

02

Спектроскопия комбинационного рассеяния для оценки поверхности сплавов титана VT6

© П.Е. Тимченко¹, О.О. Фролов¹, Е.В. Тимченко^{1,¶}, Д.А. Долгушкин², А.Н. Николаенко²,
Л.Т. Волова², В.В. Иванов², Р.Т. Самигуллин¹

¹ Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва,
443086 Самара, Россия

² Самарский государственный медицинский университет, биотехнологический центр „БиоТех“,
443079 Самара, Россия

¶e-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 28.10.2022 г.

В окончательной редакции 23.11.2022 г.

Принята к публикации 28.11.2022 г.

Представлены результаты исследования поверхности образцов имплантов с разными типами покрытий с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. Исследованы образцы на основе титана VT6, изготовленные по технологии селективного лазерного спекания с разными покрытиями (без покрытий, с покрытием гидроксиапатитом кальция, с комбинированным покрытием — гидроксиапатитом кальция, на который было нанесено покрытие, содержащее антибактериальный препарат и образцы с покрытием, содержащим хитозан). Установлены спектральные различия поверхности образцов имплантов с разными типами их покрытий на основе титана VT6. Это позволит исследовать динамику резорбции данных покрытий с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния при выполнении доклинических исследований у животных.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, поверхность, сплав титана, растровая электронная микроскопия.

DOI: 10.21883/OS.2023.06.55905.101-23

Введение

Совершенствование металлофиксаторов является одной из основных задач современной реконструктивной хирургии. Помимо прочностных характеристик все большее внимание уделяют биоинтегративным свойствам покрытий имплантов, от которых во многом зависят эффективность операции, срок функционирования импланта, качество жизни пациентов [1–3].

Совершенствование покрытий имплантов, в частности эндопротезов, является актуальной проблемой травматологии и ортопедии. Частота ревизий при эндопротезировании крупных суставов составляет до 20% от первичных операций. Это связано как с механическим износом конструкции, травматизацией, так и с развитием осложнений — асептической и септической нестабильностью компонентов эндопротеза. В 2.5% случаев первичного эндопротезирования тазобедренного и коленного суставов и при 10% операций ревизионного эндопротезирования может возникать перипротезная инфекция сустава [4,5].

Характеристики поверхности имплантов нередко играют решающую роль в адгезии бактерий с последующим образованием на импланте биопленки. Представляет интерес создание покрытий титановых имплантов, предупреждающих такие осложнения [6,7].

Разработкой разных типов покрытий для ортопедических имплантов занимаются ученые всего мира —

созданы покрытия на основе хитозана, гидроксиапатита, биопокрытия, содержащие антибактериальные препараты, комбинированные покрытия [8,9]. Одной из основных проблем остается срок биологической активности того или иного покрытия, взаимодействие его с организмом человека. Ряд покрытий подразумевает постепенное высвобождение из них действующего лекарственного препарата, дальнейшую резорбцию верхнего покрытия и проявление биологического эффекта нижерасположенных покрытий импланта [10,11].

В настоящее время большое применение для биомедицинских задач получили физические методы исследования [12–14]. Одним из методов оценки свойств поверхности имплантов с разными типами покрытий может быть метод спектроскопии комбинационного рассеяния (СКР), который является неинвазивным и в последнее время широко применяется в медицине [15].

Целью работы являлась сравнительная оценка характеристик поверхностей образцов имплантов на основе титана VT6 с разными типами покрытий с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния и растровой электронной микроскопии.

