На правах рукописи



АМШЕЕВ ДМИТРИЙ ЮРЬЕВИЧ

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ПЛАТИНЫ И ТИТАНА В РАСТВОРАХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ СРЕДУ

1.4.6. Электрохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Черноголовка – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Байкальский музей Сибирского отделения Российской академии наук» и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Иркутский государственный университет».

Научный руководитель: **Стом Дэвард Иосифович**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Арляпов Вячеслав Алексеевич**
доктор технических наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», директор научно-исследовательского центра «БиоХимТех»

Герасимова Екатерина Владимировна
кандидат химических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории твердотельных электрохимических систем

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт неорганической химии имени А.В. Николаева Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится «22» декабря 2026 г. в 13:00 на заседании диссертационного совета 24.1.108.04 по адресу: 142432, г. Черноголовка, проспект Академика Семенова, д. 7, актовый зал корпуса 1/2

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФИЦ ПХФ и МХ РАН и на сайте организации по адресу: https://icp-ras.ru/wp-content/uploads/DISS/Amsheev/Disser_Amsheev.pdf

Автореферат разослан «__» ноября 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
канд. хим. наук Шмыглева Любовь Вячеславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Платина и титан, а также сплавы на основе последнего, являются широко востребованными материалами для различных биомедицинских исследований и операций, благодаря их биосовместимости и коррозионной стойкости[1,2]. Изделия из платины и титана активно применяются в стоматологии и кардиологии, а также хирургии, ортопедии и травматологии – для ускорения регенерации костной ткани. Для улучшения биосовместимости, а также удешевления производства используются различные технологии изготовления имплантатов, сочетающих платину и титан одновременно[3,4,5].

Изучение взаимодействия платины и титана в составе имплантатов с биомолекулами (например, аминокислотами и белками), а также клетками организмов является важным аспектом успешной интеграции данных металлов в биомедицину. Например, процессы адсорбции и адгезии на поверхности имплантатов, а также другие факторы, например, кислотность среды, не должны приводить к выделению ионов металлов, поскольку это приводит к аллергическим реакциям[6]. Существует большое количество данных о поведении электрохимически активных аминокислот на поверхности платины, однако изучению адсорбции прочих аминокислот, а также белков-маркеров роста костной ткани, таких как остеокальцин, отводится существенно меньшее внимание. Активными центрами данного белка являются остатки гамма-карбоксиглутаминовой кислоты (γ-Glu), способные активно связываться с ионами кальция[7]. Строение данного фрагмента схоже с производными малоновой кислоты, содержащей геминально расположенные карбоксильные группы.

Электрохимические методы успешно применяются не только для изучения процессов адсорбции биологически важных веществ, но и для модификации поверхности имплантов. Варьирование условий экспериментов позволяет получать различные изделия из титана и его сплавов с поверхностью, обладающей антибактериальными и/или пролиферативными свойствами по отношению к клеткам организма[8]. В то же время многообразие экспериментальных методик делает затруднительным сравнение полученных результатов из различных работ между собой.

Одним из перспективных способов электрохимической модификации титана является анодирование в фосфатных буферных растворах с физиологическим pH, что приводит к получению относительно ровной

---

[1] Marin E., Lanzutti A. // Materials. 2023. Vol. 17. № 1. P. 114.
[2] Sinitsyna O. et al. Platinum in Biomedical Applications // Biomedical Applications of Metals / ed. M. Rai, A.P. Ingle, S. Medici eds. Springer International Publishing, 2018. P. 151–165.
[3] Basova T.V. et al. // Materials & Design. 2021. Vol. 204. P. 109672.
[4] Усольцев И.В. и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2011. Т. 3. № 79. С. 165–168.
[5] Тюхай Е.А. и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2012. Т. 4. № 86. С. 198–200.
[6] Szczęsny G. et al. // Coatings. 2025. Vol. 15. № 3. P. 361.
[7] Lee N. K. et al. // Cell. 2007. Vol. 130. № 3. P. 456–469.
[8] Wang W. et al. // Biomimetics. 2024. Vol. 9. № 7. P. 408.

оксидной поверхности с потенциально высокой биосовместимостью[9]. Однако, для предварительной оценки свойств подобных титановых образцов в качестве имплантатов также необходимо провести исследование их взаимодействия с такими модельными клетками, как фибробласты. Величина потенциала поляризации (анодирования) E_{pol} в этом случае будет играть важную роль как для морфологии оксидной поверхности, так и для адгезии клеток. Оценка влияния этого фактора при использовании Pt в качестве электродного материала также является важной задачей ввиду малого количества сведений о взаимодействии платины с клетками бактерий и более сложных организмов.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на обширные электрохимические исследования титана и платины в различных условиях, некоторые аспекты взаимодействия данных металлов с модельными биологическими компонентами требуют дальнейшего изучения. Так, в Иркутском государственном университете проводились исследования электрохимической адсорбции аминокислот на платине с использованием циклической вольтамперометрии (ЦВА)[10,11,12], титане с использованием спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ)[13], изучались морфологические свойства анодно поляризованного титана[14], а также, совместно с сотрудниками Иркутского научного центра хирургии и травматологии, остеорегенеративные свойства коаксиального имплантата Ti/Pt *in vivo*[15]. Однако, возможность использования электрохимических методов, в частности СЭИ, для оценки процесса электрохимической адсорбции аминокислот, а также взаимодействия Pt и Ti с модельными бактериями и клетками *in vitro*, еще не была изучена.

Целью работы является установление закономерностей электрохимического поведения платины и титана в условиях, моделирующих биологическую среду.

Задачи работы:

1. Изучение влияния потенциала поляризации платинового электрода на адсорбцию этилмалоновой (EMA), аспарагиновой (Asp), глутаминовой (Glu) кислоты, а также цистеина (Cys).

---

[9] Mehta K. et al. // Electrochimica Acta. 2025. Vol. 541. P. 147405.

[10] Туманова Е.А. Физико-химические процессы на границе раздела металлическая платина - растворы аминокислот и пептидов: Дис. … канд. хим. наук: 02.00.04 / Е.А. Туманова. – Иркутск, 2000. – 146 с.

[11] Tumanova E.A. et al. // Russian Journal of Electrochemistry. 2001. Vol. 37. № 9. P. 972–975.

[12] Tumanova E.A., Safronov A.Y. // Russian Journal of Electrochemistry. 1998. Vol. 34. № 2. P. 153–159.

[13] Kornyushova E.A. et al. // Bioelectrochemistry. 2019. Vol. 126. P. 113–120.

[14] Akimov V.V. et al. // Surface & Interface Analysis. 2015. Vol. 47. № 12. P. 1081–1097.

[15] Патент № 2523553C2 Российская Федерация, заявл. 19.04.2012 : опубл. 20.07.2014 / Пушкарев Б.Г. и др.

2. Изучение процесса бактериальной адгезии штамма *Micrococcus luteus* 1-I на Pt с помощью электрохимических методов анализа при потенциалах разомкнутой цепи E_{OC} и анодной поляризации до 1 В.

3. Оценка скорости коррозии и толщины оксидной пленки титанового электрода в условиях, близких к физиологическим.

4. Исследование влияния морфологии поверхности электрохимически модифицированных титановых образцов на адгезию фибробластов крысы.

Научная новизна основных результатов. Впервые проведено изучение электрохимической адсорбции слабо адсорбируемых EMA, Glu и Asp на поверхности поликристаллического платинового электрода с помощью СЭИ. Продемонстрирована возможность использования данных соединений в качестве моделей активного центра остеокальцина для оценки электрохимической адсорбции белка-маркера роста костной ткани на поверхности Pt. Оценено влияние величины потенциала поляризации на емкостные свойства платинового электрода в рамках модели плоского конденсатора. Впервые показано влияние бактериальной адгезии *M. luteus* 1-I на емкость двойного электрического слоя платинового электрода в стационарных условиях и условиях анодной поляризации. Продемонстрирована возможность применения СЭИ для быстрой (полу)количественной оценки толщины внутреннего и внешнего слоя оксидной пленки титана. Впервые проведена оценка адгезии фибробластов крысы на анодно поляризованных образцах Ti с различной морфологией оксидной поверхности при использовании фосфатного буферного раствора (PBS, pH 7,4) в качестве фонового электролита.

