

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Байкальский музей Сибирского отделения Российской академии наук»
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Иркутский государственный университет»

На правах рукописи

Амшеев Дмитрий Юрьевич

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ПЛАТИНЫ И ТИТАНА В
РАСТВОРАХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ СРЕДУ**

1.4.6 Электрохимия

**Диссертация
на соискание ученой степени кандидата химических наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Стом Д.И.

Черноголовка – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ПЛАТИНЫ И ТИТАНА В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> (обзор литературы).....	15
1.1 Электрохимическое поведение поверхности платины в водных электролитах.....	15
1.1.1 Определение емкости двойного электрического слоя электрохимическими методами.....	15
1.1.2 Емкость двойного электрического слоя платиновых электродов в водных растворах.....	19
1.2 Электрохимическое поведение поверхности титана в водных электролитах.....	24
1.2.1 Электрохимические свойства титана и его оксидной пленки.....	24
1.2.2 Анодирование поверхности титана и его сплавов.....	28
1.3 Электрохимическое поведение аминокислот на поверхности Pt.....	34
1.4 Электрохимическое взаимодействие платины с компонентами биологических систем.....	40
1.5 Влияние свойств электрохимически модифицированной поверхности титана и его сплавов на адгезию клеток.....	46
1.6 Заключение к главе 1.....	50
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	52
2.1 Модели активного центра остеокальцина.....	52
2.2 Электрохимические измерения в условиях отсутствия биологических объектов.....	54
2.3 Культивирование, приготовление суспензий и электрохимические эксперименты со штаммом <i>M. luteus</i> 1-I.....	58
2.4 Культивирование фибробластов крысы и подготовка анодно поляризованных титановых образцов.....	60

2.5 Морфологические исследования поверхности образцов титана	62
2.6 Заключение к главе 2	64
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	66
3.1 Влияние потенциала поляризации на адсорбцию модельных соединений на платиновом электроде	66
3.1.1 Циклическая вольтамперометрия.....	66
3.1.2 Спектроскопия электрохимического импеданса. Влияние потенциала поляризации на импедансные характеристики исследуемых систем	70
3.1.3 Влияние потенциала поляризации на толщину двойного электрического слоя	75
3.2 Адгезия штамма <i>M. luteus</i> 1-I на платиновом, стеклоуглеродном и угольно-пастовом электроде в условиях анодной поляризации.....	77
3.3 Адгезия штамма <i>M. luteus</i> 1-I на платиновом электроде в стационарных условиях.....	84
3.3.1 Импеданс платинового электрода в бактериальных суспензиях <i>M. luteus</i> 1-I.....	84
3.3.2 Сканирующая электронная микроскопия.....	89
3.4 Влияние потенциала анодной поляризации и времени погружения титанового электрода на толщину его оксидной пленки и адгезию фибробластов крысы	91
3.4.1 Циклическая вольтамперометрия и поляризационные кривые	91
3.4.2 Влияние времени погружения титанового электрода на его импедансные характеристики	92
3.4.3 Влияние анодной поляризации титанового электрода на его импедансные характеристики	94
3.4.4 Рентгеноспектральный анализ анодно поляризованных образцов титана.....	99
3.4.5 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия анодно поляризованных образцов титана.....	100

3.4.6 Определение шероховатости анодно поляризованных образцов титана.....	103
3.4.7. Влияние морфологических свойств образцов титана на адгезивные свойства и пролиферативную активность фибробластов.	105
3.6 Заключение к главе 3	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117
ПРИЛОЖЕНИЕ	141

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСМ	атомно-силовая микроскопия
ДЭС	двойной электрический слой
РСМА	рентгеноспектральный электронно-зондовый микроанализ
РФЭС	рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
СЭИ	спектроскопия электрохимического импеданса
ЦВА	циклическая вольтамперометрия
ЭДС	энергодисперсионная спектроскопия
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
Asp	аспарагиновая кислота
C_{ads}	емкость адсорбированного слоя
C_{dl}	емкость двойного электрического слоя
CPE	угольно-пастовый электрод
Cys	цистеин
d_{dl}	толщина двойного электрического слоя
d_{BL}	толщина внутреннего барьерного слоя оксидной пленки Ti
d_{SL}	толщина внешнего поверхностного слоя оксидной пленки Ti
E_{ads}	потенциал адсорбции
E_{OC}	потенциал разомкнутой цепи
E_{pol}	потенциал поляризации
E_{pzc}	потенциал нулевого заряда
ЕМА	этилмалоновая кислота
GC	стеклоуглеродный электрод
Glc	глюкоза
Glu	глутаминовая кислота
γ -Glu	гамма-карбоксиглутаминовая кислота
PBS	фосфатный буферный раствор
Q	элемент постоянной фазы
Q_H	количество электричества, затраченное на десорбцию водорода с поверхности Pt

Q_o	количество электричества, затраченное на десорбцию кислорода с поверхности Pt
R_a	среднеквадратичная шероховатость оксидной поверхности Ti
Θ	степень заполнения
Θ_{CV}	степень заполнения, рассчитанная с помощью циклической вольтамперометрии
Θ_{EIS}	степень заполнения, рассчитанная с помощью спектроскопии электрохимического импеданса

ВВЕДЕНИЕ

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 [3–5].

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 функциональные группы 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 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) [10–12], 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.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Изучение влияния потенциала поляризации платинового электрода на адсорбцию этилмалоновой (ЕМА), аспарагиновой (Asp), глутаминовой (Glu) кислоты, а также цистеина (Cys).
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 ЕМА, 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-И протекает на платиновом электроде более выражено 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, анализ спектров ядерного магнитного резонанса (ЯМР) 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 результатов. 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, представленным 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 [16–18]. Опубликовано 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 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).

ГЛАВА 1. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ПЛАТИНЫ И ТИТАНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO* (обзор литературы)

В данной главе рассматриваются общие электрохимические свойства таких биосовместимых металлов как платина и титан, а также приложения вольтамперометрических методов и СЭИ для определения характеристик ДЭС на границе Pt/электролит, и морфологических свойств оксидной пленки Ti и его сплавов. Описаны закономерности электрохимического поведения различных аминокислот с поверхностью платины, а также механизмы взаимодействия клеток как прокариот, так и эукариот с поверхностью исследуемых металлов.

1.1 Электрохимическое поведение поверхности платины в водных электролитах

1.1.1 Определение емкости двойного электрического слоя электрохимическими методами

Двойной электрический слой (ДЭС) – это структура на поверхности раздела фаз, представляющее собой совокупность заряженных частиц и ориентированных диполей на межфазной границе [19]. ДЭС состоит из слоя электронов (если неэлектролитическая фаза является металлическим или неметаллическим электронным проводником), а также адсорбированного слоя, который содержит молекулы растворителя и адсорбированные частицы (ионы или молекулы) электролита. Этот слой также называется слоем Гельмгольца или слоем Штерна [20]. При наличии специфической адсорбции слой Гельмгольца можно разделить на две области: внутренний слой (ИНР), в котором находятся хемосорбированные частицы и молекулы растворителя, и внешний слой (ОНР) с электростатически адсорбированными частицами [19,21].

Также ДЭС характеризуется наличием диффузионного слоя, образующегося из-за теплового движения электростатически адсорбированных ионов, что приводит к их распределению в области,

простирающейся от слоя Гельмгольца/Штерна вглубь раствора электролита [22].

Одной из важнейших характеристик ДЭС является его емкость C , которая представляет собой отношение скорости изменения накопленного заряда или поверхностного заряда (σ , Кл) к скорости изменения напряжения между поверхностями или электрического поверхностного потенциала (ψ , В), что показано в уравнении 1 [23].

$$C = \frac{d\sigma}{d\psi} \quad (1)$$

В модели Гуи-Чепмена-Штерна, общая емкость ДЭС C_{dl} представляет собой комбинацию двух последовательно соединенных конденсаторов, т.е. емкости слоя Гельмгольца C_{HL} и емкости диффузионного слоя Гуи-Чепмена C_{GCL} [24]:

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_{HL}} + \frac{1}{C_{GCL}} \quad (2)$$

Наиболее распространенными аналитическими методами определения емкости ДЭС являются ЦВА и СЭИ. В методе ЦВА используется линейное увеличение налагаемого потенциала, а соответствующий отклик тока может быть нормализован по скорости наложения потенциала для получения дифференциальной емкости [25]. Если единственным процессом, происходящим в диапазоне используемых потенциалов, является заряд ДЭС, то есть движение ионов по обе стороны границы раздела электрод/электролит, то этот ток I связан с емкостью ДЭС C_{dl} следующим образом [26]:

$$I = C_{dl} \frac{dE}{dt} = C_{dl} \nu, \quad (3)$$

$$C_{dl} = \frac{I}{\nu} = \frac{Q}{\Delta E}, \quad (4)$$

где v – скорость развертки потенциала, В/с; Q – количество электричества, потраченное на заряджение ДЭС, Кл; ΔE – диапазон потенциалов циклической вольтамперограммы, В.

Таким образом, определение емкости ДЭС с помощью ЦВА заключается в измерении циклических вольтамперограмм с различными скоростями сканирования в области потенциалов, где отсутствуют окислительно-восстановительные процессы, извлечении значений I из зарегистрированных вольтамперограмм и последующем расчете C_{dl} из наклона полученного графика зависимости $I = f(v)$.

В потенциостатическом режиме СЭИ потенциал синусоидально изменяется вокруг выбранной величины потенциала E с определённой амплитудой ΔE , которая обычно мала (от 2 до 10 мВ), так что отклик системы является линейным [27,28]. В таком случае, электрический импеданс $Z(\omega)$ на угловой частоте ω представляет собой отношение налагаемого потенциала $V(\omega)$ к силе переменного тока $I(\omega)$. Он состоит из действительной $Z'(\omega)$ и мнимой $Z''(\omega)$ частей согласно уравнению 5:

$$Z(\omega) = \frac{V(\omega)}{I(\omega)} = Z'(\omega) + iZ''(\omega) \quad (5)$$

Использование определенного диапазона различных частот переменного тока в этом методе позволяет провести деконволюцию полученного сигнала [29]. Полученные результаты анализируют с помощью электрической эквивалентной схемы (ЕЕС), симулирующей процессы, которые протекают в электрохимической ячейке [30]. Эквивалентная схема состоит из набора как «классических» электрических (резисторы, конденсаторы и т.д.), так и специальных электрохимических компонентов, например, элемента постоянной фазы (Q). У каждой составляющей ЕЕС существует собственный импеданс, который зависит от типа компонента. Так, импеданс конденсатора, который используется для обозначения емкости исследуемой системы и емкости ДЭС, в частности, выражается следующим образом [31]:

$$C(\omega) = \frac{1}{i\omega Z(\omega)} = C'(\omega) - iC''(\omega) \quad (6)$$

$$C' = -\frac{Z''}{\omega(Z'^2 + Z''^2)} \quad (7)$$

$$C'' = \frac{Z'}{\omega(Z'^2 + Z''^2)} \quad (8)$$

При использовании монокристаллических электродов и фоновых электролитов, чьи ионы не подвергаются специфической адсорбции, емкость ДЭС возможно описать с помощью эквивалентной схемы, состоящей из резистора R_s , соответствующего сопротивлению электролита, и конденсатора C_{dl} [32,33]. Однако, в экспериментальных условиях с помощью конденсатора не всегда удастся полноценно описать емкостные свойства двойного слоя. Исследователи объясняют это многими причинами, например, дисперсией емкости из-за шероховатой поверхности электрода [34], адсорбции следов примесей [35] или неоднородным распределением тока/потенциала из-за дисковой геометрии электрода [36,37]. В таких случаях емкость моделируют с помощью элемента постоянной фазы (уравнение 9).

$$Z_Q = \frac{1}{Y_0(i\omega)^N} \quad (9)$$

где Y_0 – адмиттанс Q , выражаемый в $См \cdot с^N$, а N – фазовое число Q , принимающее значение от 0 до 1.

При $N = 0$, Q является резистором, а при $N = 1$ – конденсатором. В диапазоне значений $0,8 < N < 1$, из Q возможно вычислить эквивалентную (эффективную) емкость C_{eff} различными способами, используя резисторы R_s (сопротивление раствора) и R_p (поляризационное сопротивление/сопротивление переноса заряда) [27,38–40]. В этом случае последний подключается параллельно элементу постоянной фазы.

В целом, значения емкости C_{dl} , рассчитанные с помощью СЭИ, характеризуются меньшими значениями, чем аналогичные, полученные при

анализе вольтамперограмм. Это происходит из-за вклада емкости C_{ads} хемосорбции молекул растворителя и фонового электролита в значение C_{dl} [41]. Использование эквивалентных схем с сочетанием двух конденсаторов и/или элементов постоянной фазы позволяет разделить емкости C_{dl} и C_{ads} , что делает СЭИ более точным методом определения емкости ДЭС.

1.1.2 Емкость двойного электрического слоя платиновых электродов в водных растворах

Платина является очень важным и хорошо изученным материалом, широко используемым в различных технологических направлениях, в частности, каталитическом. Основной причиной этого является высокая эффективность платины в электрохимических реакциях выделения водорода (HER) и восстановления кислорода (ORR). В связи с этим, изучение структуры ДЭС платиновых электродов в водных электролитах имеет высокое значение для понимания деталей механизмов данных реакций, а также оптимизации условий, а актуальность таких исследований подтверждается большим количеством новых публикаций в ведущих мировых журналах.

Наиболее часто свойства ДЭС анализируют в системах, состоящих из монокристаллического платинового электрода (как правило, Pt(111)) и фонового электролита, ионы которого не подвергаются специфической адсорбции на поверхности платины, например, $HClO_4$ и ее соли. В таких условиях наблюдается «истинная» двойнослойная область в диапазоне от 0,40 до 0,60 В отн. обратимого водородного электрода (ОВЭ), в которой поверхность монокристаллической платины свободна от адсорбатов и идеально поляризуема [42,43]. Вне этой области, электрохимическая адсорбция водорода (область H_{ads} ; от 0,05 до 0,40 В отн. ОВЭ) и кислорода (область OH_{ads} ; от 0,60 до 0,85 В отн. ОВЭ) приводит к появлению эффективной емкости C_{ads} [44,45].

Использование модели Гуи-Чепмена-Штерна (см. уравнение 2) позволяет описать зависимость изменения емкости ДЭС от прикладываемого

потенциала. На такой кривой будет наблюдаться минимум Гуи-Чепмена при определенном потенциале электрода, называемом потенциалом нулевого заряда (E_{pzc}) [46]. При удалении от E_{pzc} в катодном и анодном направлениях C_{dl} растет, а затем уменьшается, что приводит к форме кривой с двумя максимумами и одним минимумом. Появление максимумов обычно указывает на скопление ионов фонового электролита вблизи поверхности электрода, которые обычно асимметричны из-за разного размера катионов и анионов. Два максимума сближаются и, в конечном итоге, сливаются в один пик по мере того, как раствор электролита становится все более концентрированным. [47,48].

Так, было показано отсутствие минимума Гуи-Чепмена для емкости C_{dl} при использовании электрода из Pt(111) и фонового электролита, состоящего из смеси 0,1 М $KClO_4$ и 1 мМ $HClO_4$ [33]. Вместо этого авторы наблюдали максимальное значение емкости ДЭС вблизи E_{pzc} ($\approx 0,6$ В отн. ОВЭ). Аналогичные результаты те же были получены для Ir(100) в 0,1 М HCl [21].