Материалы и методы исследований

Материалами исследования являлись образцы имплантов на основе титана VT6, изготовленные по техно-

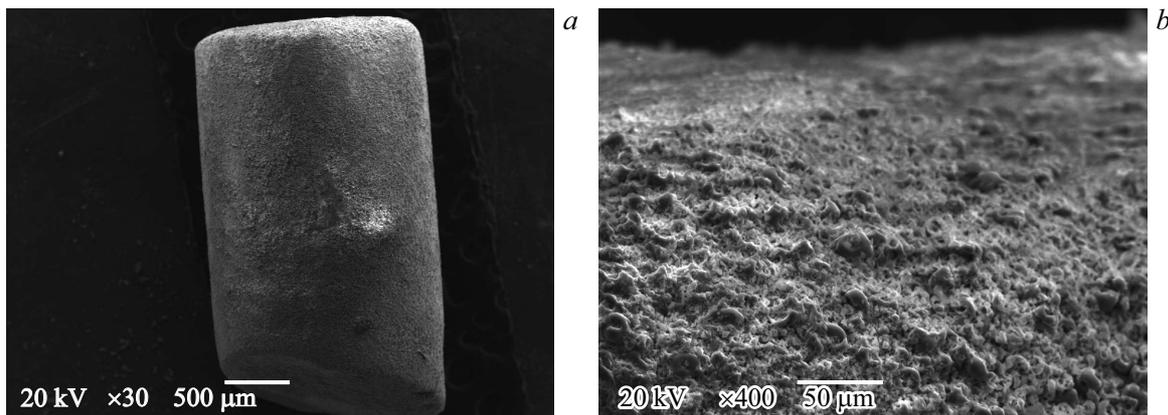


Рис. 1. Растровая электронная микроскопия образца титана ВТ6 с покрытием гидроксиапатитом. *a* — увеличение 30×, *b* — увеличение 400×.

логии селективного лазерного спекания (Первый СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова). Исследуемые образцы поделены на четыре группы: 1 — стерильные образцы (без покрытий), 2 — с покрытием гидроксиапатитом кальция (ГАП) (Национальный исследовательский Томский политехнический университет), 3 — образцы с покрытием гидроксиапатитом кальция, на который дополнительно было нанесено покрытие, содержащее антибактериальный препарат (Сколковский институт науки и технологий), 4 — покрытие с плёнкой, содержащей хитозан (Кафедра физики полимеров и кристаллов МГУ им. М.В. Ломоносова). Все образцы были простерилизованы стандартными методами, применяемыми в медицинских клиниках.

Полученные для исследования с помощью СКР образцы титана ВТ6 с покрытием представляют собой цилиндрические бруски длиной 5 мм, диаметром 2 мм.

Предварительно поверхности образцов оценивали с помощью растровой электронной микроскопии, используя растровый сканирующий микроскоп JED-2300 (TokyoVoeiki, Япония) с программным обеспечением AnalysisStation 3.63.01, напыление с помощью прибора ЕМТЕСНК450Х (Великобритания).

Исследования проводили *in vivo* с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния, который был реализован с помощью стенда, включающего в себя полупроводниковый лазер (LML-785.0RB-04), оптический модуль комбинационного рассеяния (PBL 785), спектрограф (Sharmrock SR-303i) с интегрированной цифровой камерой (ANDOR DV-420A-OE), охлаждаемой до -60°C и компьютер [16].

Использование данного спектрографа обеспечивало разрешение 0.15 nm по длине волны при низком уровне собственных шумов. Мощность излучения лазера 400 mW в пределах используемых времён экспозиции (30 s) не вызывало изменений образцов. Регистрацию спектров КР проводили с помощью оптического зонда, который располагали над объектом на расстоянии 7 мм. В данной

работе анализ спектров КР проводился в диапазоне $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$.

Для исключения вклада автофлуоресценции в спектре КР использовали метод вычитания флуоресцентной составляющей полиномиальной аппроксимации с дополнительной фильтрацией случайных шумовых эффектов. Обработка и анализ спектров КР проводились с помощью программного комплекса Wolfram Mathematica 12.2 [17].

Результаты

Исследование поверхности образцов с помощью растровой электронной микроскопии выявило различия между ними. Так, образцы титана ВТ6 с напылением гидроксиапатита характеризовались ровным распределением покрытия по площади имплантата. При разных степенях увеличения не было обнаружено участков, лишенных покрытия, очагов повреждений или сколов, в том числе на основаниях цилиндрических образцов. При увеличении 400× видно, что покрытие является шероховатым и мелкопористым, что необходимо учитывать при выполнении СКР (рис. 1).