Теоретическая значимость результатов работы. В работе предложен способ относительного определения адсорбции биологически активных веществ на электродной поверхности Pt по изменению емкости двойного электрического слоя (ДЭС). Также были установлены закономерности влияния налагаемого потенциала на электрохимическое поведение веществ, способных как к химической, так и электростатической адсорбции на поверхности платинового электрода. Вышеуказанный подход был успешно использован для описания адгезии клеток микроорганизмов на платиновом электроде. Показано, что даже небольшие изменения потенциала поляризации в ходе анодирования титана способны серьезно влиять на морфологию поверхности оксидной пленки и биосовместимость по отношению к фибробластам крысы.

Практическая значимость результатов работы. Возможность оценки адсорбции химических веществ и адгезии клеток через относительную величину степени заполнения Θ делает данный метод перспективным для исследования термодинамических характеристик процесса электрохимической адсорбции аминокислот на поверхности платинового электрода и определения уровня бактериальной загрязненности, соответственно. Предложены методики получения электрохимически

модифицированных титановых образцов с различными морфологическими свойствами для биомедицинских исследований.

Методология и методы, использованные в диссертационной работе. Методологической основой диссертационной работы являлись научные работы в области электрохимической адсорбции аминокислот, исследования по формированию биопленок микроорганизмов на различных электродных материалах, а также работы по анодированию титана в различных электролитах и изучению биосовместимости оксидных покрытий. Клетки бактерий и фибробластов выращивали по классическим методам и протоколам. В электрохимической части диссертационной работы были использованы различные электрохимические методы, такие как СЭИ, ЦВА, анализ поляризационных кривых и хроноамперометрия – последнюю применяли для поляризации как Pt, так и Ti. Электрохимически модифицированные образцы титана, а также образцы платины с адгезированными клетками микроорганизмов были проанализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), атомной силовой микроскопии (АСМ), рентгеноспектрального электронно-зондового микроанализа (РСМА) и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). Адгезию фибробластов на образцах титана *in situ* также оценивали с помощью оптической микроскопии.

Положения, выносимые на защиту.

1. Низкомолекулярные модели активного центра остеокальцина подвергаются электростатической адсорбции с низкими значениями степени заполнения на поверхности поликристаллического платинового электрода в области потенциалов поляризации от −0,25 до 0,50 В.
2. Адгезия клеток *M. luteus* 1-I протекает на платиновом электроде более выраженно по сравнению с углеродными материалами, а наибольшая степень заполнения поверхности наблюдается при потенциалах поляризации 0,00-0,25 В.
3. Скорость коррозии титана в исследуемых условиях описывается экспоненциальной кривой, а анодная поляризация в диапазоне потенциалов 0,00-1,00 В способствует росту толщины оксидной пленки от 11 до 26 нм.
4. Повышение потенциала поляризации способствует увеличению среднеквадратичной шероховатости оксидной пленки титана и снижению адгезии фибробластов крысы.

Личный вклад автора. При непосредственном участии автора были поставлены цели и задачи исследования. Автором был выполнен анализ литературных данных по теме диссертации и проведены все электрохимические эксперименты с образцами титана и платины, а также подготовка образцов платины с адгезированными клетками для проведения СЭМ. Микробиологические эксперименты со штаммом *M. luteus* 1-I проведены совместно с сотрудниками лаборатории водной токсикологии НИИ биологии Иркутского государственного университета под руководством д.б.н. Д.И. Стома, эксперименты с использованием фибробластов крысы – с сотрудниками Иркутского научного центра

хирургии и травматологии под руководством д.м.н. С.Б. Никифорова. Морфологические исследования поверхности титановых образцов выполнены совместно с Е.А. Тюхай, Е.А. Корнюшовой (Иркутский государственный университет), к.х.н. О.Ю. Белозеровой, д.х.н. В.В. Акимовым, д.х.н. В.Л. Таусоном (Институт геохимии СО РАН); платиновых образцов с адгезированными клетками *M. luteus* 1-I – д.б.н. И.В. Клименковым (Лимнологический институт СО РАН). Синтез этилмалоновой кислоты был осуществлен А.Н. Шиловой и д.х.н. А.Ю. Рулевым, ЯМР анализ данного соединения проведен М.Д. Катериничем (ФИЦ Иркутский институт химии СО РАН). Автор также принимал участие в интерпретации полученных результатов. Подготовка материалов для публикаций осуществлялась преимущественно автором совместно с соавторами работ.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных экспериментальных данных подтверждена с помощью сочетания электрохимических и спектроскопических методов анализа, использованием современного сертифицированного оборудования, хорошей корреляцией результатов между собой при использовании повторностей, а также соответствием экспериментальных результатов данным, представленных в научной литературе.

Результаты работы представлены в 3 статьях в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК или индексируемых в международных системах научного цитирования Web of Science и Scopus. Опубликованы тезисы докладов на 8 российских и международных конференциях.

Полученные в ходе диссертационной работы результаты апробированы на отчетной научно-практической конференции химического факультета ИГУ (г. Иркутск, 2019 г.); IV Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» (г. Улан-Удэ, 2020 г.); XXXII Российской молодежной научной конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения профессора А. А. Тагер (г. Екатеринбург, 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии и переработки сельскохозяйственных культур», посвященной 110-летию ВНИИМК имени В.С. Пустовойта (г. Краснодар, 2022 г.); 62-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2024 (г. Новосибирск, 2024 г.); XXIV Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (г. Москва, 2024 г.); XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных-химиков с международным участием (г. Нижний Новгород, 2025 г.), VIII Всероссийской молодежной конференции с международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения профессора Ю.С. Залькинда и 85-летию со дня рождения профессора В.М. Берестовицкой (г. Санкт-Петербург, 2025 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы, а также приложения. Общий объем диссертационной работы составил 143 страницы, включая 29

рисунков, 14 таблиц, список литературы из 230 наименований и 1 приложения.

Плановый характер работы. Работа выполнена при финансовой поддержке темы государственного задания Минобрнауки РФ в сфере научной деятельности № 075-03-2020-176/3 (FZZE-2020-0022), гранта для молодых ученых Иркутского государственного университета № 091-24-310 (2024 г), именной стипендией Фонда стратегического и инновационного развития Иркутской области молодым талантливым исследователям и инженерам Иркутской области и Республики Бурятия (2024 г), а также совместного научного проекта № 21-54-12022 РФФИ и Немецкого научно-исследовательского сообщества (DFG).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **первой главе** диссертации представлены данные о характерных особенностях электрохимического поведения платины и титана в водных растворах. Описаны методы оценки емкости ДЭС Pt с помощью ЦВА и СЭИ в различных условиях. Приведен краткий обзор сведений о значениях емкости ДЭС монокристаллических платиновых электродов при использовании инертных фоновых электролитов. Рассмотрены различные методики анодирования поверхности Ti; проведен анализ влияния природы фонового электролита и величины E_{pol} на морфологию и коррозионную стойкость оксидной пленки титана и его сплавов. Описаны процессы клеточной адгезии и формирования биопленок на Pt и Ti, обсуждены факторы, которые могут способствовать или препятствовать прикреплению клеток к поверхностям исследуемых металлов.

Во **второй главе** диссертации описаны методики проведения электрохимических экспериментов. Адсорбцию низкомолекулярных модельных соединений на платиновом электроде оценивали по уменьшению количества электричества, затраченного на десорбцию водорода/кислорода (с помощью ЦВА) или емкости ДЭС (с помощью СЭИ). Пассивацию и скорость коррозии титана в исследуемых условиях анализировали с помощью ЦВА и поляризационных кривых, соответственно, а толщину оксидной пленки – с помощью СЭИ. Анодирование Ti проводили в диапазоне 0,00-1,00 В в потенциостатическом режиме. Все электрохимические эксперименты были проведены на потенциостате Autolab PGSTAT 128N (Metrohm) при использовании 0,1 М фосфатного буферного раствора (PBS) со значением pH = 7,4 в качестве фонового электролита.

Приведено описание культивации используемых бактерий *M. luteus* 1-I и фибробластов крысы Wistar (самец, возраст 3 месяца, вес 200-250 г), выполненное по соответствующим классическим методикам. Выбор клеток *M. luteus* 1-I обусловлен присутствием бактерий рода *Micrococcus* в микробиоте человека и условной патогенностью вида при снижении иммунитета[16], а также исследованиями электрохимических и

[16] Shi X. et al. // Frontiers in Pediatrics. 2023. Vol. 11. P. 1303040.

биотехнологических свойств клеток *M. luteus* 1-I в биотопливных элементах с электродами из углеродного волокна[17,18].

Эксперименты по выделению фибробластов проводили в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, регламентированными Международными руководящими принципами Ассоциации по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными, и протоколу, утвержденному Комитетом по этике Иркутского научного центра хирургии и травматологии.