В свою очередь, минимумы Гуи-Чепмена для Pt(111) в электролитах 0,05 М $MeClO_4$ ($Me = Li, Na, K, Rb, Cs$), однако при потенциалах на 0,2 В ниже E_{pzc} , наблюдали в работе [49]. Минимум емкости для Pt(111) в 0,1 мМ $HClO_4$ был обнаружен в работах [43,50,51]. Данный минимум Гуи-Чепмена превращался в максимум вблизи E_{pzc} при увеличении концентрации фонового электролита более чем на 1 мМ, что качественно согласуется с предыдущими наблюдениями [21,33].

Согласно модели Гуи-Чепмена-Штерна, C_{dl} должна уменьшаться в более разбавленных растворах при том же потенциале электрода относительно E_{pzc} [41]. Однако экспериментальные величины, полученные в ходе различных исследований, не согласуются с этой теорией. Ниже приведены примерные значения емкости ДЭС в двойнослойной области, полученные при использовании монокристаллической Pt(111) в различных фоновых электролитах (таблица 1).

Таблица 1. Рассчитанные значения C_{dl} для монокристаллической платины Pt(111) в водных средах с помощью СЭИ и ЦВА [41].

C_{dl} , мкФ/см ²	Метод	Электролит	Условия	Ссылка
≈20	СЭИ	0,1 М KClO ₄ + 0,1 мМ HClO ₄	≈0,6 В отн. ОВЭ	[33]
≈10-30	СЭИ	0,1 М HClO ₄ ; 0,05 М NaOH	≈0,4-0,6 В отн. ОВЭ	[32]
≈25-40	СЭИ	0,05 М MeClO ₄ , pH 6,0 (Me = Li, Na, K, Pb, Cs)	≈0,4-0,6 В отн. ОВЭ	[49]
≈65	СЭИ	0,1 М HClO ₄	≈0,5 В отн. ОВЭ	[49]
≈100	ЦВА	Растворы HClO ₄ и ее солей различной концентрации	≈0,4-0,6 В отн. ОВЭ	[43,50]

Данные [33] были получены в фоновом электролите 0,1 М KClO₄ + 0,1 мМ HClO₄ и диапазоне потенциалов от 0,20 В до 0,80 В отн. ОВЭ, а значения емкости изменялись в диапазоне от 10 до 60 мкФ/см². Авторы [50] проводили эксперименты в гораздо менее концентрированном электролите (5 мМ LiClO₄ + 0,1 мМ HClO₄) однако полученные значения емкости оказались гораздо больше – от 100 до 300 мкФ/см² в диапазоне потенциалов от 0,35 В до 0,65 В отн. ОВЭ.

Было показано, что различия в величине значений C_{dl} могут быть связаны с особенностями используемых электрохимических методов анализа, в дополнение к неизбежным различиям в чистоте электролитов [52]. В работе [33] рассчитывали значения C_{dl} с помощью электрохимической импедансной

спектроскопии, в диапазоне частот от 2 кГц до 1 Гц. Модель Фрумкина-Мелик-Гайказяна была использована для отделения значений C_{dl} от C_{ads} . Авторы [53] рассчитывали значения C_{dl} из данных СЭИ в диапазоне частот от 30 кГц до 1 Гц с помощью электрической эквивалентной схемы с элементом постоянной фазы, фазовое число N которого составило $0,96 \pm 0,01$. Данные значения C_{dl} были аппроксимированы в качестве «истинной» двухслойной емкости без дополнительных поправок. Значения C_{dl} , описанные в работе [50], были рассчитаны на основе плотности емкостного тока в вольтамперометрических экспериментах. В используемых условиях (диапазон pH от 3,0 до 4,0), величина E_{pzc} попадает в область двойного слоя. Авторы предположили, что регистрируемая плотность емкостного тока обусловлена исключительно зарядкой ДЭС, а рассчитанные значения емкости эквивалентны C_{dl} .

В настоящее время также активно проводятся исследования свойств ДЭС на других модельных Pt электродах, в том числе и поликристаллических, ввиду их повсеместного использования в промышленных процессах. Поверхность поликристаллической платины неоднородна и состоит из различно ориентированных граней, дефектных участков и межзеренных границ. Это усложняет установление взаимосвязи между структурой и электрохимическим поведением Pt электродов [54,55].

Исследователи пробуют различные подходы в решении этой важной проблемы. Так, было проведено исследование строения ДЭС на ступенчатых платиновых электродах Pt(111), поверхность которых содержала террасы (110) и (100) через различные промежутки атомов [51]. Авторами был отмечен сильно отличающийся профиль зависимости емкости от прикладываемого потенциала на ступенчатых электродах по сравнению с Pt(111) в 0,1 М HClO₄. Величины минимума C_{dl} уменьшались с увеличением плотности ступеней (110); для ступеней (100) наблюдалась обратная картина, что связано с различным сродством данных граней к диссоциации воды.

Те же авторы продолжили развитие своей идеи в работе [56], используя поликристаллические Pt электроды и дифракцию отраженных электронов с ЦВА/СЭИ в качестве методов анализа. Было показано, что величины минимума C_{dl} и E_{pzc} в экспериментальных условиях хорошо согласуются с прогнозируемыми значениями, рассчитанными на основе распределения ориентаций граней кристаллической электродной поверхности.

Температура и кислотность среды также оказывают большое влияние на емкость ДЭС платиновых электродов. В работе [57] было продемонстрировано, что значения C_{dl} , полученные с помощью СЭИ, уменьшались с ростом температуры в диапазоне от 0,30 до 0,70 В отн. ОВЭ при использовании 0,1 М $HClO_4$ в качестве фонового электролита. Авторы объяснили подобное поведение ускорением теплового движения молекул и ионов фонового электролита с ростом температуры. Данное явление приводит к уменьшению диэлектрической проницаемости среды ϵ_r , которая, в свою очередь, напрямую связана с емкостью слоя Гельмгольца и Гуи-Чепмена в рамках модели плоского конденсатора [31]:

$$C_{HL} = \frac{\epsilon_{r(HL)} \epsilon_0 S}{d_{HL}}, \quad (10)$$

$$C_{GCL} = \frac{\epsilon_{r(GCL)} \epsilon_0 S}{d_{GCL}}, \quad (11)$$

где $\epsilon_{r(HL)}$ и $\epsilon_{r(GCL)}$ – относительная диэлектрическая проницаемость слоя Гельмгольца и Гуи-Чепмена, соответственно; ϵ_0 – электрическая постоянная, равная $8,854 \cdot 10^{-12}$ Ф/м; S – площадь электродной поверхности, m^2 ; d_{HL} и d_{GCL} – толщина слоя Гельмгольца и Гуи-Чепмена, соответственно, м.

Уменьшение емкости C_{dl} наблюдалось при увеличении рН фонового электролита, что было показано в работе [58] для поликристаллической Pt в растворах $HClO_4$ различной концентрации с помощью СЭИ и ЦВА. Подобное явление не коррелирует с моделью Гуи-Чепмена-Штерна, что авторы связали с сильно выраженной адсорбцией ионов водорода на

поверхности электрода. Электрохимическое поведение поликристаллического золота, также рассмотренное в этой работе, не характеризуется такой особенностью, что приводит к обратной картине – повышение pH вызывает рост емкости C_{dl} в диапазоне от 0,10 до 0,50 В отн. ОВЭ.

Таким образом, исследования свойств ДЭС различных платиновых электродов в водной среде, а также влияния внешних факторов на его емкость является актуальным как для модельных систем, так и технологических процессов.

1.2 Электрохимическое поведение поверхности титана в водных электролитах

1.2.1 Электрохимические свойства титана и его оксидной пленки

Титан и сплавы на его основе являются одними из наиболее востребованных материалов в биомедицинских исследованиях и производстве различных имплантатов [59], благодаря сочетанию высокой биосовместимости, коррозионной стойкости и хороших механических свойств, в частности, низкого модуля Юнга [60]. Эти качества во многом обусловлены образованием пассивирующей оксидной пленки титана, толщина которой в естественных условиях достигает 10 нм [61].

Структура оксидной пленки титана напрямую серьезно влияет на биосовместимость Ti, поскольку от ее толщины и кристалличности зависит степень адсорбции ионов из плазмы крови человека: рутил имеет более плотную структуру с меньшей диффузией ионов по сравнению с анатазом [62]. Осаждение гидроксиапатита на поверхности оксидных пленок с кристаллической структурой анатаза и рутила протекает лучше по сравнению с аморфными пленками, что является необходимым условием биосовместимости титановых имплантатов с костными фрагментами [63].

Использование коммерчески чистого титана для биомедицинских целей характеризуется двумя важными особенностями:

- После проведения соответствующих операций, имплантат первоначально вступает в контакт с кровью и внутритканевыми жидкостями. Концентрация хлорид-ионов (в плазме крови 113 мг-экв/л, во внутритканевой жидкости 117 мг-экв/л [64]) достаточно высока для начала протекания коррозии металлических материалов, в том числе и титана. Из-за этих обстоятельств, а также низкой твердости титана, имплантаты на его основе подвержены быстрому износу, что ограничивает их использование на практике. Это может приводить и к возникновению аллергических реакций на продукты коррозии титана, которые в настоящее время плохо изучены [65,66].

- Для улучшения свойств биосовместимости титан подвергают процедурам модификации его поверхности, которые должны быть высокоэффективными и недорогими.

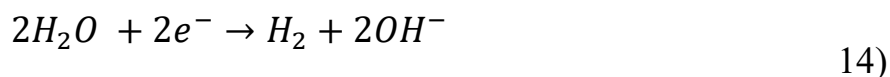
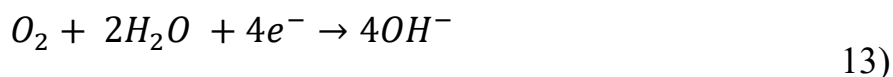
Электрохимические методы анализа хорошо подходят для изучения аспектов обеих этих задач. Циклическая вольтамперометрия и спектроскопия электрохимического импеданса активно используются для описания процессов, происходящих на межфазной границе «оксидная пленка/раствор». Также, в коррозионных исследованиях широко применяется анализ поляризационных кривых – потенциодинамический метод измерения отклика силы тока при очень низкой скорости наложения потенциала (как правило 1 мВ/с или меньше). Это объясняется необходимостью пребывания исследуемой системы в состоянии равновесия (стационарном), т.е. состоянием, в котором скорость протекающих электрохимических реакций и плотность тока будут постоянны при заданном потенциале. Соблюдение этого условия приводит к минимизации вклада емкостного тока, что позволяет четко определить фарадеевские токи электрохимических реакций для корректной оценки коррозионных параметров [67].

В этом случае зависимость между потенциалом E и плотностью тока j выражается уравнением электрохимической кинетики Батлера-Фольмера для протекающих катодной и анодной реакций [68]:

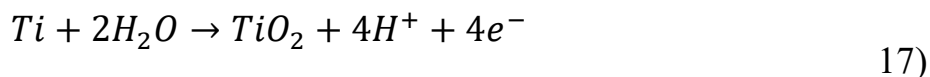
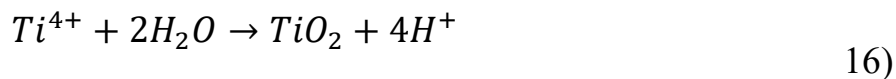
$$j = j_{corr} \left\{ \exp \left[\frac{2.303(E - E_{corr})}{b_a} \right] - \exp \left[\frac{2.303(E - E_{corr})}{b_c} \right] \right\}, \quad (12)$$

где E_{corr} – коррозионный потенциал, В; j_{corr} – плотность коррозионного тока, А/м²; b_a и b_c – коэффициенты, характеризующие анодную и катодную электрохимическую реакцию.

Электрохимическое поведение титана существенно зависит от величины потенциала, при котором происходит измерение отклика силы тока [69–71]. Так, в катодной области поляризационных кривых протекают представленные ниже реакции восстановления воды и растворенного кислорода:



По мере увеличения налагаемого потенциала начинает протекать электрохимическое окисление Ti до диоксида титана TiO₂, что можно представить в следующем виде:



Исследователями отмечено, что данным процессам может предшествовать окисление Ti до Ti²⁺ и Ti³⁺ с образованием низших оксидов титана [72].

Образование оксидной пленки приводит к пассивации поверхности титана, что выражается выходом тока на постоянное плато. Этот процесс протекает до достижения критической величины потенциала диэлектрического пробоя, после которой сформированная оксидная пленка разрушается, а поверхность титана подвергается репассивации. Данное явление приводит к резкому скачку плотности тока на поляризационной кривой титана и/или его сплава [73].

Используя значение j_{corr} , полученное из тафелевских участков поляризационных кривых, можно рассчитать скорость коррозии титанового образца CR [74]:

$$CR = \frac{3270 \cdot M \cdot j_{corr}}{\rho \cdot N}, \quad (18)$$

где 3270 – постоянная, определяющая размерность скорости коррозии (мм/год); M – атомная масса титана, г/моль; ρ – плотность титана, г/см³; N – число электронов, участвующих в элементарном акте электрохимической реакции окисления титана (N = 4).

Спектроскопия электрохимического импеданса успешно дополняет данные, которые исследователи получают с помощью вольтамперометрических методов. Малая амплитуда налагаемого потенциала (как правило, не превышающая 10 мВ) не приводит к значительной поляризации поверхности титановых электродов, что позволяет оценивать емкостные и резистивные характеристики оксидной пленки *in situ* в течение длительного времени.

Большое количество работ, посвященных изучению импеданса титана и его сплавов в водной среде, использует электрические эквивалентные схемы вида $[R(X[R(RX)])]$ или $[R(RX)(RX)]$, где X = конденсатор C или элемент постоянной фазы Q [13,62,71,75–78]. Интерпретация наличия двух участков типа (RX) объясняется наличием сложной структуры оксидной пленки титана, состоящей из тонкого внутреннего барьерного слоя и более широкого внешнего пористого слоя.

Используя значения емкости или эффективной емкости, становится возможным рассчитать толщину слоев оксидной пленки титана:

$$d_{BL} = \frac{\varepsilon_{r(BL)} \varepsilon_0 S}{C_{BL}}, \quad (19)$$

$$d_{PL} = \frac{\varepsilon_{r(PL)} \varepsilon_0 S}{C_{PL}}, \quad (20)$$

где d_{BL} и d_{PL} – толщина внутреннего барьерного слоя и внешнего пористого слоя оксидной пленки, соответственно, м; $\varepsilon_{r(BL)}$ 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, Ф.

Исследователи используют различные значения ε_r для вычисления толщины оксидной пленки титана. Авторы [79] использовали значение ε_r равное 86 для оценки коррозионных характеристик сплавов Ti-6Al-2Sn-4Zr-2Mo и Ti-6Al-4V в 3,5% растворах NaCl и H₂SO₄. Два значения ε_r для оксидной пленки коммерчески чистого титана – 48 для кристаллической части и 33 для аморфной части, при использовании 3,5% раствора NaCl в качестве коррозионной среды были предложены в работе [80]. Авторы [14] рассчитали значения ε_r с помощью ЦВА для оксидной пленки титана в условиях анодирования коммерчески чистого титана в фосфатно-щелочном электролите. Полученные значения ε_r составили 79 для образца, поляризованного при 500 мВ отн. Ag/AgCl, и 97 для образца, поляризованного при 500 мВ отн. Ag/AgCl.

Подробности об электрохимической модификации поверхности титана и его сплавов в различных электролитах приведены в следующем подразделе.