При визуальном анализе результатов электронной микроскопии образцов титана ВТ6 с комбинированным покрытием — гидроксиапатитом, с нанесенным на него антибактериальным препаратом следует отметить следующее. Антибактериальное покрытие нанесено на образец неравномерно. Обращают на себя участки образца, лишенные верхнего слоя и покрытые лишь гидроксиапатитом (рис. 2, *a*). Верхний антибактериальный слой неоднороден — имеется хорошо заметный спиралевидный участок по всей его поверхности, отделенный углубленной бороздкой (рис. 2, *b*).

При визуальном осмотре образцов титана ВТ6 с покрытием на основе хитозана по его поверхности наблюдали отслаивающуюся в виде сухих чешуек эле-

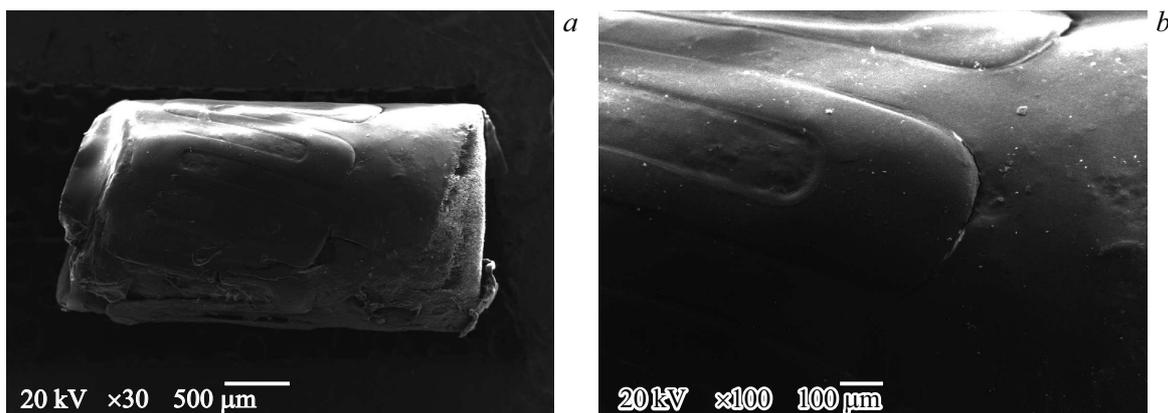


Рис. 2. Растровая электронная микроскопия образца титана ВТ6 с комбинированным покрытием гидроксиапатитом с нанесенным на него антибактериальным препаратом: *a* — увеличение 30×, *b* — увеличение 100×.

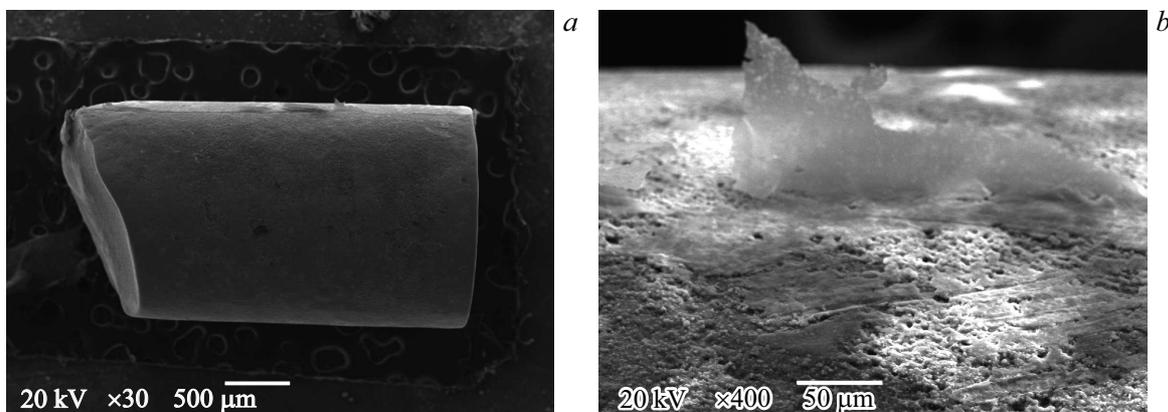


Рис. 3. Растровая электронная микроскопия образца титана ВТ6 с покрытием хитозаном: *a* — увеличение 30×, *b* — увеличение 400×.