Адгезия клеток фибробластов на поверхности титановых образцов была оценена с помощью биостанции BioStation CT (Nikon) и сканирующего электронного микроскопа MIRA 3 LMH (Tescan), шероховатость титановых образцов – на сканирующем зондовом микроскопе СММ-2000 (ПРОТОН-МИЭТ), а их химический состав поверхности – на спектрометре PHOIBOS 150 MCD-9 (SPECS). Факт прикрепления клеток *M. luteus* 1-I к поверхности платины подтверждали с помощью сканирующего электронного микроскопа Quanta 200 (FEI).

Третья глава посвящена обсуждению полученных результатов и состоит из четырех подразделов. Первый подраздел посвящен результатам изучения влияния катодной и анодной поляризации на адсорбцию модельных органических соединений и емкость ДЭС платинового электрода. Во втором подразделе приводятся результаты оценки бактериальной адгезии *M.luteus* 1-I на платиновом электроде и углеродных материалах в условиях анодной поляризации. В третьем подразделе представлены результаты электрохимических экспериментов, в которых показано влияние варьирования концентрации клеток *M. luteus* 1-I и времени выдерживания рабочего электрода в бактериальной суспензии на импедансные характеристики и формирование биопленки на поверхности Pt. В четвертом подразделе приводятся сведения о влиянии электрохимической поляризации на морфологические свойства и химический состав оксидной пленки титана, а также на адгезию фибробластов крысы.

Влияние потенциала поляризации на электрохимическую адсорбцию аминокислот

Для описания электрохимической адсорбции аминокислот на поверхности платинового электрода была использована электрическая эквивалентная схема вида [R(RC)(RQ)] (рисунок 1а).

[17] Stom D.I. et al. // Indian Journal of Microbiology. 2023. Vol. 63, № 1. P. 50–55.
[18] Chesnokova A.N. et al. // Russian Journal of Electrochemistry. 2023. Vol. 59, № 9. P. 660–665.

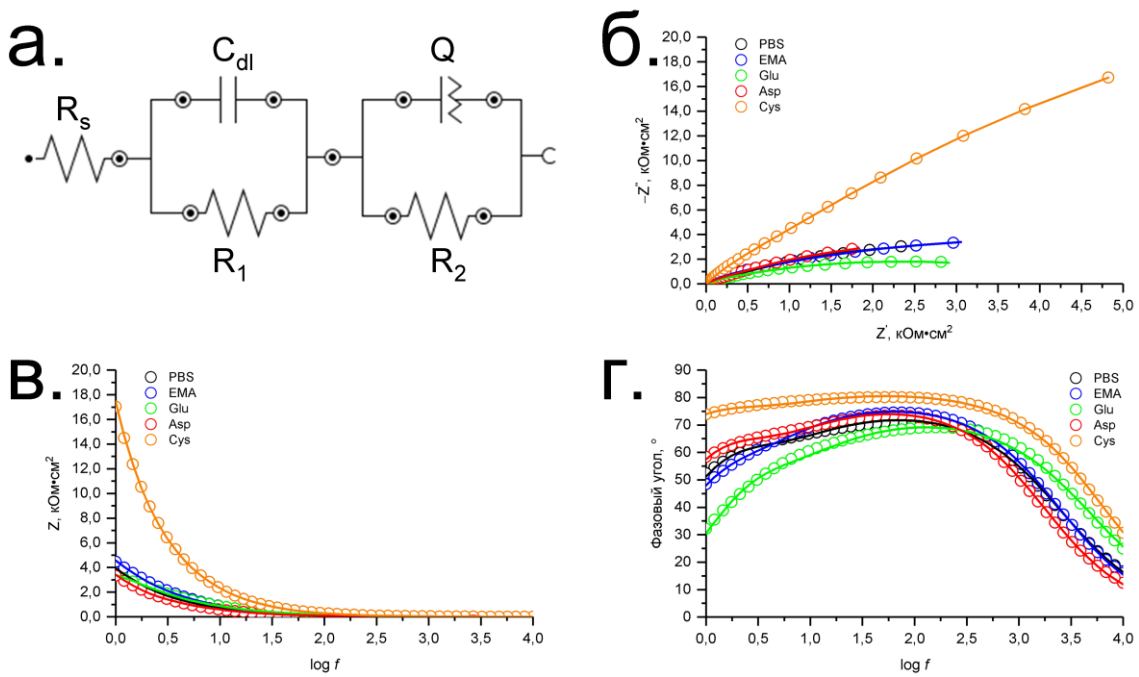


Рисунок 1. (а) Эквивалентная схема [R(RC)(RQ)], где R_s – сопротивление раствора; C – емкость ДЭС; R_1 – сопротивление переноса заряда через ДЭС; Q – элемент постоянной фазы, характеризующий емкость адсорбированного слоя C_{ads} (выражается адмиттансом Y_0 и фазовым числом N), R_2 – сопротивление переноса заряда через адсорбированный слой. (б) Диаграмма Найквиста и (в, г) диаграммы Боде, измеренные на платиновом электроде в PBS pH 7.4, а также при добавлении 1 мМ EMA, Glu, Asp и Cys. Потенциал поляризации E_{pol} равен 0,25 В. Линии – смоделированные кривые.

Электрохимическую адсорбцию выбранных соединений оценивали по величине степени заполнения Θ, которую рассчитывали по изменению количества электричества, затраченного на десорбцию водорода/кислорода (в случае циклической вольтамперометрии[10]), или емкости двойного электрического слоя (в случае спектроскопии электрохимического импеданса):

$$\Theta_{CV} = \frac{Q_H^0 - Q_H^x}{Q_H^0}, \quad (1)$$

$$\Theta_{CV} = \frac{Q_O^0 - Q_O^x}{Q_O^0}, \quad (2)$$

$$\Theta_{EIS} = \frac{C_{dl}^0 - C_{dl}^x}{C_{dl}^0}, \quad (3)$$

где Q_H^0 и Q_O^0 – количество электричества, затраченное на десорбцию водорода и кислорода с поверхности Pt в фоновом электролите; Q_H^x и Q_O^x – количество электричества, затраченное на десорбцию водорода и кислорода с поверхности Pt в фоновом электролите, содержащем конкурентный адсорбат-аминокислоту; где C_{dl}^0 и C_{dl}^x – емкость ДЭС, измеренная на Pt в фоновом

электролите в отсутствие и присутствии конкурентного адсорбата-аминокислоты.

Полученные результаты приведены на рисунке 2.

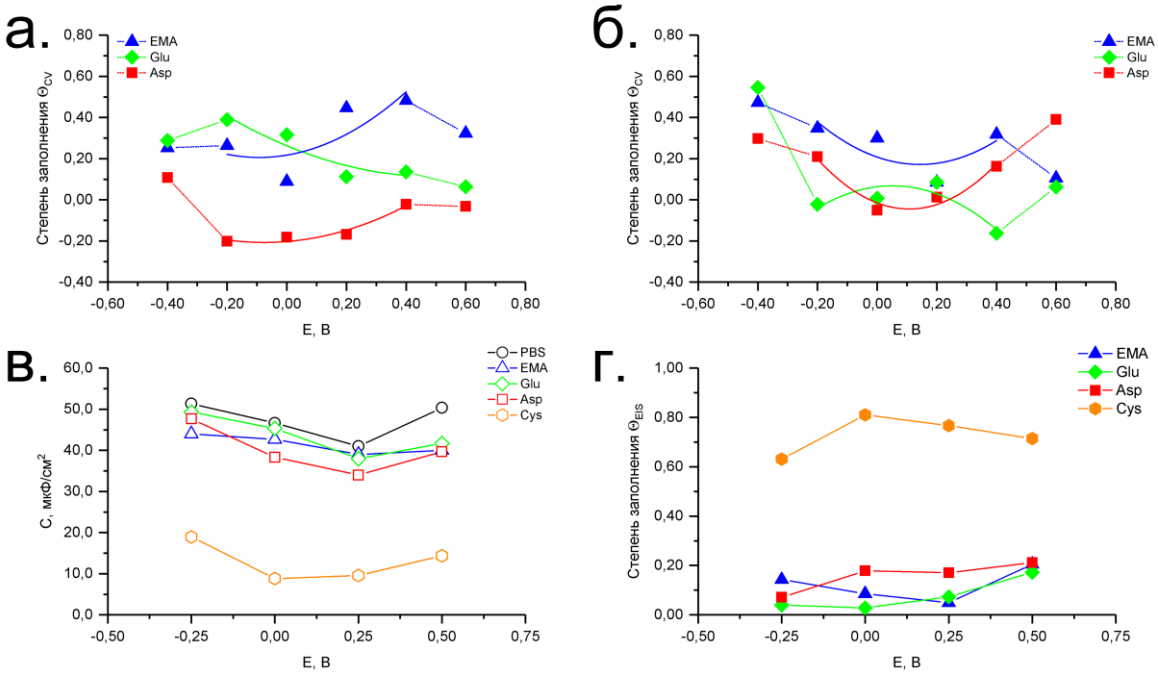


Рисунок 2. Оценка Θ_{CV} платинового электрода по водородному (а) и кислородному(б) пику десорбции в растворах 1 мМ EMA, Glu и Asp в зависимости от потенциала адсорбции E_{ads}. Время адсорбции t_{ads} = 50 с. (в) Зависимость C_{dl} и Θ_{EIS} (г) для PBS pH 7,4, а также при добавлении 1 мМ EMA, Glu, Asp и Cys от потенциала поляризации E_{pol}, В.