1.2.2 Анодирование поверхности титана и его сплавов

Анодирование (анодное оксидирование) – это метод электрохимической обработки, направленный на улучшение динамики роста

оксидного слоя на поверхности металла. Факторами, влияющими на процесс потенциостатического анодирования, являются величина потенциала, pH, природа и концентрация электролита, а также температура. Так, контроль температуры определяет скорость диффузии ионов через оксидную пленку, а pH электролита определяет размер ее пор [81]. Процесс электрохимической модификации также воздействует на легирующие элементы в сплавах, которые образуют вторичные оксиды.

Методикам модификации титана и его сплавов посвящено большое количество научных обзорных исследований. Отдельно можно выделить свежую работу Nan и соавторов, описывающую достижения этой области в ортопедическом направлении биомедицины [82], и Alipal и соавторов, в которой приводится подробное описание того, как условия анодирования влияют на свойства полученных титановых имплантатов [83].

Ниже будут рассмотрены исследования, посвященные анализу влияния таких факторов, как природа электролита и величина потенциала анодирования, на поверхность оксидной пленки титана и его сплавов.

- Выбор электролита для процесса анодирования

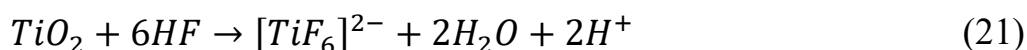
В ранних работах по формированию оксидной пленки титана методом анодирования, в качестве фоновых электролитов для формирования покрытия использовали растворы кислот (H_2SO_4 , CH_3COOH , HCl), оснований (как правило, $NaOH$) и солей, например, Na_2SO_4 . Полученные оксидные покрытия обладали нанопористой или микропористой структурой, обеспечивающей хорошее взаимодействие электрохимически модифицированных титановых имплантатов с костной тканью [84].

В 1995 году были использованы фоновые электролиты на основе H_3PO_4 и органических солей кальция (Ca/P) для формирования оксидной пленки, допированной кальцием и фосфором [85]. Преимущества электролитов на основе Ca/P заключались в образовании толстого (1-10 мкм), шероховатого и пористого оксидного слоя, содержащего ионы кальция и фосфора, которые

благоприятно влияли на рост костной ткани и улучшали крепление имплантатов к кости.

Перспективность использования фосфатных электролитов для анодирования титана также может заключаться в высоком сродстве фосфат-анионов к TiO_2 , приводящем к образованию бидентатной структуры [86]. Наилучшая аффинность достигалась в диапазоне pH от 3,0 до 4,2; при pH 6,8 – 8,6 сродство ухудшалось, а при pH = 11,0 связывания не наблюдалось.

В 1999 году были получены нанотрубки TiO_2 на поверхности титана путем анодирования Ti подложек в электролите на основе HF [87]. Присутствие фторид-ионов приводило к частичному растворению оксидной пленки TiO_2 и образованию углублений, которые, по мере увеличения времени анодирования, принимали упорядоченную и постоянную структуру в виде нанотрубок:



Нанотрубки TiO_2 имеют размеры, аналогичные нанокристаллам костей человека [88], что способствует процессу остеоинтеграции и предотвращению адгезии бактерий к поверхности имплантата. Высокая удельная поверхность нанотрубок TiO_2 также делает их перспективным материалом для электроосаждения гидроксиапатита в биомедицинских целях [89].

О возможности использования нанотрубок TiO_2 в качестве резервуаров для элюирования лекарственных средств *in vivo* впервые сообщили в 2006 году авторы работы [90].

Таким образом, природа электролита оказывает большое влияние на морфологические свойства оксидной пленки титана. В обзорной работе [83] показано, что использование кислых и нейтральных фоновых электролитов в процессе анодирования приводило к образованию кристаллического оксидного слоя, а в щелочных электролитах формировался аморфный

оксидный слой. Авторы связывают это с более высокой электропроводностью кислых/нейтральных электролитов, приводящей к росту скорости окисления титана.

Влияние состава нейтральных фоновых электролитов, используемых для анодирования, на коррозионные характеристики полученных титановых образцов рассмотрено в работе [9]. Использование PBS со значениями pH = 7,4 и 12,0 в качестве электролитов привело к формированию гладкой поверхности оксидной пленки TiO₂ с высокими барьерными свойствами и коррозионной стойкостью. Оксидные пленки, сформированные в растворах Na₂SO₄ и NaSCN, напротив, оказались уязвимы к коррозии в среде искусственной слюны (pH 6,8), что было показано с помощью поляризационных кривых и СЭИ. Авторы связывают это с более совершенным ростом оксидной пленки Ti при высоких значениях pH за счет пониженной растворимости оксидов/гидроксидов титана. Это приводит к общему уменьшению дефектов и появлению дополнительных мостиков между соседними ионами Ti посредством образования связей Ti-O-P-O-Ti. Для сульфат-анионов подобного сродства не наблюдалось.

- Выбор потенциала для процесса потенциостатического анодирования

Свойства оксидной пленки титана существенно зависят от налагаемого потенциала в ходе электрохимической модификации. Так, использование величины потенциала меньше предела электрического пробоя диэлектрика приводит к образованию тонкого и компактного оксидного слоя. В этом случае, толщина пленки d прямо пропорциональна величине налагаемого потенциала E :

$$d = \gamma E, \quad (23)$$

где γ – постоянная роста оксидной пленки [91].

При превышении величины электрического пробоя полученная пленка становится толще, менее однородной, более пористой и с большим

количеством дефектов, а сам процесс анодирования сопровождается видимыми изменениями состояния поверхности титановой подложки [83]. Это наглядно продемонстрировано при анодировании коммерчески чистого титана в электролите на основе этиленгликоля и использовании широкого диапазона потенциалов [92]. Увеличение величины потенциала анодирования приводило к более быстрому пробое слоя диэлектрика, растворению образующейся оксидной пленки, а, следовательно, и росту скорости реакции электрохимического окисления. Авторами был получен большой ряд титановых образцов с различной окраской оксидного слоя (от фиолетового до красного) и морфологическими свойствами.

Кристалличность слоя TiO_2 также может возрастать при более высоких потенциалах анодирования благодаря локализованному нагреву на поверхности титана [93], что приводит к плавлению поверхности и рекристаллизации. Так, в работе [94] авторы анодировали титановую фольгу высокой чистоты в смеси $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ при различных потенциалах (100 В, 140 В, 180 В и 200 В). Они обнаружили, что процесс анодного окисления, проведенный при 200 В, привел к получению более пористого, шероховатого оксидного слоя с более высокой степенью кристалличности. Показана перспективность анодирования титана для биомедицинских целей в растворах HNO_3 при потенциале 5,0 В и времени модификации от 5 до 30 мин [95]. Результаты рентгеноструктурного анализа полученных образцов, хранившихся в среде, моделирующей биологическую жидкость (SBF) и содержащей $\text{CaCl}_2/\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, продемонстрировали спонтанное образование гидроксиапатита на поверхности оксидного слоя.

Было проведено схожее исследование для Ti-6Al-4V в 0,5 М H_2SO_4 , но при более низких потенциалах анодирования: от 0,0 В до 2,3 В [96]. Результаты также показали прямую зависимость между потенциалом анодирования и морфологическими свойствами оксидной пленки, однако более толстый слой TiO_2 не способствовал улучшению коррозионных характеристик полученных покрытий. Повышение потенциала анодирования

также способствовало кристаллическому переходу TiO_2 из анатаза в рутил. Похожие результаты были получены при анодировании сплава Ti-5Al-5Mo-5V-1Fe-1Cr в 3,5 % растворе NaCl и потенциалах поляризации в диапазоне от 0,0 до 3,0 В в течение 12 часов [97]. Наилучшую коррозионную стойкость проявил образец сплава, поляризованный при $E_{\text{pol}} = 1,0$ В, в то время как анодирование при потенциале в 3,0 В привело к адсорбции хлорид-ионов на поверхности оксидной пленки, повышению ее шероховатости и снижению коррозионных характеристик. В работе [98], с помощью различных спектроскопических методов, было показано увеличение содержания TiO_2 и уменьшение содержания O_2/OH в оксидной пленке сплава Ti-6Al-3Nb-2Zr-1Mo при анодировании последнего в боратных буферных растворах ($\text{pH} = 9,0-10,0$). Данное обстоятельство делало структуру оксидного слоя более компактной и целостной, что благоприятно влияло на коррозионную стойкость поверхности сплава после электрохимической модификации.

Для получения нанотрубок TiO_2 при анодировании также применяются относительно низкие значения потенциала анодирования (5-60 В). Было проведено анодное окисление поверхности коммерчески чистого титана при 5 В и 10 В в электролите $\text{NH}_4\text{F}/\text{NaCl}$ [99]. Диаметр нанотрубок TiO_2 увеличился с 24-30 нм при $E_{\text{pol}} = 5$ В до 35-53 нм при $E_{\text{pol}} = 10$ В. Авторы [100] в своем исследовании продемонстрировали нелинейную зависимость размеров диаметра нанотрубок TiO_2 от потенциала поляризации (30-60 В) при использовании фонового электролита на основе этанола, содержащего 0,3 М NH_4F и 3,5 % деионизированной воды. Диаметры линейно увеличивались в диапазоне потенциалов от 30 В (88 нм) до 50 В (124 нм), но уменьшались при 60 В (105 нм). Также показано уменьшение диаметра нанотрубок при потенциалах анодирования, превышающих некоторое критическое значение [101]. Диаметр пор и толщина слоя нанотрубок линейно увеличивались в органическом электролите до потенциала анодирования 60 В, далее диаметр пор уменьшался из-за возникающих

ограничений реакции диссоциации воды, что оказывало негативное влияние на морфологию образующихся пор.

В некоторых работах, посвященных анодированию титана и его сплавов, используется потенциодинамический метод, заключающийся в постепенном увеличении потенциала анодирования в ходе электрохимической модификации. Так, авторы [102] провели подобную процедуру с коммерчески чистым титаном, увеличивая величину потенциала анодирования от 0 В до 10, 30 и 50 В со скоростью 1 В/с в 0,5 М H_2SO_4 . Результаты показали, что увеличение анодного потенциала в потенциодинамическом режиме может значительно увеличить толщину, степень кристалличности и химическую стабильность оксидной пленки. В похожем исследовании, использующем потенциостатический и потенциодинамический варианты анодирования, а также 0,1 М H_2SO_4 в качестве фонового электролита, было оценено влияние изменения потенциала в ходе модификации на морфологические свойства получаемых слоев [103]. Оксидные пленки, выращенные потенциостатическим методом, были более толстыми, шероховатыми и кристаллическими чем пленки, полученные в потенциодинамическом режиме.

Таким образом, варьирование условий процесса анодирования способствует либо появлению неоднородной поверхности оксидной пленки, что благоприятно сказывается на биосовместимости полученных материалов, либо однородной поверхности с хорошей коррозионной стойкостью.

1.3 Электрохимическое поведение аминокислот на поверхности Pt

Аминокислоты – это органические соединения, содержащие одновременно амино- и карбоксильную группу, а также являющиеся предшественниками (мономерными блоками) для пептидов и белков. Различная природа заместителей в боковой цепи аминокислот, а также важная биологическая роль делает их интересными объектами для изучения в области электрохимии на протяжении многих лет.

Так, некоторые закономерности электрохимической адсорбции аминокислот (глицина и 4-аминобутановой кислоты) на платинированном платиновом электроде были показаны с помощью ЦВА и метода меченых атомов при использовании 1 М HClO_4 в качестве фонового электролита [104,105]. Максимальная адсорбция используемых аминокислот наблюдалась в двойнослойной области, а добавление небольшого количества HCl приводило к протеканию конкурирующего процесса адсорбции хлорид-ионов [106]. Авторы предположили, что в кислой среде глицин адсорбируется на Pt через карбоксильную группу; аналогичные результаты наблюдали и для уксусной кислоты [107].

В дальнейшей работе этих авторов, посвященной адсорбции метионина на поверхности платинированной Pt, показано сильное влияние природы электролита на электрохимическое поведение аминокислоты [108]. В щелочной среде (0,1 М NaOH) электрохимическая адсорбция метионина осуществлялась через аминогруппу, а в кислой (0,1 М HClO_4) – через карбоксильную и, преимущественно, боковую функциональную группу $\text{S}-\text{CH}_3$, что было показано путем сравнения с результатами электрохимической адсорбции аланина в аналогичных условиях. Схожее электрохимическое поведение продемонстрировал серин в кислой среде (0,1 М H_2SO_4), подтверждая возможность хемосорбции аминокислот с помощью боковой функциональной группы [109].

Во многих электрохимических исследованиях часто используется подход, в котором адсорбцию аминокислот оценивают относительными путями, например, по уменьшению пиков в водородной и кислородной области вольтамперограммы платинового электрода в присутствии адсорбата. В таком случае вводят параметр степени заполнения Θ , характеризующий электрохимическую адсорбцию.

В ходе вольтамперометрического измерения молекулы аминокислот подвергаются электрохимическому окислению, что сопровождается разрывом химических связей в их структуре и последующей адсорбцией

продуктов электрохимической реакции на поверхности платины (диссоциативная адсорбция).

Механизм реакции электрохимического окисления аминокислоты существенно зависит от природы боковой функциональной группы. В простейшем случае, данный процесс приводит к декарбоксилированию по Кольбе с образованием различных продуктов электрохимической реакции.

Для детектирования продуктов электро-окисления, связанных с аминогруппой и боковой функциональной группой, часто используют спектроскопические подходы. Так, в работах [110,111] были осуществлены исследования по электрохимическому окислению глицина на монокристаллических платиновых электродах в 0,1 М HClO_4 с использованием ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR). Исследователями было показано, что основным продуктом электро-окисления, адсорбирующимся по поверхности платины, является цианид-ион ($\sim 2100 \text{ см}^{-1}$) при потенциалах выше 0,5 В отн. ОБЭ. Также было продемонстрировано присутствие растворенного CO_2 ($\sim 2350 \text{ см}^{-1}$).

В работе [112] было проведено электрохимическое окисление глицина, треонина и серина на платиновом электроде в 0,1 М NaOH , а продукты реакции регистрировали с помощью поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (SERS). Диссоциативная адсорбция глицина сопровождалась образованием цианид-ионов и наблюдалась в широкой области потенциалов. Аналогичный процесс для треонина и серина протекал при относительно высоких потенциалах и дополнительно сопровождался окислением их функциональных групп. Было обнаружено возникновение ингибирования электрохимического окисления аминокислот из-за сильно адсорбирующихся цианид-ионов, которые окислялись до цианатов и карбонатов при потенциалах выше 0,4 В отн. ОБЭ.

Большое внимание также уделяется электрохимическому поведению цистеина, обладающего функциональной группой $-\text{SH}$ с высоким сродством к поверхности платины [113,114]. Подробные исследования

электрохимической адсорбции цистеина и цистеилглицина были проведены при варьировании кислотности фоновых электролитов (PBS) с помощью ЦВА [10–12]. Было продемонстрировано, что максимальная адсорбция данных веществ наблюдалась при нейтральных pH, а зависимости степени заполнения Θ_{CV} от потенциала адсорбции E_{ads} носили колоколообразный характер с максимумами в области ДЭС. Опыты с варьированием концентраций аминокислоты и дипептида показали, что электрохимическая адсорбция описывается уравнением изотермы Темкина, что характерно при диссоциативном поведении адсорбатов и сильном взаимодействии продуктов электрохимической реакции друг с другом [20]. Схожие результаты были получены при исследовании адсорбции цистеина на платиновом электроде в кислой среде [115].