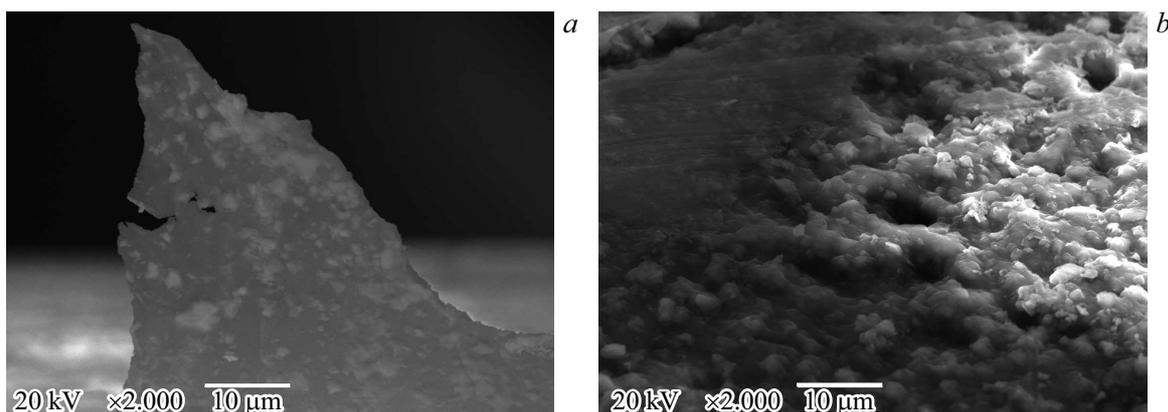


Рис. 4. Растровая электронная микроскопия образца титана ВТ6 с покрытием хитозаном, увеличение 2000×: *a* — частицы покрытия на отслаивающихся элементах; *b* — частицы покрытия на поверхности импланта.

менты покрытия. Аналогичную картину наблюдали при выполнении электронной микроскопии образцов на малых увеличениях (рис. 3, *a*). Данные фрагменты легко отделялись пинцетом, лежали свободно в стерильной упаковке.

Однако при исследовании с помощью электронной микроскопии на больших увеличениях было обнаружено, что как отслаивающиеся участки, так и поверхность всего образца были равномерно покрыты белесоватыми вкраплениями разной формы и размеров (рис. 3, *b*,

рис. 4). Это позволило предположить, что наличие отслаивающихся чешуек не следует трактовать как дефект покрытия. Соответственно и выполнение СКР данных образцов следует проводить с прицелом на обнаружение элементных структур, близких к структуре хитозана.

Исследование поверхности образцов с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния выявило следующие особенности.

На рис. 5 представлены нормированные спектры комбинационного рассеяния исследуемых образцов. Интерпретация основных спектральных линий представлена в таблице.

Как видно из рис. 5, спектры КР имеют ярко выраженные спектральные различия между спектрами всех исследуемых групп.

Отличия группы 4 (образцы, покрытые плёнкой, содержащей хитозан) и группы 1 (стерильные образцы) выражены на линиях КР $\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$ (Amide III-Dueto C–N stretching and N–H bending), $\sim 1416 \text{ cm}^{-1}$ (CH deformation), $\sim 1558 \text{ cm}^{-1}$ (Amide II Parallel/Antiparallel β -sheet structure), $\sim 1665 \text{ cm}^{-1}$ (Amide I vibration) и 1748 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O}$ ester group), phospholipids (Lipid assignment)).