В целом, полученные значения Θ для модельных соединений могут свидетельствовать о том, что остатки γ-Glu, присутствующей в остеокальцине, не будут специфически адсорбироваться на платиновом компоненте биметаллического имплантата. Поскольку именно за счет γ-карбоксиглутаминовой кислоты происходит связывание кальция и его концентрирование в костной ткани, отсутствие взаимодействий между ней и платиновым электродом может положительно сказываться на динамике остеорегенерации.

Адгезия штамма *M. luteus* 1-I на платиновом, стеклоуглеродном и угольно-пастовом электроде в условиях анодной поляризации

Выбор наилучшего электродного материала для опытов с бактериальной адгезией был осуществлен путем проведения импедансных экспериментов в суспензиях *M. luteus* 1-I при анодной поляризации рабочего электрода. Для получения количественных характеристик емкости использовали эквивалентную схему [R(RC)(RQ)] для Pt (рисунок 3) и стеклоуглерода (GC); модифицированную схему Рэндлса-Эршлера вида [R(C[RQ])] – для угольно-пастового электрода (CPE).

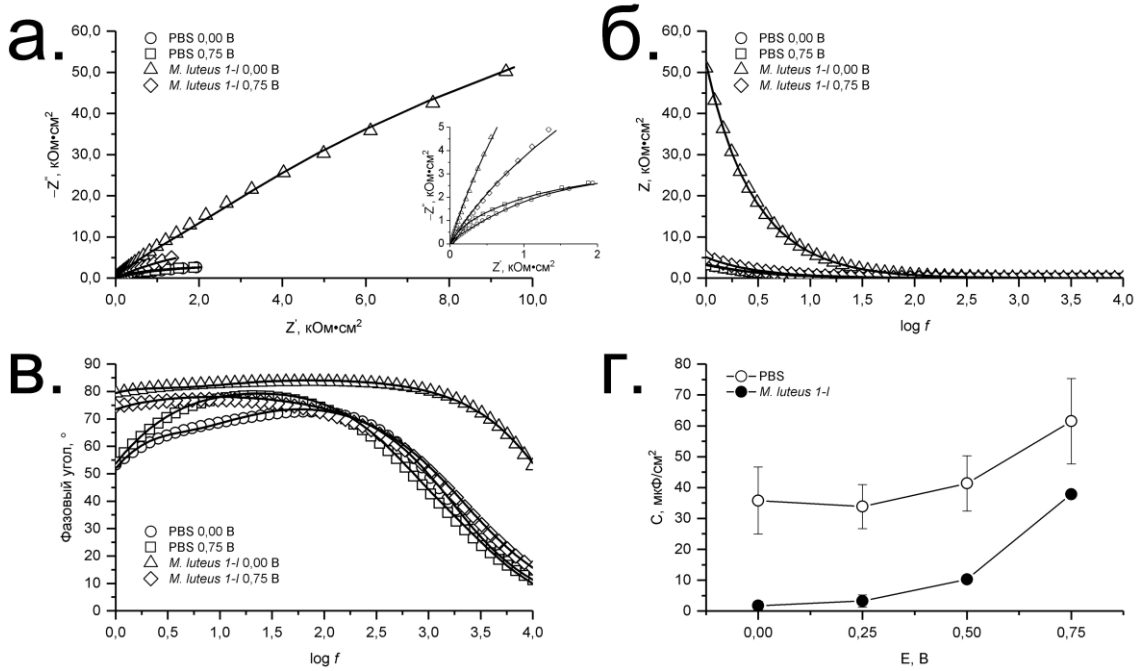


Рисунок 3. (а) Диаграмма Найквиста и (б, в) диаграммы Боде, измеренные на платиновом электроде в PBS pH 7,4 и бактериальной суспензии *M. luteus* 1-I (10 мл на 25 мл PBS) при потенциалах поляризации 0,00 В и 0,75 В. Линии – смоделированные кривые. (г) Зависимость емкости C_{dl} в PBS pH 7,4 и бактериальной суспензии *M. luteus* 1-I от потенциала поляризации (n = 3).

По мере роста потенциала поляризации значения Θ_{EIS} уменьшались, что связано с увеличивающейся адсорбцией кислородсодержащих частиц на поверхности платинового электрода. Исходя из высоких значений Θ_{EIS} с низкой погрешностью в области потенциалов 0,00-0,25 В, было принято решение использовать платину в качестве исследуемого электродного материала в процессах бактериальной адгезии в стационарных условиях (таблица 1).

Таблица 1. Значения Θ_{EIS} в условиях бактериальной адгезии *M. luteus* 1-I при анодной поляризации выбранных электродных материалов (n = 3).

E_{pol}, В	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00
Θ_{Pt}	0,97 ± 0,02	0,93 ± 0,02	0,72 ± 0,03	0,29 ± 0,10	–
Θ_{GC}	0,07 ± 0,08	0,27 ± 0,19	0,14 ± 0,26	0,17 ± 0,09	0,20 ± 0,12
Θ_{CPE}	0,84 ± 0,08	0,17 ± 0,20	0,07 ± 0,20	0,07 ± 0,22	0,13 ± 0,23

Адгезия штамма *M. luteus* 1-I на платиновом электроде в стационарных условиях

Следующим шагом диссертационного исследования являлось изучение влияния концентрации клеток и времени погружения платинового электрода в бактериальную суспензию. Данные измерения проводили при потенциалах разомкнутой цепи E_{OC}. Для анализа импедансных данных использовали эквивалентную схему [R(C[R(RQ)])], схожую с изображенной на рисунке 1а.

Использование эквивалентных условий, позволило сравнить изменения емкости при бактериальной адгезии *M. luteus* 1-I в стационарных условиях (при потенциалах разомкнутой цепи E_{OC}) и условиях анодной поляризации (таблица 2).

Таблица 2. Оценка величины Θ_{EIS}, характеризующей бактериальную адгезию в стационарных условиях и условиях анодной поляризации, соответственно.

Стационарные условия (различный объем суспензии в фоновом электролите, время выдерживания 1 час)				
V (*M. luteus* 1-I), мл	1,0	2,5	5,0	10,0
E_{OC}, мВ	69 ± 26	76 ± 24	29 ± 13	17 ± 23
Θ_{EIS}	0,39 ± 0,04	0,41 ± 0,07	0,48 ± 0,02	0,52 ± 0,03
Анодная поляризация (различные прикладываемые потенциалы отн. Ag/AgCl, V (*M. luteus* 1-I) = 10 мл)				
E_{pol}, мВ	0	250	500	750
Θ_{EIS}	0,97 ± 0,02	0,93 ± 0,02	0,72 ± 0,03	0,29 ± 0,10

Из сравнения величин Θ_{EIS} следует, что использование поляризации электродной поверхности при потенциале 0,00 В в течение 1 часа способствует более сильной бактериальной адгезии по сравнению с аналогичными экспериментами при стационарных потенциалах E_{OC} (очень близких к 0,00 В). Это может быть объяснено тем, что потенциостатическая анодная поляризация может способствовать более сильному электростатическому взаимодействию отрицательно заряженных клеточных стенок бактерий с поверхностью электрода, что положительно сказывается на адгезии клеток и формированию биопленок. Это условие справедливо для относительно низких анодных потенциалов поляризации, так как резкий рост величины E_{pol} приводит к образованию активных форм кислорода на электродной поверхности и гибели микроорганизмов.