Известно, что электрохимическое окисление цистеина приводит к появлению двух пиков на анодной ветви вольтамперограммы и протекает более интенсивно при низких значениях pH [10,11]. Согласно литературным данным, первая стадия этого процесса включает окисление сульфгидрильной группы до радикала $RS^\bullet$, который подвергается нуклеофильной атаке молекулой воды с образованием промежуточного соединения (сульфона), которое на второй стадии окисляется до цистеиновой кислоты [116,117]. С помощью сочетания ЦВА и FTIR (в диапазоне от E_{OC} до 1 В отн. Ag/AgCl), а также квантово-химических расчетов, было показано, что кислотность электролита серьезно влияет на процесс формирования промежуточных продуктов электрохимического окисления цистеина на платине [118]. Также, в последующей работе от того же коллектива авторов было продемонстрировано, что дальнейшее увеличение потенциала ($> 1,15$ В отн. Ag/AgCl в 0,5 М H_2SO_4) способствовало протеканию реакции электрохимического декарбоксилирования цистеина [119].

Формирующиеся радикальные частицы способны к димеризации с образованием цистина, а также могут приводить к анодному растворению платины. Так, было показано, что потенциостатический электролиз PBS (pH

2,0 и 12,0), содержащих 10^{-2} М цистеина, при потенциале 1,4 В отн. ОВЭ способствовал растворению платины до концентраций в 5 мг/мл·см², что было подтверждено с помощью масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) [10]. Похожие результаты наблюдались в работе [120] в концентрированных растворах цистеина (0,1 М PBS с pH 7,4).

Электрохимическое окисление метионина также может приводить к образованию радикальных частиц $\text{CH}_3\text{-S}^\bullet$, однако данная аминокислота показала меньшую активность в процессе растворения платины по сравнению с цистеином, особенно в щелочной среде, несмотря на высокую адсорбцию [10].

К сильной электрохимической адсорбции и окислению также способны такие аминокислоты как тирозин, триптофан и гистидин. С помощью ЦВА было показано, что тирозин и триптофан хорошо адсорбировались на поверхности платины в PBS с pH 7,0 [121]. В данных условиях электрохимическое окисление тирозина и триптофана сопровождалось выделением катионов аммония и декарбоксилированием; которое также являлось лимитирующей стадией всей электрохимической реакции. Авторы [122] провели похожее исследование при использовании 0,1 М NaOH в качестве фонового электролита, регистрацию продуктов реакции проводили с помощью FTIR. Гистидин и тирозин были окислены при потенциалах больше 1,1 В отн. Ag/AgCl; первой стадией электрохимического окисления также являлось декарбоксилирование, как и в предыдущей работе. При дальнейшем увеличении потенциала протекала деструкция остатка гистидина и тирозина с образованием аммиака, формиат-ионов, а также индола и фенола, соответственно.

Несмотря на электрохимическую активность и хорошую адсорбцию триптофана и гистидина, эти аминокислоты не проявили способность к анодному растворению платины [10]. Автор связывает это явление с двумя условиями: для успешного растворения продукты электро-окисления не должны хемосорбироваться на поверхности электрода, а сама аминокислота

должна являться хорошим хелатирующим лигандом по отношению к ионам платины.

Особенности химической структуры аминокислот подразумевает возможность протекания реакции электрополимеризации. Данное обстоятельство было использовано в работах [123,124], описывающих получение пленок полиглицина на поверхности платинового электрода. Электрополимеризация аминокислоты осуществляли с помощью ЦВА в 0,5 М растворах глицина при различной кислотности среды, а формирование пленки подтверждали с помощью пьезоэлектрического микровзвешивания, АСМ и РФЭС. Полученный модифицированный платиновый электрод был использован в качестве потенциометрического датчика для определения pH в диапазоне от 2,0 до 12,0. Позднее авторами [125,126] была показана возможность электрополимеризации серина, треонина, аспарагина, глутамина и аланина на поверхности Pt для той же аналитической цели.

Гораздо меньше проведено исследований, посвященных электрохимическому поведению аминокислот, не подвергающихся специфическому окислению по боковому заместителю, на платине. Авторами [127] было показано, что аспарагиновая кислота хуже адсорбируется на поверхности платины по сравнению с глицином и α -аланином. Процесс электрохимического окисления данной аминокислоты сопровождался отщеплением двух электронов с образованием CO, NH₃ и ацетат-ионов.

В работах [128,129] было рассмотрено влияние различных аминокислот на электрохимические характеристики высокопористых платиновых электродов в условиях, близких к физиологическим. Аспарагиновая и глутаминовая кислота не оказывали значительного влияния на величину E_{OC} , а также легко десорбировались с электродной поверхности при использовании электрохимической обработки платинового анода. Серосодержащие аминокислоты внезапно показали схожее поведение, не подвергая поверхность платины сильному отравлению. Авторы связывают это с морфологическими свойствами используемого платинового анода.

Данное условие может оказывать серьезное влияние как на адсорбцию аминокислот, так и на их электрохимическое окисление, что показано на примере гладкого и платинированного платинового электрода в работах [130,131].

Аспарагиновая и глутаминовая кислота были успешно использованы в качестве доноров протонов и буферирующих агентов для реакции выделения водорода (HER) на вращающихся дисковых платиновых электродах [132].

Таким образом, изучение электрохимического поведения аминокислот, не подвергающихся специфической адсорбции или окислению по боковой функциональной группе представляет большую научную новизну. Актуальность таких исследований тоже высока из-за важной роли таких аминокислот как Asp и Glu в структуре белков [133] и метаболических процессах [134].

1.4 Электрохимическое взаимодействие платины с компонентами биологических систем

Несмотря на свою дороговизну, платина находит активное применение в биомедицинских целях благодаря своей коррозионной стойкости, химической инертности и рентгеноконтрастности. Эти качества делают платину важным компонентом имплантируемых медицинских изделий и устройств [2,135].

Так, платина используется в сплавах для изготовления тонкостенных и хорошо видимых в рентгеновском излучении хирургических стентов и эндопротезов (стент-графтов) для лечения аневризм сосудов. Также платина применяется для изготовления зубных имплантатов, кардиостимуляторов и имплантируемых дефибрилляторов, кохлеарных имплантатов и нейростимулирующих электродов [136].

Электрохимические методы анализа показали свою эффективность в оценке состояния и свойств платиносодержащих имплантов. Так, в работе [137] было проанализировано электрохимическое поведение платиновых электродов для кохлеарных устройств в условиях *in vitro* (0,15 М NaCl) и *in*

vivo на примере морских свинок. Было показано существенное отличие вольтамперограмм и спектров импеданса при имплантации платиновых электродов. Полученные результаты позволили авторам разработать протоколы испытаний бионических электродных материалов.

Этими же авторами было продемонстрирована адсорбция различных белков на платиновых электродах *in vitro* с помощью электрохимических методов [138]. Благодаря оценке уменьшения емкости ДЭС и пика окисления редокс-медиатора $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ в присутствии белков было показано, что степень заполнения Θ находится в диапазоне от 0,20 до 0,50, что свидетельствует о частичной блокировке поверхности. Адсорбция белков также может свидетельствовать о препятствовании растворения платиновых электродов при их имплантации за счет увеличения омического сопротивления и сопротивления переноса заряда. Это дополнительно обуславливает высокую коррозионную стойкость Pt *in vivo* – коррозия платиновых электродов в составе кохлеарных устройств была отмечена только после большого времени (больше 10 лет) после процедуры имплантации [139].

Успешная интеграция платиновых имплантов *in vivo* во многом зависит от благоприятного взаимодействия электродной поверхности с различными клетками организма, причем цель процедуры определяет свойства поверхности импланта. Хорошая адсорбция различных белков на платине делает этот металл подходящим биоматериалом для взаимодействия с внеклеточным матриксом – средой, определяющей способность клеток к адгезии, дифференциации и пролиферации [140]. После адсорбции белковых компонентов внеклеточного матрикса, особые клеточные рецепторы интегрины связываются с этими белками, что приводит к адгезии клеток на поверхности импланта. Хорошая адгезии клеток костной ткани, в частности, остеобластов (молодых костеобразующих клеток, способных к делению) очень важна для успешной процедуры остеоинтеграции.

Морфология поверхности имплантата также важна для этого процесса. Так, авторами работы [141] было показано, что клеточная реакция первичных фибробластов человека сильно зависела от шероховатости платиновых пленок, нанесенных на стеклянные подложки. Увеличение данного параметра приводило к изменению морфологии клеток и ухудшению адгезии к поверхности Pt, однако не влияло на жизнеспособность фибробластов. В этом случае уменьшение адгезии фибробластов на поверхности платиновых электродов для нейростимуляции является хорошим результатом для повышения эффективности работы таких устройств.

В работе [142] также была продемонстрирована высокая эффективность и биологическая совместимость пористых платиновых электродов с большой удельной поверхностью в условиях *in vitro* и *in vivo*. Модельные клетки нейробластомы (SH-SY5Y), имитирующие нейронную функцию, были успешно культивированы на поверхности этого электродного материала, подтверждая перспективность его использования в качестве нейростимулирующего устройства.

Подобные платиновые электроды также были использованы для стимуляции роста и пролиферативной активности клеток человеческих кератиноцитов (HaCaT), причем скорость данных процессов авторы отслеживали по изменению импеданса *in situ* в диапазоне от 10 до 1 кГц [143].

Для увеличения скорости переноса заряда поверхность платиновых имплантатов подвергают различной модификации. Так, в работе [144] описано поведение мышинных фибробластов (NIH-3T3) на гибких тонкопленочных платиновых электродах, покрытых поли(3,4-этилендиокситиофеном). Клетки дополнительно стимулировали электрическим током до 600 мВ в прямом и импульсном режиме от 16 Гц до 2 кГц. Результаты показали перспективность последнего режима для ускорения регенерации тканей организма при различных травмах.

Адгезия мышинных фибробластов на платине и золоте протекала более выражено по сравнению с палладием, что было показано в работе [145] с помощью конфокальной микроскопии. Авторы связали полученные результаты с отличающимися микроструктурными свойствами поверхности палладия, а также иным молекулярным составом фокальных контактов, обеспечивающих прикрепление клеток к внеклеточному матриксу.

Таким образом, платина показала хорошую биосовместимость с различными клетками организма, однако потенциальная коррозия имплантов *in vivo* также является важным аспектом успешного внедрения платиновых имплантов. Известно, что комплексные соединения и наночастицы платины проявляют высокую цитотоксичность по отношению к различным клеткам, что может осложнять процесс интеграции имплантов в ткани организма [2].

Так, авторами [146] были представлены платиновые электроды на кремниевых подложках, полученные с помощью электронно-лучевого напыления и магнетронного распыления. Коррозионная стойкость полученных материалов была протестирована *in vitro* при различных температурах, а также внешнем потенциале 1,5 В; биосовместимость – на фибробластах кожи человека. Разработанные электроды показали высокую инертность и целостность поверхности, на которой также была зафиксирована пролиферативная активность модельных клеток.

Выраженной коррозии платинового кохлеарного электрода удалось добиться при переменноточковой электрической стимуляции в течение четырех недель с амплитудой потенциала 20 В и частотой 5 кГц в 0,5 % растворе NaCl [147]. Авторами работы была проведена оценка влияния продуктов коррозии, а также коммерчески доступных наночастиц платины на метаболическую активность клеток NIH-3T3 и SH-SY5Y. Ионы платины показали более высокую цитотоксичность по отношению к обоим видам клеток по сравнению с наночастицами.

Гораздо меньше внимания уделяется взаимодействию благородных металлов, использующихся в биомедицинских целях, с клетками и белками

крови [148]. Так, введение нейростимулирующих электродов в кору головного мозга приводит к повреждению сосудов и проникновению клеток и белков крови через гематоэнцефалический барьер. Адгезия этих биоматериалов на поверхности электродов провоцирует активацию иммунных и воспалительных клеток, а также снижает эффективность нейростимуляции [149].

Адсорбция эритроцитов на поверхности платинового электрода, а также возможность использования этих клеток в качестве углеродного покрытия были показаны в работе [150]. Разработанный метод карбонизации поверхности может быть более дешевой альтернативой углеродным нанотрубкам и графену.

Электрохимическое поведение эритроцитов на платиновом электроде также было продемонстрировано в работах [151,152]. Вольтамперометрические эксперименты, проведенные в растворе 0,15 М NaCl и 0,02 М Na₂SO₃, показали возможность переноса электронов между эритроцитами и платиной при катодной и анодной поляризации. При потенциалах выше 1,30 В и ниже -0,35 В отн. Ag/AgCl было отмечено разрушение мембран эритроцитов и десорбция поврежденных клеток при использовании электрода из оксида индия-олова (ITO).

Измерения внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала на платиновом электроде также были успешно использованы для анализа жизнеспособности тромбоцитов после криолиза [153].

Успешное применение платиносодержащих имплантов также зависит от их взаимодействия с клетками патогенных бактерий. Несмотря на высокую цитотоксичность Pt в виде наночастиц [154] и сплавов [155,156] по отношению к данным клеткам, имеются сведения о формировании биопленок микроорганизмов на плоской поверхности платины. Так, авторами [157] было показано, что клетки *Escherichia coli* способны к адгезии и росту на поверхности предметного стекла с платиновым покрытием, нанесенным с помощью магнетронного распылителя. Уменьшение

количества бактериальных клеток, прикрепленных к платиновому покрытию, наблюдалось в течение первых трех часов культивирования и являлось кратковременным эффектом, исчезающим через 24 часа.

Формирование биопленок различных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* на платиновых электродах было продемонстрировано в работах [158,159]. Процесс бактериальной адгезии *in situ* был проанализирован с помощью электрохимических методов. Было показано, что прикрепление клеток к электроду приводит к уменьшению пика десорбции кислорода с поверхности платины в вольтамперометрических экспериментах. Степень формирования биопленки также оценивали по ухудшению электрохимической обратимости редокс-медиатора и результатам конфокальной микроскопии. Этот же процесс способствовал увеличению импеданса и уменьшению емкости ДЭС при увеличении времени выдерживания платинового электрода в бактериальной суспензии.

Способность клеток *Pseudomonas fluorescens* к адгезии и формированию биопленок на поверхности платинового электрода показана в работе [160]. Авторы использовали электрохимическую реакцию выделения водорода в вольтамперометрических экспериментах для удаления бактериальных биопленок. Более возрастные биопленки показали большую устойчивую к выделяющимся пузырькам газа и были удалены с поверхности электрода лишь частично.

Использование методов напыления благородных металлов, в том числе и платины, на различные подложки позволяет существенно уменьшить стоимость и повысить практичность имплантируемых изделий [3,161]. Так, биметаллические покрытия Pt/Ir, полученные металлоорганическим осаждением из газовой фазы (MOCVD), показали высокую цитотоксичность по отношению к клеткам *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* и *Enterococcus faecium*, а также хорошую биосовместимость *in vivo* при имплантации в крыс и последующих гистологических исследованиях [162,163].

Несмотря на активное применение платины в различных областях биомедицины, некоторые электрохимические аспекты ее поведения *in vitro*, в частности влияние поляризации электрода на адгезию клеток и взаимодействие редокс-медиаторов с биопленками, являются плохо исследованными, а научные работы в этой области – высоко актуальными.

1.5 Влияние свойств электрохимически модифицированной поверхности титана и его сплавов на адгезию клеток

Как и в случае с платиной, поверхность оксидной пленки титана показала хорошую способность к адсорбции аминокислот и белков [164]. Это объясняется высокой поверхностной концентрацией гидроксильных групп на оксидной пленке и высокой гидрофильностью последней, а также близкими значениями диэлектрической постоянной TiO_2 и воды, что обеспечивает минимальные конформационные изменения белка в адсорбированном состоянии [165]. Так, в работе [166] было продемонстрировано способность фибронектина – одного из важнейших компонентов внеклеточного матрикса, к адсорбции на поверхности коммерчески чистого титана и сплава Ti-6Al-4V. Адсорбция белков также может увеличивать антибактериальные свойства оксидной пленки, что было показано на примере фибриногена, успешно ингибировавшего колонизацию *P. aeruginosa* на поверхности титана, допированного кальцием [167].