Указанные линии КР $\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1416 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1558 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1665 \text{ cm}^{-1}$, 1748 cm^{-1} не проявляются в группе образцов 2 (образцы с покрытием ГАП), но ярко выражены линии в области $950\text{--}1050 \text{ cm}^{-1}$, содержащей линии гидроксиапатита $955\text{--}961 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{PO}_4^{3-}(\nu_1)$ (P–O symmetric stretch)) и $\sim 432 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{PO}_4^{3-}(\nu_2)$ (P–O symmetric stretch) (phosphate of HA)).

В группе 3 (образцы с покрытием ГАП и антибактериальным препаратом) линии в области $950\text{--}1050 \text{ cm}^{-1}$ выражены в меньшей степени, чем в группе образцов 2, присутствуют линии КР $\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1448 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1558 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1665 \text{ cm}^{-1}$, 1748 cm^{-1} . В группе 3 ярко выражена линия КР 870 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})$, Benzene ring of hydroxyproline (collagen assignment), которая связана с наличием антибактериального препарата в составе пленки.

Для повышения информативности полученных спектров КР был произведен нелинейный регрессионный анализ спектров, состоящий в их разложении на спектральные линии.

Состав спектральных линий определен на основе автоматического многоитерационного моделирования 48 спектров КР в программной среде Wolfram Mathematica 12.2 с использованием методов машинного обучения и апробирован по результатам анализа литературы (таблица). При моделировании спектрального контура у линий, используемых как шаблон, нежестко фиксировалось положение x_0 и полуширина линии (HWHM) dx .

При моделировании подбиралась лишь интенсивность линии в диапазоне от 0 до значения локального максимума спектра в области x_0 . HWHM ограничивалось в диапазоне от 1 до 16 cm^{-1} . Это позволяло добиться

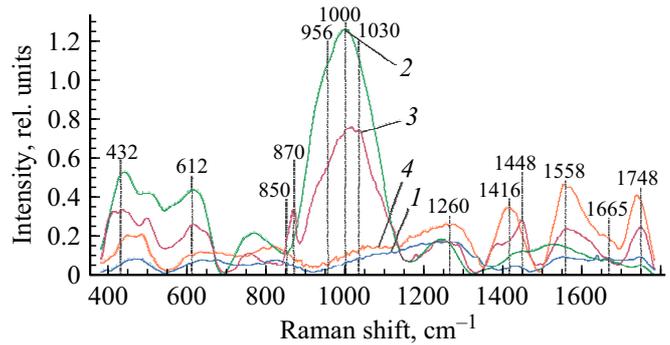


Рис. 5. Усредненные спектры КР исследуемых образцов сплава титана ВТ6. 1 — титан ВТ6 без покрытия (контроль), 2 — покрытие ГАП, 3 — покрытие ГАП с антибиотиком, 4 — покрытие с хитозаном.

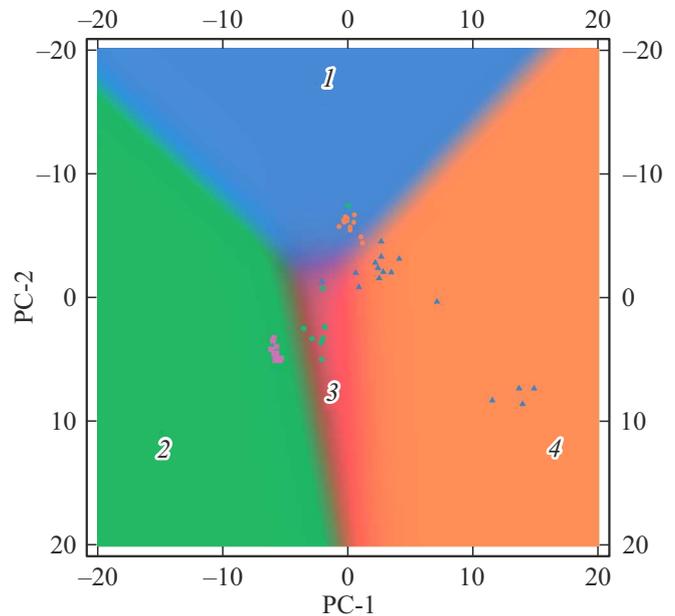


Рис. 6. 2D распределение вероятностей каждого класса как функция признаков (образцы: 1 — титан ВТ6 без покрытия (контроль), 2 — покрытие ГАП, 3 — покрытие ГАП с антибиотиком, 4 — покрытие с хитозаном).