Для подтверждения формирования биопленки микроорганизмов с помощью СЭМ была использована суспензия с наименьшим содержанием клеток исследуемого штамма. Результаты СЭМ показали присутствие клеток характерной сферической формы в виде агрегатов различных размеров – в среднем от 50 до 450 мкм^2 на поверхности платины через 2 суток (рисунок 4).

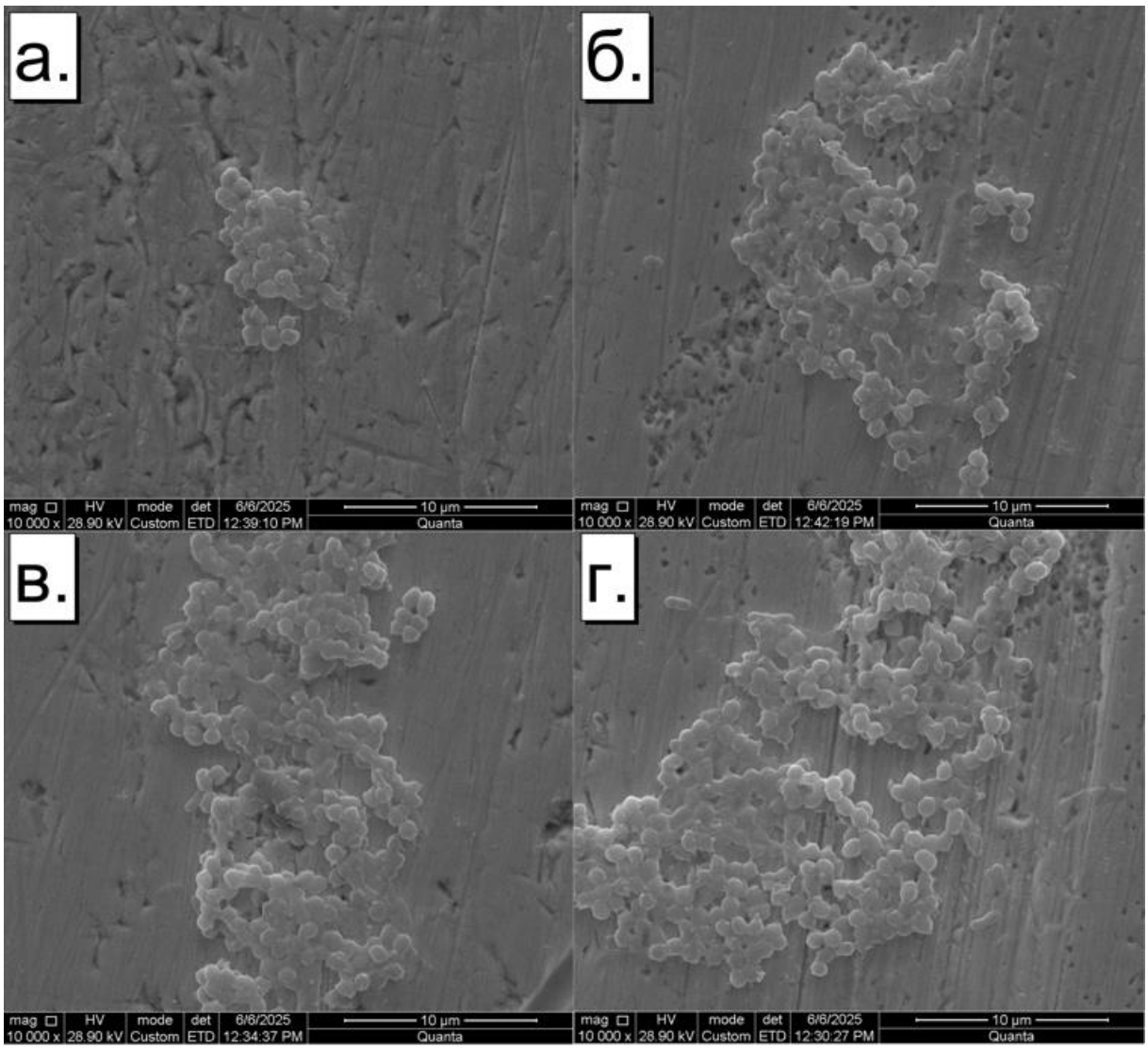


Рисунок 4. (а-г) Адгезия клеток *M. luteus* 1-I в различных участках платиновой пластины после ее инкубации в суспензии данных микроорганизмов (1мл/25 мл PBS) в течение 48 часов.

Влияние потенциала анодной поляризации и времени погружения титанового электрода на толщину его оксидной пленки и адгезию фибробластов крысы

При увеличении времени выдерживания титанового электрода в PBS pH 7,4 наблюдалось увеличение как потенциала разомкнутой цепи E_{OC}, так и потенциала пика анодного окисления титана E_{ox}. Плотность тока пика окисления j_{ox}, напротив, уменьшалась, что свидетельствовало об усиливающейся пассивации поверхности титанового электрода в исследуемых условиях.

На качественном уровне также наблюдалось смещение значения коррозионного потенциала E_{corr} и потенциала пассивации E_{pass} в анодную сторону при увеличении времени погружения. Плотность коррозионного тока j_{corr} и тока пассивации j_{pass} также уменьшалась.

Увеличение времени погружения титанового электрода в раствор, имитирующий биологическую среду, меняло и импедансные характеристики исследуемой системы. Для соответствия условиям вольтамперометрических

и поляризационных опытов, импедансные эксперименты проводили при потенциалах разомкнутой цепи E_{OC} в том же временном диапазоне и интервалах.

Экспериментальные данные (диаграммы Боде и Найквиста) анализировали с помощью эквивалентной схемы [R(C[R(RQ)])]. Значения элемента постоянной фазы Q конвертировали в псевдоемкость (эффективную емкость) C_{pseudo} по уравнению 4:

$$C_{pseudo} = Y_0^{\frac{1}{N}} \cdot R_1^{(\frac{1}{N}-1)} \quad (4)$$

Соотнесение участков (R_1C) и (R_2Q) к различным частям оксидной пленки проводили с помощью модели плоского конденсатора. Так как рассчитанные значения C оказались меньше чем C_{pseudo} для стационарных условий и условий анодной поляризации (см. ниже), то участок (R_1C) относили к широкой пористой части оксидной пленки, а участок (R_2Q) – к тонкому барьерному слою.

Использование полученных значений C и C_{pseudo} позволило рассчитать условную толщину внутреннего буферного слоя d_{BL} и внешнего поверхностного слоя d_{SL} оксидной пленки по формуле плоского конденсатора:

$$d_{BL} = \frac{\varepsilon_{r(BL)}\varepsilon_0 S}{C_{BL}}, \quad (5)$$

$$d_{PL} = \frac{\varepsilon_{r(PL)}\varepsilon_0 S}{C_{PL}}, \quad (6)$$

где d_{BL} и d_{PL} – толщина внутреннего барьерного слоя и внешнего пористого слоя оксидной пленки, соответственно; $\varepsilon_{r(BL)}$ и $\varepsilon_{r(PL)}$ – относительная диэлектрическая проницаемость внутреннего барьерного слоя и внешнего пористого слоя оксидной пленки; C_{BL} и C_{PL} – (эффективная) емкость внутреннего барьерного слоя и внешнего пористого слоя оксидной пленки.

Для оценки толщины оксидной пленки таким способом принимают условия, заключающиеся в использовании постоянного значения диэлектрической проницаемости ε_r для обоих слоев оксидной пленки. В данном исследовании использовали величину $\varepsilon_r = 100$.

В случае использования анодных потенциалов, на диаграммах Найквиста и Боде наблюдали еще большее увеличение импеданса в области малых частот ($f \rightarrow 1$ Гц) по мере роста прикладываемого анодного потенциала, а значения суммарной толщины оксидной пленки титанового электрода были прямо пропорциональны потенциалу поляризации (рисунок 5).

