D. Wojcieszak, D. Kaczmarek, M. Mazur, A. Obstarczyk B. Szponar Multifunctional Nanocrystalline Cu–Ti Thin Films Enhance Survival and Induce Proliferation of Mouse Fibroblasts In Vitro // *Coatings* – 2021. – Т. 11. – S. 300. – <https://doi.org/10.3390/coatings11030300>
22. B. Adamiak, A. Wiatrowski, J. Domaradzki, D. Kaczmarek, D. Wojcieszak, M. Mazur Preparation of multicomponent thin films by magnetron co-sputtering method: The Cu-Ti case study // *Vacuum* – 2019. – Т. 161. – S. 419–428. – <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2019.01.012>
23. J. Kratochvíl, J. Štěrba, J. Lieskovská, H. Langhansová, A. Kuzminova, I. Khalakhan, O. Kylián, V. Straňák, Antibacterial effect of Cu/C:F nanocomposites deposited on PEEK substrates // *Materials Letters* – 2018. – <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.07.082>