Способность к адсорбции белков, а, следовательно, и адгезии клеток во многом определяется морфологией поверхности оксидной пленки, в частности ее шероховатостью и смачиваемостью [168]. Электрохимические методы модификации позволяют успешно варьировать эти параметры, что способствует активной разработке современных биосовместимых материалов на основе титана и его сплавов. Так, анодирование показало себя более перспективным методом обработки поверхности в биомедицинских целях по сравнению с механической полировкой и травлением кислотой, что выразилось в лучшей адгезии клеток фибробластов Balb/c 3T3 [169]. Схожие результаты получили авторы [170] для человеческих фибробластов и

остеобластов – анодирование проводили при потенциалах 30 и 70 В в 5 % H_2SO_4 .

Шероховатость оксидной пленки оказывает неоднозначное действие на поведение клеток. В работе [171] было показано, что среднеквадратичная шероховатость поверхности титана (R_a) от 0,05 до 1,2 мкм оказывала весьма существенное влияние на начальную адгезию остеобластоподобных клеток, а оптимальная адгезия наблюдалась на образцах со значениями R_a , не превышающих данный диапазон. Авторы [172] также сообщили о благоприятном взаимодействии клеток костной ткани с поверхностью титана, обладающей нанометровой шероховатостью.

Схожие тенденции наблюдаются и для клеток микроорганизмов. В работе [173] было проведено исследование совместной адгезии фибробластов десны человека и бактерий *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* на Ti дисках с различной обработкой поверхности. Результаты показали, что гладкие поверхности более благоприятны для адгезии и пролиферации как фибробластов, так и патогенной флоры.

Различия в размерах зерен при использовании пескоструйной обработки оказали существенное влияние на макро- и микрорельеф поверхности титана, а также способность к адгезии человеческих фетальных фибробластов (hFOB 1.19) при схожих значениях R_a [174]. С помощью современных технологий 3D-печати можно регулировать текстуру рельефа оксидной пленки для улучшения ее биосовместимости, что было показано на примере распределения клеток мышиных (L929s) и человеческих (SCRC-1041) фибробластов на поверхности сплава Ti-6Al-4V [175].

Хорошая гидрофильность поверхности титана и его сплавов способствует как уменьшению индуцированной нейтрофилами провоспалительной трансформации макрофагов, так и улучшению остеоинтеграции титановых имплантатов [176]. Авторы [177,178] показали, что взаимодействие поверхностных гидроксильных групп с положительно

заряженными ионами кальция приводило к образованию титанатов кальция, которые являлись стимуляторами роста гидроксиапатита на поверхности титана. В работе [179] было продемонстрировано, что анодированные и механически обработанные титановые образцы обладали схожей шероховатостью, но различной смачиваемостью – электрохимическая обработка делала поверхность более гидрофильной и приводила к уменьшению значений контактного угла. Проплиферация эпителиальных клеток человека HaCaT на двух видах поверхностей не показала существенных различий, но на анодированном титане была обнаружена более высокая экспрессия и локализация белковых компонентов внеклеточного матрикса.

Различные величины потенциала анодирования (от 25 до 100 В) были использованы в работе для оценки антибактериальных свойств оксидных слоев сплава Ti45Nb по отношению к *E. coli* и *S. aureus* [180]. Было показано, что повышение величины E_{pol} способствовало увеличению смачиваемости поверхности и адгезии клеток бактерий – наибольшая антибактериальная активность наблюдалась у образцов, анодированных при 25 В.

Электрохимически сформированные нанотрубки и подобные структуры также серьезно влияют на биосовместимость титана и его сплавов. Так, анодированные образцы титана с наностержнями на поверхности оксидной пленки показали высокую коррозионную стойкость, гидрофобность и большую электрохимически активную площадь поверхности по сравнению с немодифицированным титаном [181]. В то же время биологическая оценка с использованием остеобластоподобных клеток Saos-2 продемонстрировала остеоталкивающие свойства анодированных образцов.

Высокоупорядоченные нанотрубки диоксида титана, полученные при потенциалах поляризации в диапазоне от 30 до 40 В, показали высокую клеточную адгезию человеческих фибробластов десны, миграцию клеток и экспрессию белков внеклеточного матрикса [182]. Повышение потенциала

анодирования приводило к менее упорядоченной структуре нанотрубок и уменьшало биоактивность поверхности титана.

Структура нанотрубок TiO_2 также характеризуется способностью к повреждению клеточных мембран бактериальных клеток [183,184]. В различных исследованиях показана высокая антибактериальная активность нанотрубок с диаметрами от 30 до 150 нм по отношению к *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* [185], *S. epidermidis* [186], *S. mutans* [187] и многих других. Эта особенность дополнительно снижает резистентность бактерий к антибиотикам ввиду более затруднительного формирования биопленок [188].

В биомедицинских исследованиях также активно используются методики загрузки (допирования) нанотрубок TiO_2 биологически активными соединениями. Так, авторами [189] был использован комплекс цинка с хитозаном для модификации поверхности электрохимически сформированных нанотрубок. Полученные покрытия стимулировали адгезию и пролиферацию остеобластов, а также усиливали экспрессию белков-маркеров роста костной ткани – щелочной фосфатазы и остеокальцина. Соединения селена и серебра были электрохимически осаждены на поверхность нанотрубок оксидной поверхности сплава Ti-6Al-4V для оценки биосовместимости модифицированных материалов с клетками *S. epidermidis* и остеобластами MG-63 [190]. Было отмечено снижение адгезии бактерий и увеличение адгезии клеток костной ткани; результаты свидетельствовали о потенциальном синергетическом эффекте сочетания Se и Ag с нанотрубками.

Гидроксиапатит ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) часто используется для получения композитных материалов на основе титана и его сплавов с помощью электрохимических методов [183,191,192]. Оксидные пленки, содержащие гидроксиапатит, улучшают интеграцию титановых имплантов за счет лучшего контакта с костными тканями [193]. Различные биологически активные металлы, оксиды металлов и другие соединения могут быть использованы в качестве легирующих добавок для усиления

биосовместимых свойств гидроксиапатита [194]. Однако, имеются противоречивые сведения о взаимодействии клеток микроорганизмов с поверхностью гидроксиапатита, что затрудняет его использование в качестве антибактериального покрытия для имплантатов [195]. В то же время анодирование титана в фосфатных буферных растворах является перспективным методом получения оксидных поверхностей, хорошо подходящих для дальнейшего осаждения гидроксиапатита [9,13,14]. Таким образом, изучение взаимодействия подобных образцов электрохимически модифицированного титана с клетками соединительной и костной ткани, а также с патогенной флорой является важной и актуальной биомедицинской задачей.

1.6 Заключение к главе 1

Анализ научных источников в области биоэлектрохимических исследований платины и титана показал высокую актуальность использования данных металлов в биомедицинских целях. Так, сохраняется большой интерес к изучению строения ДЭС на платиновых электродах с различной морфологией, активно разрабатываются новые методики электрохимического анодирования титана, охарактеризованы свойства новых композитных материалов, состоящих из титановых подложек с покрытиями из благородных металлов. Тем не менее, в этой области остаются еще не решенные вопросы:

1. В научной литературе крайне скудно представлены данные об адсорбции аминокислот, не подвергающихся электрохимическому окислению по боковому заместителю, на поверхности платины. Все эти немногочисленные работы используют ЦВА в качестве основного метода оценки адсорбции данных соединений, поэтому использование СЭИ для той же цели в данном исследовании представляет научную новизну.

2. В настоящее время для потенциостатического анодирования титана часто используются электролиты сложного состава, содержащие агрессивные и токсичные компоненты, а также очень большие потенциалы

анодирования, достигающие сотен вольт. Использование более экологичных фоновых электролитов и малых потенциалов анодирования может быть перспективной альтернативой для получения биосовместимых имплантатов на основе титана.

3. Различные методики анодирования приводят к получению сильно отличающихся по морфологическим и химическим свойствам оксидным пленкам титана, что затрудняет их сравнительную оценку. Исследователями редко проводится анализ того, какие именно свойства поверхности могут позитивно или негативно влиять на адгезию клеток (микро)организмов.

Все вышеперечисленное делает необходимым провести оценку биосовместимости компонентов биметаллического имплантата Ti/Pt в модельных условиях. Поскольку данный биметаллический электрод представляет гальваническую пару, в которой Pt является катодом, а Ti – анодом, варьирование потенциала поляризации отдельно взятых компонентов этого электрода позволяет смоделировать электрохимическое поведение биметаллической пары, погруженной в фоновый электролит.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В главе рассмотрены основные методы проведения электрохимических экспериментов с модельными соединениями (аминокислотами), бактериями *M. luteus* 1-I и фибробластами крысы. Описаны процедуры подготовки биоматериала и электродов к электрохимическим и микроскопическим методам, а также параметры, используемые при проведении рентгеноспектральных и электронно-микроскопических опытов.

2.1 Модели активного центра остеокальцина

В работе использовались коммерчески доступные (Reanal, Венгрия, ч.д.а.) L-Glu, D,L-Asp и L-Cys без предварительной очистки.

ЕМА была синтезирована в Иркутском институте химии им. Фаворского; соответствие структурной формуле подтверждено методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии при использовании дейтерированного диметилсульфоксида (DMSO-d_6) в качестве растворителя:

Спектр ^1H ЯМР (DMSO-d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.81-0.85 (т, CH_3 , $J=7.4$), 1.64-1.71 (м, CH_2), 3.06-3.10 (т, CH , $J=7.4$).

Спектр ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 11.83, 21.90, 53.26, 170.95.

Полученные спектры представлены в Приложении (рисунки 1П-2П) и хорошо коррелируют с литературными данными [196].

Выбор именно этих органических кислот для исследования не случаен. Хорошо известно, что на первых этапах в процессах остеоинтеграции, во многом определяющих скорость восстановления костной ткани, непосредственное участие принимает белок остеокальцин, являющийся представителем Gla-белков. Активные центры остеокальцина представляют собой аминокислотные остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты [197]. Структурная особенность последней – две геминально расположенные карбоксильные группы с высокой хелатирующей способностью по отношению к ионам кальция. Остеокальцин способствует увеличению количества остеокластов и остеобластов, а также их активации и, таким образом, способствует ремоделированию кости [7]. Особенности химической

структуры делают Asp, Glu и, особенно, ЕМА простыми и удобными моделями для исследования возможных взаимодействий активного центра остеокальцина с поверхностью биосовместимых металлов (рисунок 1).

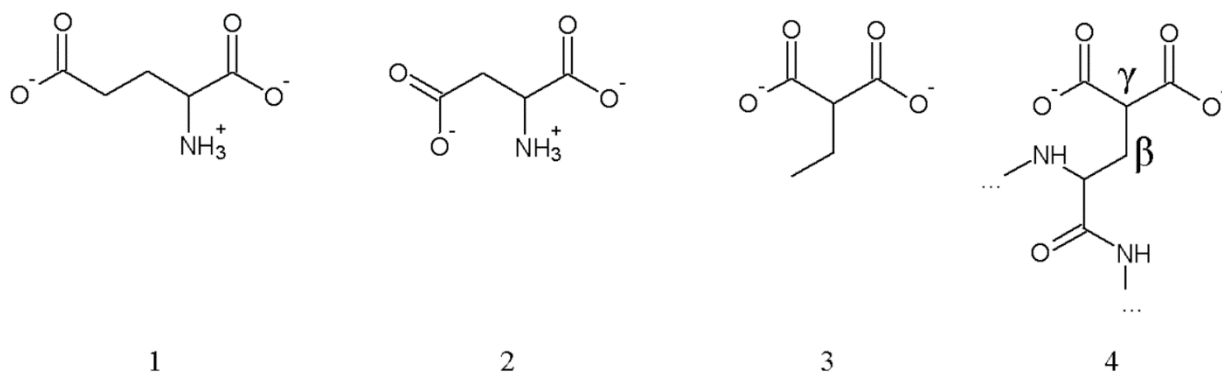


Рисунок 1 - Структурные формулы Glu (1), Asp (2), ЕМА (3) и γ-карбоксиглутаминовой кислоты в пептидном фрагменте (4) при физиологическом значении рН = 7,4 [17].

Эффективность такого подхода, в том числе при изучении электрохимической адсорбции, уже была показана ранее для коммерчески чистого титана [13]. В представляемой диссертационной работе основным электродным материалом для адсорбционных исследований являлась платина. Cys, в свою очередь, является хорошо изученным хемосорбирующимся соединением для Pt, относительно которого удобно проводить сравнение адсорбции используемых дикарбоновых кислот.

В качестве фонового электролита использовали PBS со значением рН = 7,4. Концентрация KH_2PO_4 (х.ч., Вектон, Россия) составила 0,1 М, значения рН корректировали с помощью концентрированного раствора NaOH. Все измерения кислотности среды проводили на рН-метре Аквилон рН410 (Россия). Для приготовления растворов использовали ультрачистую деионизированную воду (18 МОм·см), полученную с помощью системы очистки Adrona Crystal B30 (Латвия).

2.2 Электрохимические измерения в условиях отсутствия биологических объектов

Электрохимическую адсорбцию дикарбоновых кислот и цистеина на платиновом электроде оценивали двумя методами – циклической вольтамперометрией с высокой скоростью наложения потенциала (10 В/с), основываясь на работах [10–12], и спектроскопией электрохимического импеданса, основываясь на работе [13]. Электрохимическое поведение титана в фоновом электролите дополнительно изучали с помощью поляризационных кривых.

Все электрохимические измерения проводились на потенциостате Autolab PGSTAT 128N (Metrohm, Нидерланды) с модулем FRA32M для проведения импедансных исследований, а также программным обеспечением NOVA 1.10.

В диссертационной работе использовали трехэлектродную ячейку объемом 30 мл, в которой хлоридсеребряный электрод Ag/AgCl/NaCl (3M) применяли как электрод сравнения, а платиновую сетку – как вспомогательный электрод. Все потенциалы, приведенные в разделе «Обсуждение результатов», даны относительно хлоридсеребряного электрода сравнения, если не указано иное.

В качестве рабочих электродов использовали платиновые электроды с различной площадью геометрической поверхности, титановый электрод и коаксиальный биметаллический электрод «титан-платина», в котором Ti является внешней частью, а Pt – внутренней, соответственно [15]. Для вольтамперометрических измерений с низкой скоростью наложения потенциала и отсутствием электрохимической обработки использовали платиновый электрод с $S_{Pt} = 0,20 \text{ см}^2$ (Metrohm, Нидерланды). В вольтамерометрических экспериментах с высокой скоростью наложения потенциала и импедансных экспериментах использовали платиновый электрод с $S_{Pt} = 0,03 \text{ см}^2$ (BASi, США).

Титановый электрод был изготовлен из коммерчески чистого Ti марки BT1-0 (см. таблицу 2), а площадь его рабочей поверхности S_{Ti} составила 0,07 см².

Таблица 2. Химический состав (%) титана BT1-0 согласно ГОСТ 19807-91 «Титан и сплавы титановые деформируемые. Марки» [198].