высокой стабильности результатов при моделировании контура и учитывать все сдвиги линий КР.

Критерияльной переменной являлась амплитуда линий a , которая зависит от значений независимых регрессоров dx и x_0 , определяющих начальные условия анализа. Среднее значение скорректированного коэффициента детерминации спектра от исходного в области $400\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$ для всех 60 спектров составило $R_{\text{adj}}^2 = 0.998$.

Для относительной количественной оценки компонентного состава были использованы нормированные амплитуды разделенных линий комбинационного рассеяния. Анализ полученных данных произведен в программ-

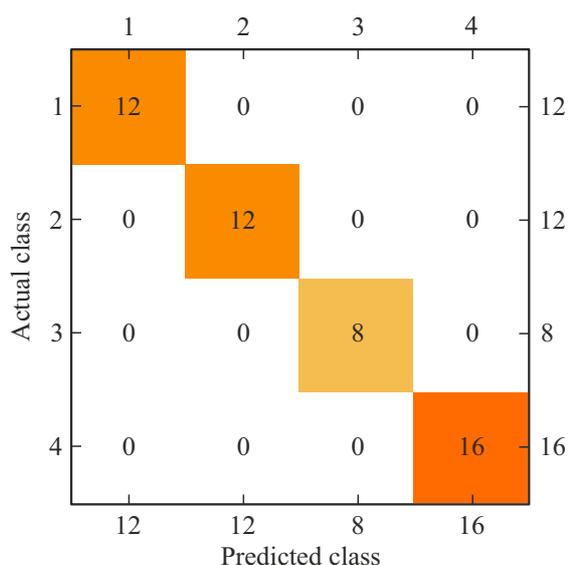


Рис. 7. Матрица правильности классификации модели (образцы: 1 — титан ВТ6 без покрытия (контроль), 2 — покрытие ГАП, 3 — покрытие ГАП с антибиотиком, 4 — покрытие с хитозаном).

ной среде Wolfram Mathematica 12.2 методом логистической регрессии.

Визуализация результатов классификации методом логистической регрессии в пониженном (reduced) двумерном измерении представлена на рис. 6 в виде распределения плотности вероятности отнесения каждого измерения к одному из четырех классов. Видно, что области групп хорошо дифференцируются и не имеют значительных пересечений.

В результате анализа методом логистической регрессии составлена модель дискриминации характерных изменений интенсивностей линий КР для образцов титана ВТ6 с различными покрытиями. Рассчитанное значение $assurasy = 100\%$, $base\ line\ assurasy = 33.7\%$ (классификация между ближайшими классами). Дискриминационная адекватность метода характеризуется значением $AUC = 1$. Матрица правильности классификации модели представлена на рис. 7.

На рис. 8, *a* представлены результаты LDA сравнения групп образцов. Дискриминантная функция LD-1 описывает дисперсию на 73.4%. Положительные значения LD-1 характерны для спектров КР образцов с покрытием ГАП. Области групп не имеют пересечения.

На рис. 8, *b* показаны коэффициенты матрицы факторной структуры для наиболее значимых линий КР, имеющие физический смысл корреляции между переменными в модели и дискриминирующей функцией.