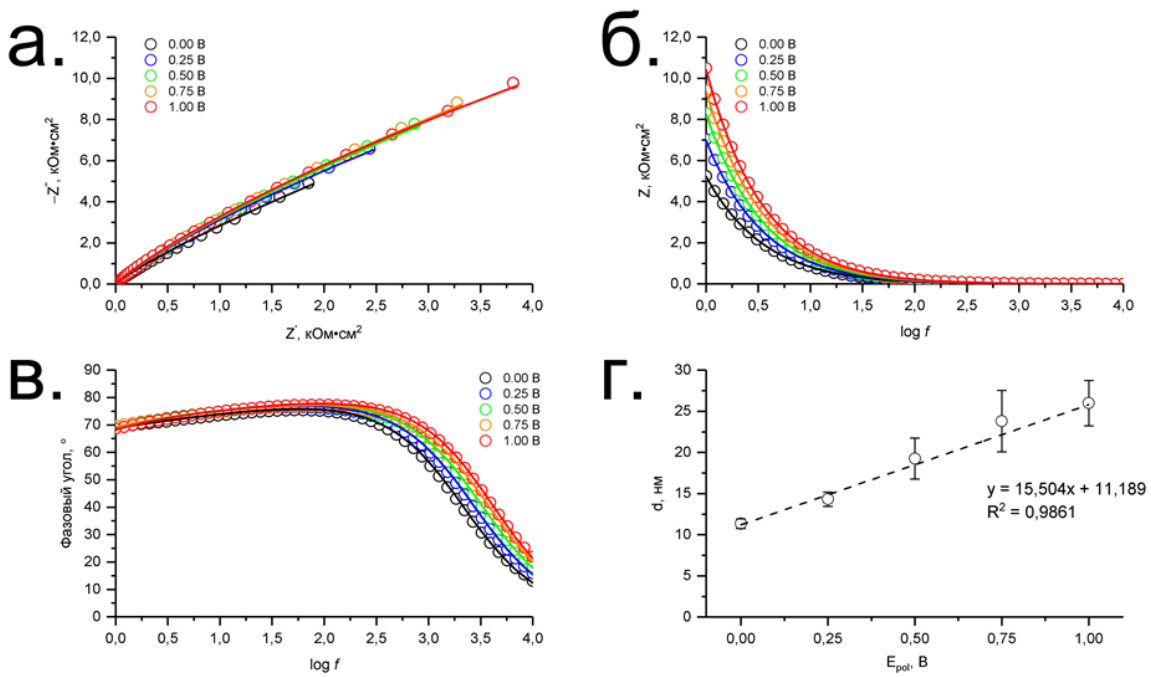


Рисунок 5. (а) Диаграмма Найквиста, а также диаграммы Боде (б, в), измеренные на титановом электроде в PBS pH 7,4 при различных анодных потенциалах поляризации. Линии – смоделированные кривые. (г) Зависимость суммарной толщины оксидной пленки (d_{BL} + d_{SL}) титанового электрода от налагаемого потенциала поляризации E_{pol}.

Результаты РСМА и АСМ показали однородность состава в образцах механически обработанного титана, а также титана после эксперимента в стационарных условиях и условиях анодной поляризации. Анодная поляризация способствовала повышению шероховатости титановых образцов (рисунок 6).

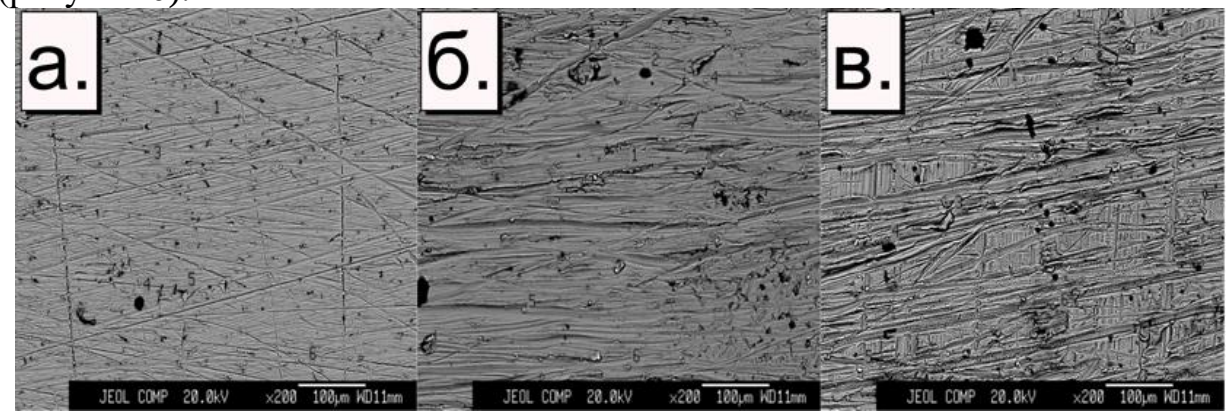


Рисунок 6. Изображения РСМА фронтального среза образцов титана в обратно рассеянных электронах. Увеличение 200х. Общий вид распределения неорганических фаз по поверхности в образцах: (а) механически обработанный Ti; (б) Ti в стационарных условиях (без поляризации); (в) поляризованный Ti (E_{pol} = 0,75 В).

Данные РФЭС также свидетельствовали об изменении соотношения между концентрациями структурных оксидных групп (O^{2-}) и терминальных гидроксильных групп (OH^-) для анодированных образцов титана по сравнению с неполяризованным контролем (рисунок 7).

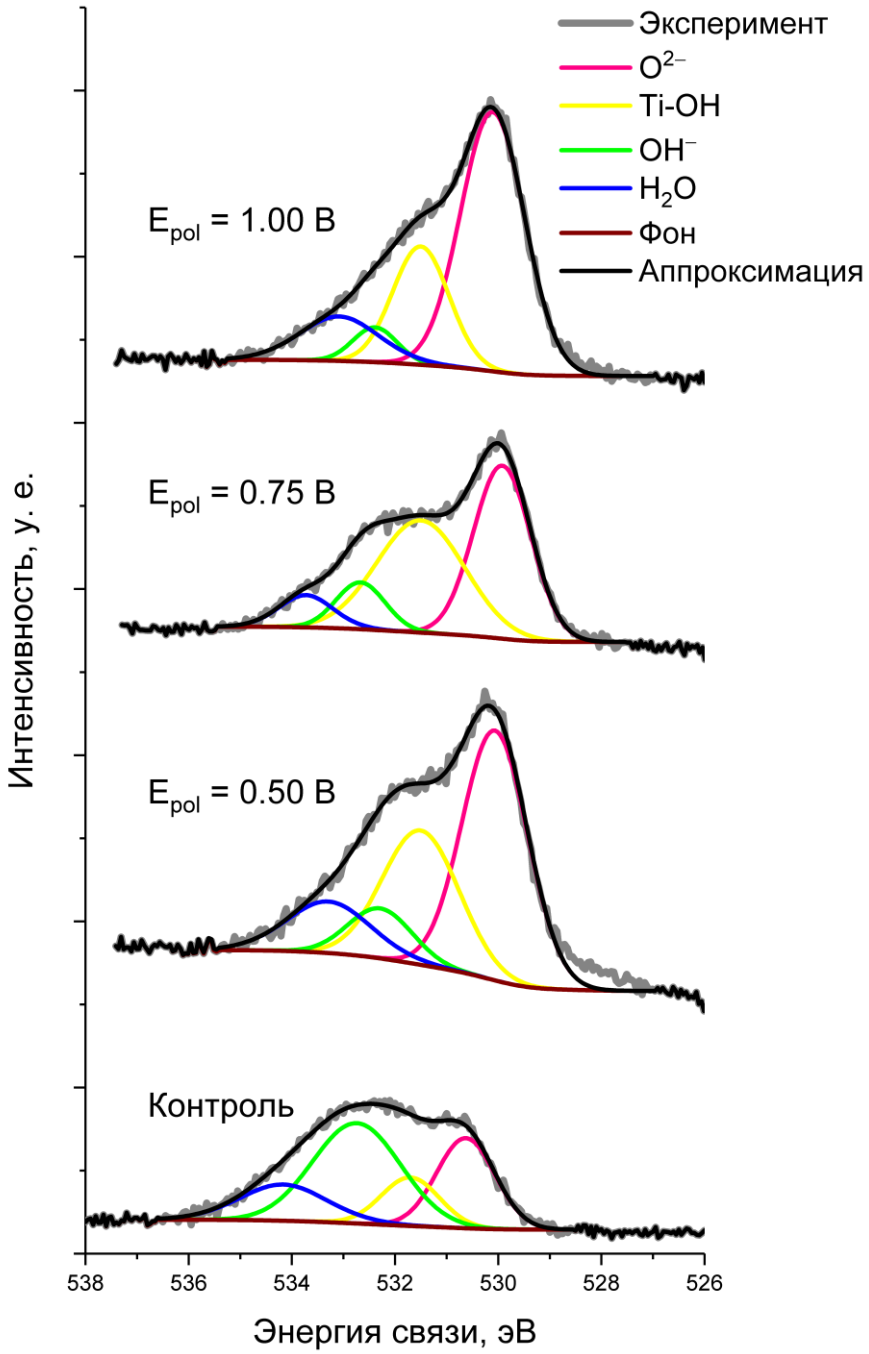


Рисунок 7. РФЭС спектры O 1s, полученные для контрольного образца и анодно поляризованного Ti в отсутствие травления аргоном.