Ti	Fe	C	Si	N	O	H	Примеси
99,24- 99,70	до 0,25	до 0,07	до 0,10	до 0,04	до 0,20	до 0,01	0,30
Примечание: допускается содержание Al до 0,70 %.							

Общая геометрическая площадь рабочей поверхности биметаллического имплантата $S_{Ti/Pt}$ составила 1,13 мм² с площадью платинового компонента, равной 0,50 мм². Боковые поверхности рабочих электродов были изолированы либо стеклом (в случае Ti и Ti/Pt) либо полиэфирэфиркетон (в случае Pt).

Поверхности рабочих платиновых электродов перед использованием полировали абразивным порошком из мелкодисперсного Al₂O₃ (0,5 мкм, Metrohm, Нидерланды), титановых – абразивной алмазной пастой (0,5 мкм, ПО КАРАТ, Россия), после чего их протирали и ополаскивали этиловым спиртом (96 %). Подготовленные таким образом платиновые электроды обрабатывали 5 минут в ультразвуковой ванне (УЗВ-1,3, Сапфир, Россия), затем снова ополаскивали деионизированной водой. Титановые электроды обрабатывали аналогичным способом, но в этиловом спирте – для избежания излишней пассивации поверхности. После этого электроды сушили на открытом воздухе.

Перед использованием вся стеклянная посуда и электрохимическая ячейка обрабатывались горячей смесью концентрированной серной кислоты (Вектон, Россия, х.ч.) и 30 %-ого раствора пероксида водорода (Вектон). После обработки моющей смесью посуду тщательно ополаскивали сначала горячей, потом холодной проточной водой и затем трижды – деионизированной водой. После этого посуду сушили в сушильном шкафу

при температуре 100 °С для дополнительной стерилизации, особенно важной при работе с биологическими объектами.

Непосредственно перед электрохимическими экспериментами исследуемые растворы деаэрировали аргоном (99,9 %) в течение 5 минут для устранения влияния растворенного кислорода на полученные результаты. В ходе опытов аргон также непрерывно пропускали над поверхностью растворов.

Для проведения вольтамперометрических экспериментов с высокой скоростью наложения потенциала (10 В/с), рабочий платиновый электрод ($S_{Pt} = 0,03 \text{ см}^2$) подвергали дополнительной электрохимической предобработке (рисунок 2), ранее апробированной для электрохимического анализа адсорбции различных аминокислот на Pt [10–12].

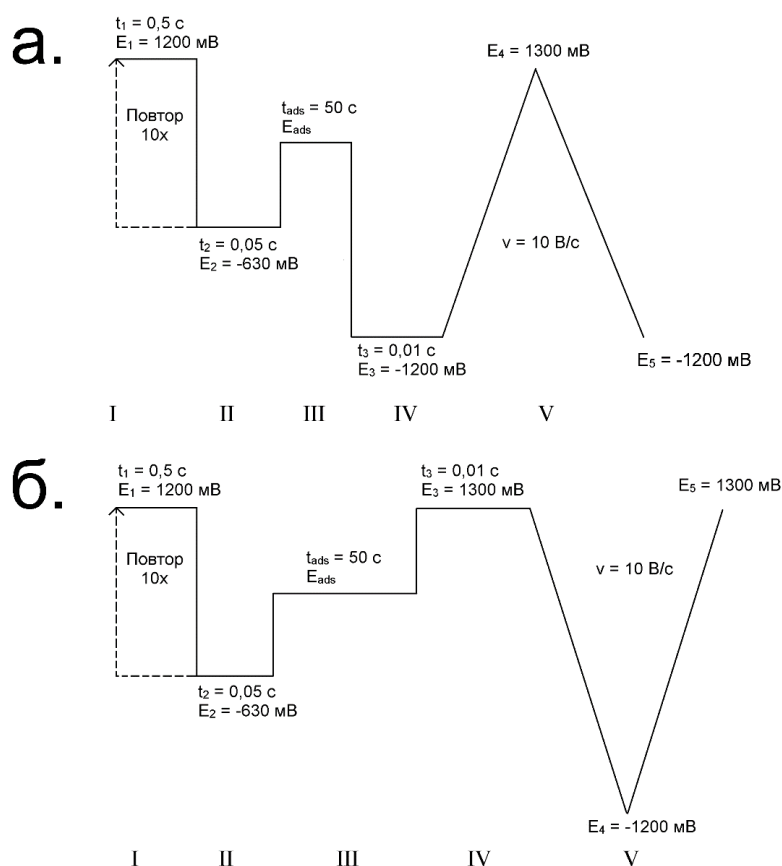


Рисунок 2 - Программы электрохимической предобработки рабочего платинового электрода для оценки адсорбции аминокислот по уменьшению пика десорбции водорода (а) и десорбции кислорода (б) в режиме высокоскоростной циклической вольтамперометрии (см. подробности в [10]).

Суть процедуры заключалась в подаче кратковременных анодных и катодных импульсов, соответствующих потенциалам выделения кислорода и водорода в исследуемых условиях. Далее, для вольтамперометрических измерений на рабочий электрод в течение времени адсорбции t_{ads} налагали варьируемый потенциал адсорбции E_{ads} в диапазоне от $-0,40$ до $0,60$ В, после чего измеряли циклическую вольтамперограмму в пределах потенциалов от E_3 до E_4 .

Вольтамперометрические кривые титанового электрода (при различном времени погружения в исследуемый раствор) измеряли со скоростью наложения потенциала $v = 50$ мВ/с в диапазоне от -0.70 до 1.20 В, начиная развертку в анодном направлении. Поляризационные измерения осуществляли в пределах от -0.40 до 1.00 В относительно E_{OC} со скоростью 1 мВ/с.

При использовании спектроскопии электрохимического импеданса для оценки влияния величины прикладываемого потенциала на процесс адсорбции аминокислот, платиновый электрод предварительно поляризовали при потенциалах $E_{pol} = -0,25; 0,00; 0,25$ и $0,50$ В в фоновом электролите и растворах адсорбатов в течение 1 часа. Последующие импедансные эксперименты проводили при потенциале $0,00$ В, аналогично работе [13]. В случае титанового электрода измерения также осуществляли при значениях потенциала E_{OC} с варьированием времени погружения электрода в фоновый электролит, а также при анодных потенциалах $E_{pol} = 0,00; 0,25; 0,50; 0,75$ и $1,00$ В сразу после деаэрирования фонового электролита.

Импедансные эксперименты проводили в области частот переменного тока от 10000 Гц до 1 Гц, амплитуда колебаний прикладываемого потенциала составила 10 мВ. Все импедансные эксперименты осуществляли в потенциостатическом режиме.

2.3 Культивирование, приготовление суспензий и электрохимические эксперименты со штаммом *M. luteus* 1-I

В качестве модельной бактерии для экспериментов по изучению адгезии клеток *in situ* с помощью СЭИ был выбран штамм *M. luteus* 1-I. Данный вид бактерий является частью микрофлоры человека и может быть условно патогенным при снижении иммунитета [199], а также проявляет высокую устойчивость к различным факторам окружающей среды, например, присутствию тяжелых металлов [200] или радиации [201]. *M. luteus* 1-I активно используется в микробных топливных элементах из-за его высокой электрогенной активности [202,203]. Данный штамм был выделен из активного ила очистных сооружений АО «Ангарская нефтехимическая компания» (Ангарск, Россия) и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM Ac-2637D.

Используемый штамм *M. luteus* 1-I выращивали на ГРМ агаре (состав среды, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 12,0; пептон ферментативный – 12,0; натрия хлорид – 6,0; агар микробиологический – $10,0 \pm 2,0$) при оптимальной для роста штамма температуре 30 °C. В электрохимических и оптических экспериментах применяли суточную культуру *M. luteus* 1-I. Суспензии *M. luteus* 1-I готовили путем смыва бактериального налета с агаровой подложки 10 мл рабочего раствора (0,1 М PBS pH 7,4) с получением первичной суспензии.

В экспериментах по изучению влияния потенциала поляризации E_{pol} на адгезию клеток *M. luteus* 1-I дополнительно были использованы рабочий стеклоуглеродный электрод (GC, BASi, США, $S_{GC} = 0,11 \text{ см}^2$) и угольно-пастовый электрод (CPE, $S_{CPE} = 0,05 \text{ см}^2$). Последний состоял из мелкодисперсного графитового порошка и силиконовой жидкости в качестве связующего агента при соотношении 9:1, соответственно [204]. Рабочую поверхность стеклоуглеродного электрода полировали алмазной пастой, обрабатывали ультразвуком в этаноле и воде, аналогично процедуре очистки Pt и Ti электродов. Рабочая поверхность электрода из углеродной пасты

обновлялась путем механического удаления тонкого поверхностного слоя перед каждым электрохимическим экспериментом. Бактериальные суспензии для электрохимических опытов были приготовлены путем разбавления первичной суспензии *M. luteus* 1-I до 25 мл фоновым электролитом PBS, после чего деаэрированы аргоном. Процесс поляризации и измерения импеданса осуществляли как в предыдущем разделе для всех электродных материалов.

В опытах с варьированием концентрации бактерий и времени погружения рабочего платинового электрода в суспензию *M. luteus* 1-I дополнительно использовали D-глюкозу (Glc, Ленреактив, Россия, ч.д.а.) в концентрации 10 мМ в качестве субстрата. Определенную аликвоту первичной суспензии разводили до фиксированного объема в 25 мл рабочим раствором (PBS + 10 мМ Glc). Таким образом, для дальнейших опытов были приготовлены суспензии 1.0; 2.5; 5.0 и 10.0 мл *M. luteus* 1-I на 25 мл PBS, содержащего Glc.

Для дальнейших импедансных экспериментов по адгезии клеток *M. luteus* 1-I на платиновом электроде проводили электрохимическую предобработку поверхности последнего в PBS pH 7,4, не содержащем Glc и бактерии. Она заключалась в циклировании потенциала в области от $-0,675$ В до $1,200$ В со скоростью сканирования $0,250$ В/с (50 циклов). Данная процедура предназначалась для получения хорошо воспроизводимых значений емкости ДЭС и удаления возможных органических и неорганических загрязнений, оставшихся после механической полировки [205,206].

Общая длительность опыта с суспензиями 1,0 мл *M. luteus* 1-I/25 мл PBS и 2,5 мл *M. luteus* 1-I/25 мл PBS составляла два дня, у более концентрированных суспензий – 1 час. Все эксперименты проводили в инертной атмосфере аргона для устранения мешающего влияния адсорбирующегося растворенного кислорода.

Все электрохимические эксперименты, связанные с адгезией клеток, проводили не менее чем в трех повторностях ($n = 3$). Планки погрешностей на графиках соответствуют стандартным отклонениям.

Для прямого подтверждения бактериальной адгезии на платиновом образце использовали СЭМ. Полированный и химически подготовленный образец (платиновая пластина размером $0,5 \times 1$ см) помещали в суспензию *M. luteus* 1-I (1 мл на 25 мл PBS + 10 мМ Glc) на 2 суток. После этого клетки фиксировали в 2,5% растворе глutarальдегида (Merck, Германия, кат. № G5882), промывали в PBS, дофиксировали в 2% растворе OsO₄ (Merck, Германия) и дегидратировали в восходящем градиенте спирта. Подготовленную платиновую пластину высушивали при критической температуре с помощью сушилки Bal-Tec Critical Point Dryer CPD 030 (Balzers, Sercolab, Бельгия) и покрывали золотом с помощью распылительного устройства SCD 004 (Balzers, Sercolab, Бельгия). Далее образец анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа FEI Quanta 200 (FEI Company, США) для подтверждения бактериальной адгезии штамма *M. luteus* 1-I на платиновом электроде. Оценка площади адгезии клеточных агрегатов на платиновом образце проводилась с помощью программы Image-Pro Plus 6.0.

2.4 Культивирование фибробластов крысы и подготовка анодно поляризованных титановых образцов

Для опытов с фибробластами, титановые пластинки площадью $0,5-1,0$ см² были анодно поляризованы в PBS pH 7,4 при потенциалах 0,00; 0,25; 0,50; 0,75 и 1,00 В в течение 1 часа, аналогично работе [13].

Первичную культуру фибробластов получали из сальника крысы линии Wistar (самец, возраст 3 месяца, вес 200-250 г). Эксперименты проводились в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, регламентированными Международными руководящими принципами Ассоциации по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными,

в соответствии с протоколом № 9 от 16.12.2021, утвержденным Комитетом по этике Иркутского научного центра хирургии и травматологии.

Выделенный в асептических условиях сальник крысы переносили в стерильную чашку Петри и механически фрагментировали и дезагрегировали. Затем фрагменты сальника ферментировали в питательной среде DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich), содержащей 200 ед/мл раствора коллагеназы (Sigma-Aldrich) и 2 % раствора антибиотика/антимикотика (10.000 ед/мл пенициллина, 10.000 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл амфотерицина В, Sigma-Aldrich) при 37 °С. Коллагеназу инактивировали добавлением равного количества питательной среды DMEM, содержащим 15% эмбриональную телячью сыворотку (FBS, Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich) и 1 % раствора антибиотика/антимикотика. Затем клетки дважды промывали центрифугированием в течение 5 минут при 500 g в DMEM, дополненной 10% FBS и 1 % раствором антибиотика/антимикотика.

Полученную первичную культуру фибробластов культивировали в растворе питательной среды DMEM, содержащей 10 % FBS, 1 % раствор антибиотика/антимикотика при температуре 37 °С, влажности 80 % и 5 % CO₂ в биостанции Biostation CT (Nikon, Япония). Все экспериментальные исследования проводили в условиях стерильного ламинарного бокса.

Для получения чистой культуры, фибробласты субкультивировали каждые 7 суток. Фотодокументирование динамики изучаемого процесса осуществляли с помощью BioStation CT 4.1 и программного обеспечения Nis-Elements AR4.1 (Nikon).

Для стерилизации исследуемые образцы поляризованных титановых пластин, а также контрольные неполяризованные образцы предварительно помещали в раствор 70 % этанола на 2 часа и ополаскивали дистиллированной водой. После этого в условиях стерильного бокса образцы помещали в стерильные 24-луночные планшеты (Corning, США) и добавляли DMEM, содержащую 10% FBS, 1% раствора антибиотика/антимикотика с

фибробластами второго пассажа. Планшеты помещали в BioStation CT. Динамику процесса влияния титановой пластины на культуру фибробластов оценивали в течение 3-х суток.

2.5 Морфологические исследования поверхности образцов титана

Методом PCMA на микроанализаторе Superprobe JXA-8200 (JEOL Ltd, Япония) было проведено исследование образцов неполированных титановых пластинок, наклеенных вакуумным пластилином на латунную подложку, с целью исследования неоднородности основной матрицы и выделяющихся по ней поверхностных фаз. Эти характеристики были измерены при ускоряющем напряжении 20 кВ, токе зонда 20 нА, диаметре зонда 1 мкм и времени набора спектра 60 с. Спектры обработаны по программе полуколичественного анализа фирменного ПО микроанализатора.

Спектрометр SPECS (Германия) с анализатором PHOIBOS 150 MCD-9 и источником рентгеновского излучения Mg K α (энергия: 1253,6 эВ; ускоряющее напряжение: 12,5 кВ; ток: 14 мА) был использован для проведения РФЭС. В этом случае образцы титана поляризовали при потенциалах 0,50, 0,75 и 1,00 В в течение 10 минут. Контрольным образцом был неполяризованный титан, который предварительно погружали в PBS на 24 часа для формирования естественной оксидной пленки. Энергия связи C 1s углеводородных загрязнений (285,0 эВ) использовалась в качестве внутреннего стандарта для калибровки спектрометра. Структура поверхностных слоев Ti оценивалась методом ионного травления образцов аргоном. Линии элементов (Ti 2p, O 1s) были использованы для определения химических форм титана и кислорода.