Чем выше по модулю значение LD-1 для переменной, тем в большей степени она определяет разницу в дискриминационной модели между группами образцов. Например, относительная интенсивность линии КР 956 cm^{-1} выше в спектрах с ГАП, что отражает-

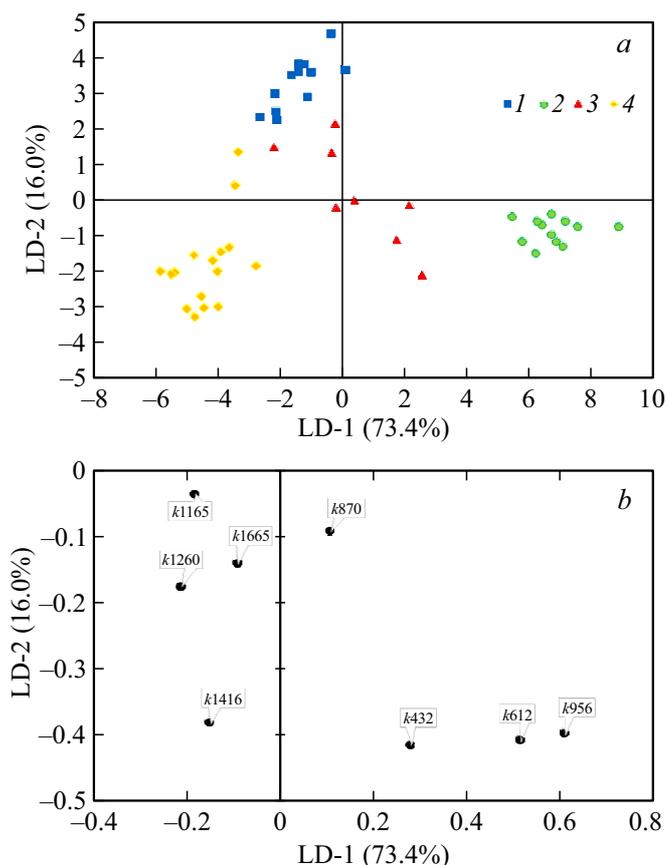


Рис. 8. Результаты LDA: *a* — график значений линейной дискриминантной функции (образцы: 1 — титан ВТ6 без покрытия (контроль), 2 — покрытие ГАП, 3 — покрытие ГАП с антибиотиком, 4 — покрытие с хитозаном); *b* — значения коэффициентов факторной структуры.

ся положительным значением 0.61 коэффициента $k956$ факторной структуры. Значения коэффициентов $k1260$, $k1416$, $k1665$ выше для образцов с покрытием хитозана. Процент правильно классифицированных значений при кросс-валидации составил 93.8%.

Выводы

Исследование поверхности образцов с помощью растровой электронной микроскопии позволило выявить особенности нанесения покрытий на образцы. выявить дефекты, особенности рельефа, либо, напротив, предполагать равномерность расположения покрытия по поверхности имплантата. В соответствии с этим планировать схему выполнения СКР образцов, интерпретировать результаты методики.

В результате СКР поверхностей образцов титана ВТ6 с разными типами покрытий были установлены их спектральные различия между исследуемыми группами с использованием обработки результатов с помощью метода логистической регрессии и статистического анализа LDA.

Основные спектральные отличия между исследуемыми группами 4 (образцы, покрытые плёнкой, содержащей хитозан) и 1 (образцы стерильные) проявляются на линиях $\sim 1260\text{ cm}^{-1}$ (Amide III), $\sim 1416\text{ cm}^{-1}$ (CH deformation), $\sim 1558\text{ cm}^{-1}$ (Amide II), $\sim 1665\text{ cm}^{-1}$ (Amide I) и 1748 cm^{-1} (phospholipids).

Указанные линии КР $\sim 1260\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1416\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1558\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1665\text{ cm}^{-1}$, 1748 cm^{-1} не проявляются в группе образцов 2 (образцы с покрытием ГАП), но в результатах ярко выражены линии в области $950\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$, соответствующие линиям гидроксиапатита $955\text{--}961\text{ cm}^{-1}$ ($\text{PO}_4^{3-}(\nu_1)$) и 432 cm^{-1} ($\text{PO}_4^{3-}(\nu_2)$). В группе 3 (образцы с покрытием ГАП и антибактериальным препаратом) интенсивность КР в области $950\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ была выражена в меньшей степени, чем в группе образцов 2 (образцы с покрытием ГАП), а также присутствовали линии КР $\sim 1260\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1448\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1558\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1665\text{ cm}^{-1}$, 1748 cm^{-1} . В этой группе определяли ярко выраженную линию КР 870 cm^{-1} (Benzene ring of hydroxyproline).