В исследуемых условиях величина отношения площади пика O 1s (OH^-) к площади пика O 1s (O^{2-}) для неполяризованного контрольного образца Ti составила 1,67; для образцов, поляризованных при 0,50, 0,75 и 1,00 В – 0,19, 0,23 и 0,09, соответственно, что может свидетельствовать об увеличении гидрофильности поверхности оксидной пленки поляризованных образцов титана[19].

Анализ изображений, полученных с Nikon BioStation CT показывает, что адгезия фибробластов в зоне взаимодействия клеток с поверхностью

[19] Lee M.-K., Park Y.-C. // Thin Solid Films. 2017. Vol. 638. P. 9–16.

титана в большей степени обнаруживается на образцах титана, поляризованного при низких E_{pol} (рисунок 8).

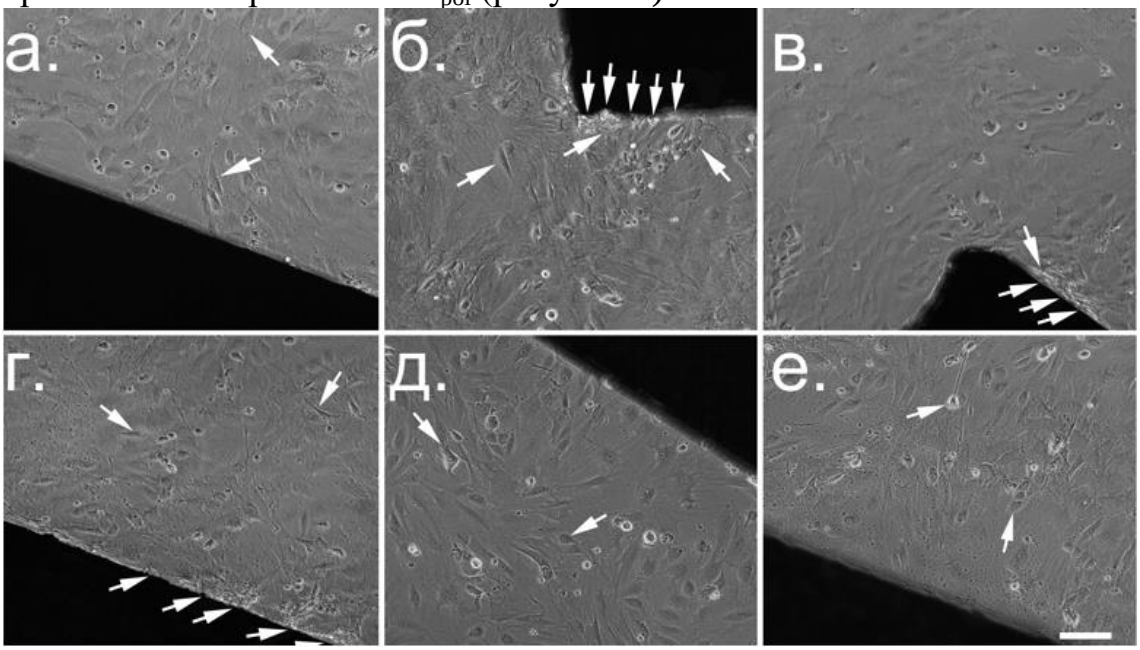


Рисунок 8. Фибробласты (показаны стрелками) на образцах неполяризованного (а) и анодно поляризованного титана при потенциалах 0,00 В (б); 0,25 В (в); 0,50 В (г); 0,75 В (д) и 1,00 В (е) на третий день эксперимента. Увеличение количества фибробластов на образцах титана, поляризованных при низких анодных потенциалах (б, в, г), показано стрелками на черном фоне. Темные области изображений соответствуют образцам титана, светлые – пластику с культивированными фибробластами. Масштабная линейка соответствует 100 мкм.

В процессе этих экспериментов было выявлено, что титановые пластины, поляризованные при 0,00 В; 0,25 В; 0,50 В проявляют свойства биосовместимости, что подтверждается активной адгезией фибробластов непосредственно на образце и повышением пролиферативной активности клеток, взаимодействующих с титановой пластиной. Дальнейшее увеличение потенциала поляризации до 0,75 В и 1,00 В способствует снижению данных показателей у тестируемых образцов и уменьшению плотности культуры клеток в непосредственной близости от поверхности пластин.

Морфология анодно поляризованных образцов титана с адгезированными фибробластами была также проанализирована с помощью СЭМ. Результаты представлены на рисунке 9.

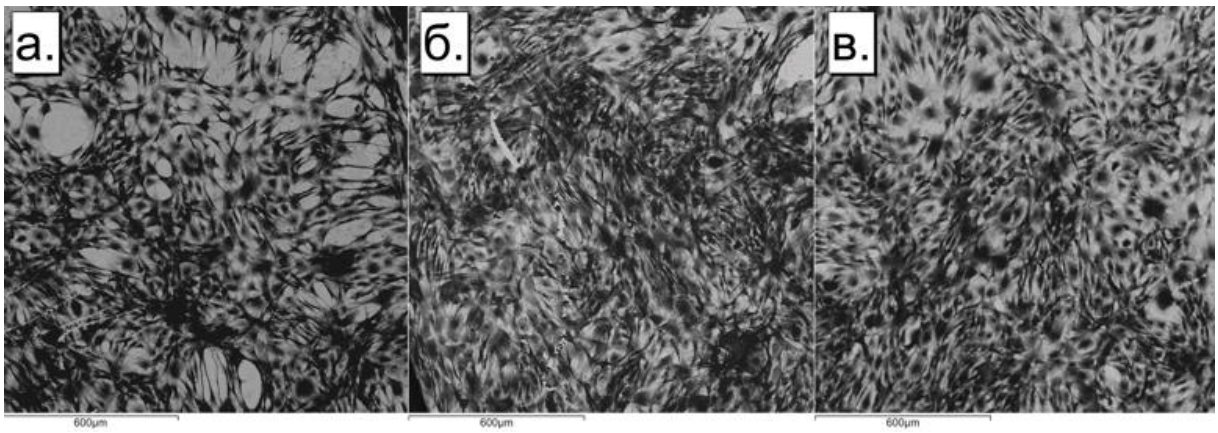


Рисунок 9. Изображения СЭМ (в режиме обратно рассеянных электронов) фибробластов на образцах титана, поляризованного при потенциалах 0,00 В (а), 0,25 В (б) и 1,00 В (в).

Проведенный элементный анализ показал, что темные участки на СЭМ изображениях соответствуют фибробластам, а светлые – поверхности титановых образцов.

Количественная оценка адгезивных свойств осуществлялась путем сравнения параметров шероховатости (площадь проекции А, полная площадь поверхности с учетом шероховатости $S_{об}$, объем V) снимков оптической микроскопии (см. рисунок 8) в двух зонах: в объеме питательной среды для фибробластов и, непосредственно, у поверхности титановой пластины. На основе этих данных были рассчитаны соотношения, определяющие степень адгезии K^{ad}. Физический смысл K^{ad} заключается в том, что она показывает, во сколько раз приповерхностная область вблизи титана толще, чем такая же область в питательной среде фибробластов. Увеличение величины K^{ad} означало более активное взаимодействие фибробластов с поверхностью титановых образцов.

Несмотря на определенную корреляцию между адгезией фибробластов к поверхности оксидной пленки и соотношением пиков O 1s РФЭС, гораздо большее влияние на величину K^{ad} оказала среднеквадратичная шероховатость поверхности оксидной пленки R_a (рисунок 10).