Подгонка полученных экспериментальных пиков была выполнена с использованием программы CasaXPS, поставляемой с соответствующим оборудованием. Экспериментальные спектры были обработаны путем вычитания фона с использованием метода Ширли [207]. Затем спектры были аппроксимированы одной (O 1s) или двумя спектральными (Ti 2p_{1/2} и 2p_{3/2}) кривыми Лоренца-Гаусса. Подробности процедуры аппроксимации

титановых пиков описаны в работе [14]. Разложение спектральных линий O 1s проводили в соответствии с методикой, предполагающей присутствие четырех форм кислорода: структурного оксида (O^{2-} ; ~530,0 эВ) и гидроксида (Ti-OH; ~531,5 эВ), а также двух неструктурных форм (адсорбированный OH^- ; ~531,7–532,7 эВ и адсорбированная H_2O ; ~533,0–534,0 эВ).

Исследования морфологии поверхности поляризованного титана без фибробластов были выполнены на сканирующем зондовом микроскопе СММ-2000 (ПРОТОН-МИЭТ, Москва) в режиме атомно-силовой микроскопии в контактной моде с применением стандартных кантилеверов из Si_3N_4 (Veeco, США) и радиусом закругления сканирующей иглы 30 нм.

Для оценки состояния поверхности титана с адгезированными фибробластами, препараты фиксировали в 2.5 % растворе глутарового альдегида в PBS в течение 1 часа. Далее обезвоженный в батарее спиртов материал высушивали при критической точке в напылительной установке JEE-4B (JEOL Ltd, Япония). Таким образом, биологический материал (фибробласты) был осажден тонкой пленкой на поверхность указанных титановых пластинок.

Исследования методом СЭМ проводили на сканирующем электронном микроскопе MIRA 3 LMN Tescan (Чехия) в режиме вторичных и обратно рассеянных электронов. Для проведения анализа титановые пластинки с биообъектами (фибробластами) без предварительного напыления золотом были закреплены на медной подложке с помощью углеродного скотча, позволяющего улучшить их электропроводность. Условия анализа подбирались экспериментально вариацией ускоряющего напряжения от 5 до 20 кВ и интенсивности электронного пучка от 14 до 17.50 имп. Оптимальные условия выбирались таким образом, чтобы сохранить устойчивость поверхности исследуемых образцов под действием электронного пучка и обеспечить оптимальные условия регистрации аналитического сигнала при наборе спектров аналитических линий определяемых элементов. Были изучены поверхность исследуемых объектов, размеры и форма выделения

поверхностных биообъектов (фибробластов). Элементный состав фибробластов и титановой матрицы определен с помощью системы микроанализа Aztec Live Advanced UltimMax 40 с безазотным энергодисперсионным спектрометром (ЭДС) при ускоряющем напряжении 10 кВ, поглощенном токе 2.3-2.5 нА, диаметре пучка 140 нм. ЭДС анализ выполнен при увеличениях в диапазоне 680-700х. Расчет содержаний выполнен в элементной форме с учетом углерода. Для расчета содержаний использована заводская стандартизация по чистым элементам.

Дополнительно в нескольких образцах проведено картирование поверхности в рентгеновских лучах характеристического излучения элементов с целью изучения однородности распределения определяемых элементов в фибробластах и окружающей матрице. Картирование выполнено в областях, в которых был проведен ЭДС анализ, при идентичных условиях.

Обработку изображений с BioStation СТ для определения биосовместимости Ti проводили с помощью ПО Gwyddion. Анализ распределения фибробластов на поверхности титановых образцов проводили в программе Image J.

2.6 Заключение к главе 2

Для описания электрохимического поведения титана и платины, а также их морфологических свойств были использованы соответствующие стандартные методы, однако были предложены новые решения, ранее не описанные в литературе:

1. СЭИ была использована для описания электрохимической адсорбции низкомолекулярных соединений с различным сродством к поверхности платины в условиях катодной и анодной поляризации.

2. Электрохимические методы анализа были применены для изучения влияния величины E_{pol} на адгезию клеток *M. luteus* 1-I при использовании различных электродных материалов.

3. Биосовместимость титановых образцов, анодно поляризованных в PBS, к фибробластам крысы была исследована с помощью комплекса спектроскопических и микроскопических методов.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данная глава посвящена электрохимическим экспериментам, проведенным с титаном и платиной в растворах, моделирующих биологическую среду. Продемонстрировано влияние электростатической и химической адсорбции, а также клеточной адгезии на электрохимические и морфологические свойства платины и титана.

3.1 Влияние потенциала поляризации на адсорбцию модельных соединений на платиновом электроде

3.1.1 Циклическая вольтамперометрия

Электрохимическое поведение биметаллической пары свидетельствует о сочетании свойств обоих компонентов, но при анодной поляризации вольтамперограмма, пусть и со значительным анодным смещением (вполне ожидаемым для металлической пары), имеет вид, значительно более характерный для титанового электрода, в то время как на катодной ветви вольтамперной кривой Ti/Pt явно заметен профиль, характерный для платинового электрода. Таким образом, несмотря на то, что видимая поверхность платины в биметаллическом имплантате как рабочем электроде меньше, чем у второго компонента – титана, заметно влияние платины на электрохимическое поведение имплантата в условиях слабой электрохимической поляризации (рисунок 3а).

Добавление в фоновый буферный раствор дикарбоновых кислот, моделирующих основные компоненты активного центра остеокальцина, подтверждает предварительные данные о низкой адсорбционной и окислительно-восстановительной активности аминокислот на платине в области потенциалов от $-0,70$ до $1,20$ В (рисунок 3б), и демонстрирует весьма заметную схожесть в электрохимическом поведении не только Asp и Glu, но и ЕМА, у которой, в отличие от аминокислот, отсутствует положительно заряженная в нейтральных растворах аминогруппа.

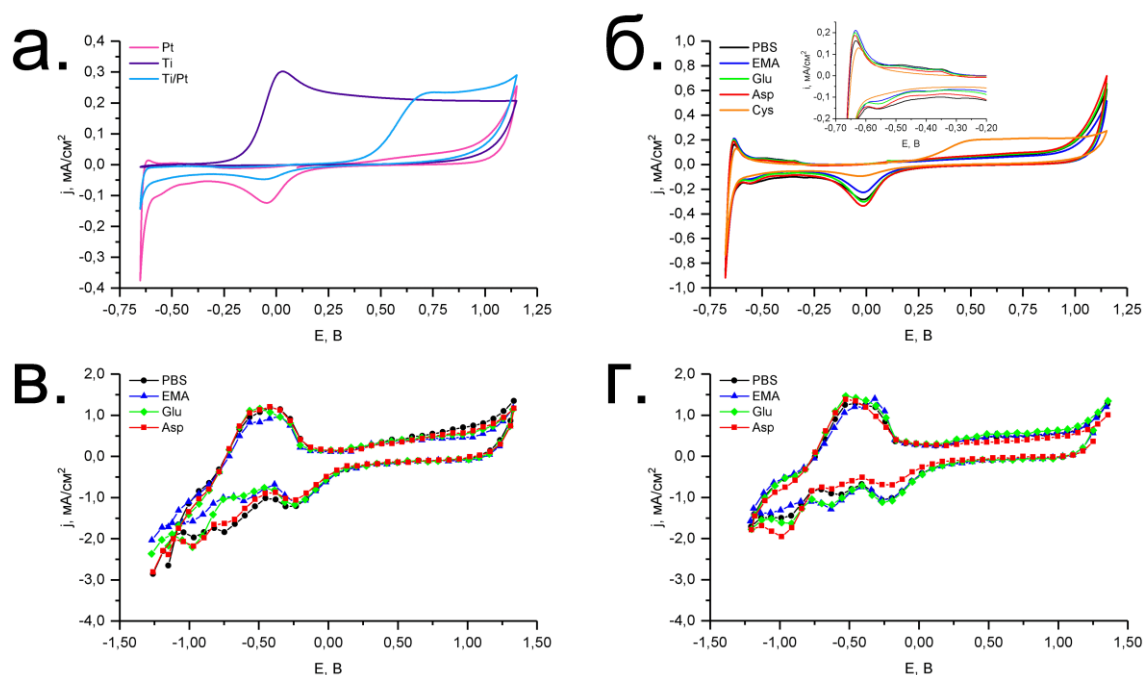


Рисунок 3 - (а) Циклические вольтамперограммы, измеренные в 0,1 М PBS на титановом, платиновом и биметаллическом (Ti/Pt) электродах. Скорость развертки потенциала 50 мВ/с. (б) Циклические вольтамперограммы, измеренные на Pt ($S_{Pt} = 0,20$ см²) при добавлении 1мМ: этилмалоновой кислоты, глутаминовой кислоты; аспарагиновой кислоты и цистеина. Скорость развертки потенциала – 50 мВ/с. (в; г) Циклические вольтамперограммы, измеренные на платиновом электроде в 0,1 М PBS и 1 мМ растворах анализируемых соединений в режиме «быстрой» вольтамперометрии. Потенциал адсорбции $E_{ads} = 0,60$ В, скорость развертки – 10 В/с; (в) – анодное направление развертки, (г) – катодное направление развёртки.

Анализ литературных данных по электрохимическому поведению аспарагиновой и глутаминовой кислот на платиновом электроде показал, что эти вещества ни специфическому электроокислению и/или электровосстановлению, ни заметной хемосорбции в двойнослойной области потенциалов не подвергаются и, таким образом, в специфических электрохимических взаимодействиях с платиной практически не участвуют. Величины заполнения этими аминокислотами поверхности платинового электрода (Θ_{CV}) в исследуемых условиях были получены методом, успешно

апробированном в диссертации [10] и статьях [11,12]. Кроме того, по результатам вышеуказанных работ удалось установить, что измерение адсорбции по уменьшению количества электричества, затрачиваемого на десорбцию водорода с поверхности платинового электрода в присутствии в растворе конкурирующего адсорбата (Cys), адекватно измерению адсорбции по десорбции кислорода – методу, неоднократно апробированному при изучении подобных систем на золоте [208]. В связи с этим, измерения величин степени заполнения Θ_{CV} в этой работе также проводили и по водородному пику, и по кислородному пику ЦВА платинового электрода.

На рисунках 3в и 3г представлены вольтамперограммы, по которым оценивалась степень заполнения электродной поверхности Θ_{CV} в рамках метода циклической вольтамперометрии. После измерения и обработки вольтамперных кривых были рассчитаны количества электричества Q_H , пошедшего на десорбцию водорода в анодном пике тока в области потенциалов от $-0,60$ В до $0,00$ В (рисунок 3в), и количества электричества Q_O , затраченного на десорбцию кислорода в катодном пике в области потенциалов от $0,00$ В до $-0,50$ В (рисунок 3г). Далее, по известным формулам были рассчитаны величины относительных заполнений электродной поверхности Θ_{CV} :

$$\Theta_{CV} = \frac{Q_H^0 - Q_H^x}{Q_H^0}, \quad (24)$$

$$\Theta_{CV} = \frac{Q_O^0 - Q_O^x}{Q_O^0}, \quad (25)$$

где Q_H^0 и Q_O^0 – количество электричества, затраченное на десорбцию водорода и кислорода с поверхности платинового электрода в фоновом электролите; Q_H^x и Q_O^x – количество электричества, затраченное на десорбцию водорода и кислорода с поверхности платинового электрода в фоновом электролите, содержащем конкурентный адсорбат-аминокислоту.

Зависимости степени заполнения поверхности платинового электрода от потенциала адсорбции приведены на рисунке 4.

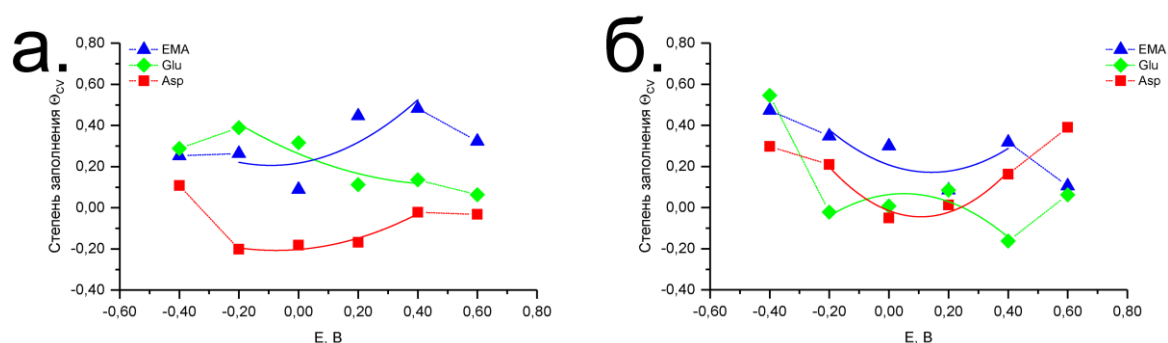


Рисунок 4 – Оценка степени заполнения поверхности платинового электрода по водородному (а) и кислородному(б) пикам десорбции в растворах 1 мМ глутаминовой, аспарагиновой и этилмалоновой кислоты в зависимости от потенциала адсорбции E_{ads} . Время адсорбции $t_{ads} = 50$ с.

Как следует из анализа приведённых данных, исследуемые дикарбоновые кислоты если и адсорбируются на поверхности платинового электрода в представленной области потенциалов, то слабо (ни в одном случае для них величина Θ не превышает 0.55 монослоя) и без заметных корреляций между оценками Θ по кислородному и водородному пику. При этом следует учитывать, что при E_{ads} для крайних точек представленной зависимости (0,60 и -0,40 В), процесс адсорбции проходит при сильном влиянии кислородных и водородных реакций, соответственно, что делает интерпретацию результатов данного метода более затруднительной для приведённых потенциалов адсорбции.

Самым заметным фактом на рисунке 4 является наличие «отрицательной адсорбции» аспарагиновой кислоты при E_{ads} , близких к 0,00 В. Несмотря на наличие объяснений существования «отрицательной адсорбции» в литературе, связанных с особенностями используемого метода и близостью значений E_{ads} величинам E_{pzc} на платине в исследуемых условиях [209], количественно оценивать изменения величин заполнения как функции потенциала адсорбции для отрицательных Θ весьма затруднительно. Но в области наиболее адекватных для используемого

метода величин E_{ads} (от $-0,20$ до $0,40$ В), некоторые тенденции поведения исследуемых дикарбоновых кислот из данных рисунка 4 отследить можно. Так, следует признать схожесть как величин заполнения, так и вида полученных зависимостей для всех трёх исследованных дикарбоновых кислот. Если учесть, что, в отличие от Asp и Glu, ЕМА не является аминокислотой и не имеет аминогруппы в своей структуре (рисунок 1), естественно ожидать и схожесть механизма взаимодействия этих кислот с поверхностью платинового электрода, в котором аминогруппа аминокислот, скорее всего, участия не принимает.

3.1.2 Спектроскопия электрохимического импеданса. Влияние потенциала поляризации на импедансные характеристики исследуемых систем

Наилучшая сходимость между экспериментальными и расчетными параметрами была достигнута при использовании эквивалентной схемы $[R(RC)(RQ)]$, уже апробированной в работе [13] для описания электрохимического поведения титана в схожих условиях.