В результате проведенных исследований были установлены основные спектральные характеристики и их различия поверхностей образцов имплантов с разными типами покрытий на основе титана ВТ6. В дальнейших доклинических исследованиях у животных планируется имплантация данных образцов и их последующее извлечение с оценкой изменения поверхности в динамике. Знание спектральных характеристик поверхностей имплантов поможет установить закономерности резорбции покрытий, подтвердить или опровергнуть их биологический эффект в динамике доклинического исследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] G. Pellegrini, L. Francetti, B. Barbaro, M. Del Fabbro. *J. Investig. Clin. Dent.*, **9** (4), e12349 (2018). DOI: 10.1111/jicd.12349
- [2] M.Q. Chen. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 878257 (2022). DOI: 10.3389/fbioe.2022.878257
- [3] M.M. Saleh, A.H. Touny, M.A. Al-Omar, M.M. Saleh. *Biomed. Mater. Eng.*, **27** (1), 87–99 (2016). DOI: 10.3233/BME-161568. PMID: 27175470
- [4] W. Zimmerli, P. Sendi. *APMIS*, **125** (4), 353–364 (2017). DOI: 10.1111/apm.12687
- [5] E.A. Baker, M.M. Fleischer, A.D. Vara, M.R. Salisbury, K.C. Baker, P.T. Fortin, C.R. Friedrich. *Nanomaterials*, **11** (3), 583 (2021). DOI: 10.3390/nano11030583
- [6] D. Losic. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **18** (10), 1355–1378 (2021). DOI: 10.1080/17425247.2021.1928071
- [7] S. Maher, A. Mazinani, M.R. Barati, D. Losic. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **15** (10), 1021–1037 (2018). DOI: 10.1080/17425247.2018.1517743
- [8] S. Kumari, H.R. Tiyyagura, Y.B. Pottathara, K.K. Sadasivuni, D. Ponnamma, T. Douglas, A.G. Skirtach, M.K. Mohan. *Carbohydrate Polymers*, **255**, 117487 (2021). DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117487
- [9] A.A. Vu, S. Bose. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **12** (47), 52383–52392 (2020). DOI: 10.1021/acsami.0c14993
- [10] C.L. Roman, H. Tsuchiya, I. Morelli, A.G. Battaglia, L. Drago. *Bone Joint Res.*, **8** (5), 199–206 (2019). DOI: 10.1302/2046-3758.85.BJR-2018-0316
- [11] A. Ghimire, J. Song. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13** (18), 20921–20937 (2021). DOI: 10.1021/acsami.1c01389
- [12] В.Е. Привалов, В.Г. Шеманин. *Известия РАН. Серия физическая*, **79** (2), 170 (2015).
- [13] О.В. Мкртычев, В.Е. Привалов, В.Г. Шеманин, А.Э. Фотиади. *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*, **1** (213) 128–135 (2015).
- [14] В.Е. Привалов, С.В. Половченко, П.В. Чартий. *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*, **4** (206), 64–73 (2014).
- [15] P.E. Timchenko, E.V. Timchenko, L.T. Volova, M.A. Zybin, O.O. Frolov, G.G. Dolgushov. *Opt. Mem. Neural Networks*, **29** (4), 354–357 (2020). DOI: 10.3103/S1060992X20040116
- [16] E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, E.V. Pisareva, M.A. Daniel, L.T. Volova, A.A. Fedotov, O.O. Frolov, A.N. Subatovich. *J. Optical Technology*, **87** (3), 161–167 (2020). DOI: 10.1364/JOT.87.000161
- [17] E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, E.V. Pisareva, M.Yu. Vlasov, L.T. Volova, O.O. Frolov, Ya.V. Fedorova, G.P. Tikhomirova, D.A. Romanova, M.A. Daniel. *Opt. Spectrosc.*, **128** (7), 989–997 (2020). DOI: 10.1134/S0030400X20070243