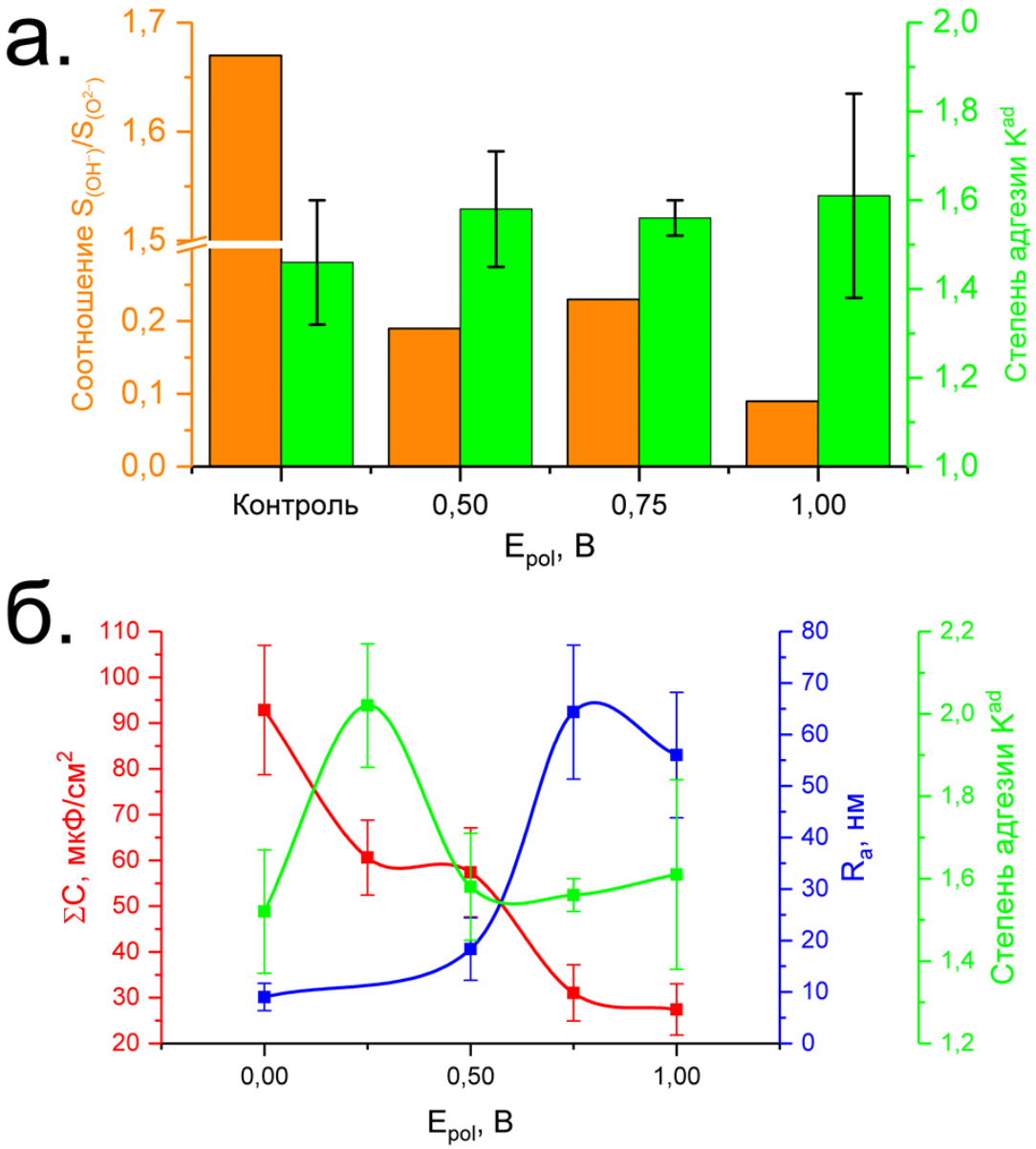


Рисунок 10. (а) Влияние величины потенциала поляризации E_{pol} на соотношение пиков РФЭС O 1s, пропорциональное гидрофильности оксидной поверхности (без травления Ar^+), и степень адгезии K^{ad}. (б) Зависимость суммарной емкости оксидной пленки титана ΣC (n = 3), степени адгезии K^{ad} (n = 4) и среднеквадратичной шероховатости поверхности R_a (различные области сканирования, n = 3) от потенциала поляризации титановых образцов.

Таким образом, титановые пластины с низкими значениями R_a показали свою биосовместимость *in vitro* и могут быть использованы для повторных модельных экспериментов с другими клетками, например, остеобластами и мезенхимальными стволовыми клетками. Образцы с высокими значениями R_a являются перспективными для получения биоактивных покрытий на основе гидроксиапатита, после чего их биосовместимость может быть снова проверена на модельных клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам диссертационного исследования можно сделать **основные выводы**:

1. Продемонстрирована эффективность комплексного подхода с использованием ряда электрохимических и спектроскопических методов для оценки поведения биосовместимых металлов платины и титана, часто использующихся для различных биомедицинских исследований и операций, в реальных биосредах в условиях слабых поляризаций металлов.

2. Установлено, что электрохимическая адсорбция моделей активного центра белка остеокальцина на Pt в исследованной области потенциалов адсорбции не превышает величины степени заполнения поверхности образца Θ = 0,25 (по данным СЭИ) и 0,55 (по данным ЦВА) как при катодной, так и при анодной поляризации, что указывает на ожидаемое слабое влияние адсорбции γ-карбоксиглутаминовых фрагментов остеокальцина на состояние поверхности слабополяризованной платины.

3. Показано, что бактериальная адгезия штамма *M. luteus* 1-I на поверхности платины протекает с более высокими значениями степени заполнения Θ по сравнению с углеродными электродными материалами, а значения степени заполнения близки к полученным при хемосорбции цистеина на платине. Поляризация в диапазоне потенциалов 0,00-0,25 В, а также увеличение концентрации бактерий и времени погружения платинового электрода в суспензию микроорганизмов приводят к увеличению величины Θ. Увеличение потенциала поляризации приводит к росту емкости двойного электрического слоя и уменьшению адгезии клеток *M. luteus* 1-I.

4. Установлено, что скорость пассивации Ti снижается линейно, а скорость коррозии – экспоненциально от времени при погружении титанового электрода в фоновый электролит, моделирующий биологическую среду. Значения толщины оксидной пленки титана, рассчитанные по данным СЭИ, находятся в диапазонах 8-11 нм для экспериментов, проведенных при потенциалах разомкнутой цепи, и 12-26 нм для экспериментов в условиях анодной поляризации.

5. В соответствии с кинетической моделью Батлера-Фольмера, даже незначительные (до 0,25 В) изменения потенциала анодирования оказывают существенное влияние на морфологию оксидной пленки титана, при этом увеличение потенциала поляризации способствует не только росту толщины оксидной пленки, но и ее неоднородности. Образцы титановых электродов с наибольшей среднеквадратичной шероховатостью в условиях выполненных экспериментов были получены при потенциале анодной поляризации 0,75 В, однако наиболее выраженная адгезия фибробластов крысы наблюдалась на образцах, поляризованных при потенциале 0,25 В.

Результаты исследования электрохимического поведения Pt и Ti в условиях, близких к физиологическим, а также морфологии поверхностей данных металлов рекомендуются для оптимизации режимов обработки

имплантатов для остеосинтеза и электродов кардиостимуляторов/нейропротезов с целью повышения их биосовместимости.

Предложенные в диссертационной работе комплексные методики исследования свойств Pt и Ti с помощью электрохимических и спектроскопических методов рекомендуется внедрить в практику профильных лабораторий для проведения экспресс-оценки коррозионной стойкости и биосовместимости перспективных медицинских сплавов *in vitro*.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНО В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ:

1. Research of the adhesion of the strain *Micrococcus luteus 1-I* on various electrode materials by electrochemical impedance spectroscopy / **D.Y. Amsheev**, A.V. Kashevskii, D.I. Stom, I.A. Topchiy, A.Y. Safronov // AIP Conf. Proc. – 2023. – Vol. 2777. – A.N. 020020.
2. Osteocalcin active center models: Electrochemical adsorption on platinum and quantum chemical analysis / **D.Y. Amsheev**, A.V. Kashevskii, E.A. Kornyushova, A.A. Manzhueva, V.B. Orel, P.B. Parakhina, A.Y. Safronov, A.N. Shilova // Electrochim. Acta. – 2023. – Vol. 437. – A.N. 141466.
3. Morphology and biological characteristics of the electrochemically modified titanium surface / **D.Yu. Amsheev**, A.V. Kashevskii, I.A. Ponomarenko, A.Yu. Safronov, V.V. Akimov, V.L. Tauson, O.Yu. Belozerova, I.V. Klimenkov, I.A. Shurygina, N.N. Dremina, I.S. Trukhan, E.A. Lozovskaya, A.S. Zavyalova, S.B. Nikiforov // Bioelectrochemistry. – 2026. – Vol. 168. – A.N. 109156.

Автор выражает свою искреннюю благодарность коллегам из лаборатории бионеорганической электрохимии химического факультета ИГУ, в частности канд. хим. наук (PhD) Алексею Валерьевичу Кашевскому и д-ру. хим. наук, проф. Александру Юрьевичу Сафронову, а также всем соавторам за интересную совместную работу.