При анализе полученных данных наибольший интерес представляют диаграммы Найквиста, отражающие зависимость мнимой $-Z''$ части импеданса от вещественной Z' . Они наглядно демонстрируют изменение составляющих импеданса Z при сравнении различных адсорбатов. Добавление Cys, способного к хемосорбции на платиновом электроде, существенно увеличивает как вещественную, так и мнимую часть импеданса в исследуемых системах, что особенно сильно выражено в области малых частот переменного тока (рисунок 5).

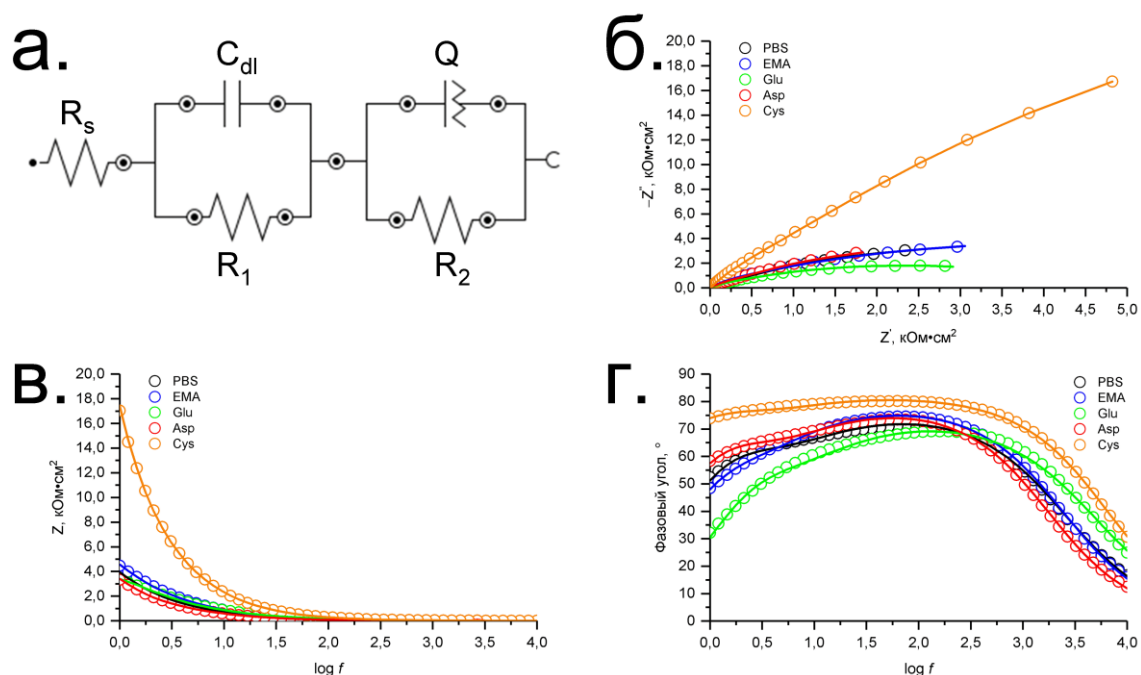


Рисунок 5 - (а) Эквивалентная схема $[R(RC)(RQ)]$, где R_s – сопротивление раствора; C_{dl} – емкость двойного электрического слоя; R_1 – сопротивление переноса заряда через двойной электрический слой; Q – элемент постоянной фазы, характеризующий емкость адсорбированного слоя C_{ads} (выражается адмиттансом 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.

Таким образом, большой рост мнимой части импеданса $-Z''$, при добавлении в исследуемую систему цистеина, вызывает существенное падение ёмкости двойного электрического слоя C_{dl} и увеличение сопротивления переноса заряда через ДЭС R_1 (таблица 3).

Таблица 3. Количественные характеристики элементов эквивалентной схемы $[R(RC)(RQ)]$ для фонового электролита, содержащего конкурентные адсорбаты, полученные после потенциостатической поляризации при различных потенциалах E_{pol} .

$E_{pol} = -0,25 \text{ В}$					
Элемент/Раствор	PBS	EMA	Glu	Asp	Cys

$R_s, \text{ Ом см}^2$	7,20	7,38	6,60	6,78	6,42
$R_1, \text{ кОм см}^2$	8,55	0,54	10,71	4,95	42,60
$C_{dl}, \text{ мкФ см}^{-2}$	51,33	44,00	49,33	47,67	19,00
$R_2, \text{ кОм см}^2$	0,73	0,08	0,62	0,49	1,21
$Q(Y_0), \text{ мкСм с}^N \text{ см}^{-2}$	199,33	426,67	246,33	87,33	89,67
$Q(N),$	0,802	0,709	0,776	0,740	0,797
χ^2	0,009	0,003	0,004	0,008	0,003
$E_{pol} = 0,00 \text{ В}$					
Элемент/Раствор	PBS	EMA	Glu	Asp	Cys
$R_s, \text{ Ом см}^2$	7,11	6,87	6,87	7,02	6,90
$R_1, \text{ кОм см}^2$	5,67	7,50	6,21	5,85	75,60
$C_{dl}, \text{ мкФ см}^{-2}$	46,67	42,67	45,33	38,33	9,00
$R_2, \text{ кОм см}^2$	0,59	0,56	0,81	0,94	3,63
$Q(Y_0), \text{ мкСм с}^N \text{ см}^{-2}$	89,00	96,33	76,67	53,00	19,67
$Q(N),$	0,828	0,790	0,838	0,818	0,853
χ^2	0,015	0,011	0,005	0,011	0,011
$E_{pol} = 0,25 \text{ В}$					
Элемент/Раствор	PBS	EMA	Glu	Asp	Cys
$R_s, \text{ Ом см}^2$	7,08	7,47	6,09	7,29	6,75
$R_1, \text{ кОм см}^2$	6,63	6,78	3,21	4,50	90,30
$C_{dl}, \text{ мкФ см}^{-2}$	41,00	39,00	38,00	34,00	9,67
$R_2, \text{ кОм см}^2$	0,86	1,50	0,98	2,36	2,32
$Q(Y_0), \text{ мкСм с}^N \text{ см}^{-2}$	70,33	51,67	51,00	40,67	39,00
$Q(N),$	0,805	0,838	0,790	0,847	0,819
χ^2	0,025	0,004	0,012	0,029	0,005
$E_{pol} = 0,50 \text{ В}$					

Элемент/Раствор	PBS	EMA	Glu	Asp	Cys
R_s , Ом см^2	7,17	7,38	6,96	6,66	6,57
R_1 , кОм см^2	7,05	9,45	4,89	6,78	41,10
C_{dl} , мкФ см^{-2}	50,33	40,00	41,67	39,67	14,33
R_2 , кОм см^2	0,44	0,81	0,54	0,70	1,31
$Q(Y_0)$, мкСм с^N см^{-2}	162,33	75,00	82,33	73,67	68,00
$Q(N)$,	0,706	0,821	0,792	0,786	0,785
χ^2	0,031	0,028	0,009	0,017	0,007

Построив зависимость ёмкости двойного электрического слоя C_{dl} от потенциала поляризации E_{pol} , можно оценить влияние поляризации на адсорбцию дикарбоновых кислот. Также, зная численные значения ёмкости C , можно по аналогии с уравнениями 24 и 25 рассчитать степени заполнения поверхности Θ_{EIS} :

$$\Theta_{EIS} = \frac{C_{dl}^0 - C_{dl}^x}{C_{dl}^0}, \quad (26)$$

где C_{dl}^0 и C_{dl}^x – ёмкость ДЭС, измеренная на платиновом электроде в фоновом электролите в отсутствие и присутствии конкурентного адсорбата-аминокислоты.

В исследуемых условиях на поверхности платины лучше всего адсорбируется цистеин, степень заполнения поверхности которого достигает значения в 0,80 от монослойного покрытия. Об этом же свидетельствует сильное увеличение сопротивления адсорбированного слоя R_2 . Адсорбция же дикарбоновых кислот не превышает значения $\Theta_{EIS} = 0,30$ в области используемых потенциалов поляризации (рисунок 6).

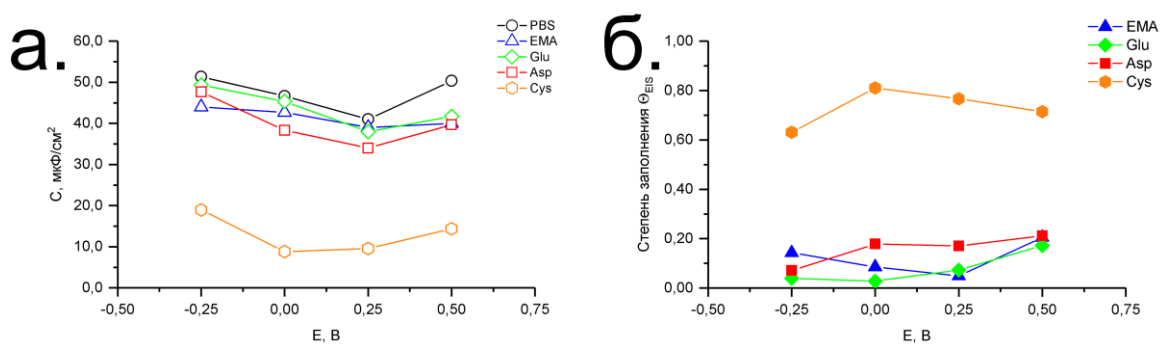


Рисунок 6 - Зависимость емкости двойного электрического слоя C_{dl} (а) и степени заполнения электродной поверхности Θ_{EIS} (б) для PBS pH 7,4, а также при добавлении 1 мМ EMA, Glu, Asp и Cys от потенциала поляризации E_{pol} , В.

Имеющиеся литературные данные предполагают электростатический характер адсорбции алифатических насыщенных моно- и дикарбоновых аминокислот за счет карбоксильных групп. В таком случае поляризация поверхности, особенно анодная, должна благоприятно влиять на адсорбцию аминокислот. На практике это выражается ростом степени заполнения поверхности при больших положительных потенциалах относительно E_{pzc} . В случае специфической адсорбции, характерной для цистеина, максимум степени заполнения электродной поверхности наблюдался в области потенциала нулевого заряда, а минимум – при больших анодных потенциалах.

Таким образом, можно сделать вывод, что оценка адсорбции дикарбоновых кислот методом циклической вольтамперометрии является сложной экспериментальной задачей. Интерпретация полученных данных также серьезно затрудняется из-за различий в значениях степени заполнения в случае её оценки по пикам десорбции водорода или кислорода. Возможно, это происходит из-за электростатического характера адсорбции выбранных дикарбоновых кислот, так как при специфической адсорбции цистеина наблюдается корреляция значений степени заполнения, полученных путем анализа пиков десорбции как водорода, так и кислорода [10].

Спектроскопия электрохимического импеданса более наглядно показывает разницу между электростатической и специфической адсорбцией. Благодаря возможности построения эквивалентных схем, можно напрямую оценить влияние анализируемых веществ на различные характеристики границы раздела фаз, наиболее важной из которых является емкость ДЭС. Полученные значения Θ_{EIS} для дикарбоновых кислот меньше по сравнению с аналогичными Θ_{CV} , а зависимость Θ_{EIS} от потенциала поляризации – более монотонная. Кривая заполнения для цистеина обладает максимумом для потенциала поляризации $E_{pol} = 0,00$ В и «колоколообразной» формой, что коррелирует с результатами вольтамперометрических экспериментов [10]. Также следует отметить, что при использовании данного метода не наблюдается отрицательных значений Θ_{EIS} , встречающихся в электрохимической практике, но сложно поддающихся объяснению при экспериментах в гомогенных средах [210].

В целом, полученные значения Θ для модельных соединений могут свидетельствовать о том, что остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты, присутствующей в остеокальцине, не будут специфически адсорбироваться на платиновом компоненте биметаллического имплантата [13,15]. Поскольку именно за счет γ -карбоксиглутаминовой кислоты происходит связывание кальция и его концентрирование в костной ткани, отсутствие взаимодействий между ней и платиновым электродом будет положительно сказываться на динамике остеорегенерации.

3.1.3 Влияние потенциала поляризации на толщину двойного электрического слоя

Использование эквивалентной схемы на рисунке 5а позволяет оценить влияние потенциала поляризации как на емкость ДЭС (C_{dl}), так и на емкость его адсорбционной части C_{ads} – внутреннего слоя Гельмгольца (рисунок 7).

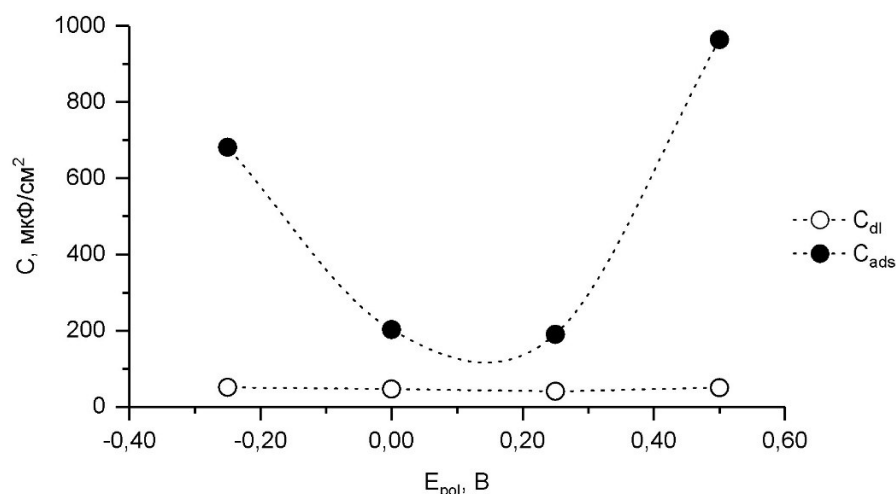


Рисунок 7 - (а) Зависимость C_{dl} и C_{ads} от потенциала поляризации платинового электрода в 0,1 М PBS pH 7,4.

Значения C_{ads} рассчитывали по уравнению 27 [211], используя значения Y_0 ($См \cdot с^N$) и N элемента постоянной фазы, а также параллельно подключенного резистора R_1 (Ом):

$$C_{ads} = Y_0^{\frac{1}{N}} \cdot R_1^{\left(\frac{1}{N}-1\right)} \quad (27)$$

Данные рисунка 7 свидетельствуют о сильном влиянии электростатической адсорбции ионов фонового электролита при потенциалах поляризации $-0,25$ В и $0,50$ В на емкость внутреннего слоя Гельмгольца. Увеличение емкости приводит к уменьшению толщины ДЭС при вышеуказанных потенциалах, что показано в таблице 4. Аналогичное явление для платины наблюдалось в работе [212] – увеличение pH фонового электролита способствовало более выраженной электростатической адсорбции гидратированных катионов Na^+ на поверхности Pt, что сопровождалось ростом значений C_{dl} и уменьшением значений d_{dl} .

Использование полученных значений C_{dl} и формулы плоского конденсатора позволяет рассчитать толщину ДЭС в исследуемых условиях:

$$C_{dl} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r S}{d_{dl}}, \quad (28)$$

где ϵ_0 – электрическая проницаемость вакуума, Ф/м; ϵ_r – относительная диэлектрическая проницаемость двойного слоя (78,5 по данным работы [31]), S – геометрическая площадь рабочей поверхности Pt электрода, м².

Результаты расчетов приведены в таблице 4.

Таблица 4. Значения толщины ДЭС в фоновом электролите в отсутствие и присутствии конкурентных адсорбатов (1 мМ).

E_{pol}, V	d_{dl} (PBS), нм	d_{dl} (EMA), нм	d_{dl} (Glu), нм	d_{dl} (Asp), нм	d_{dl} (Cys), нм
0,50	1,38	1,74	1,67	1,75	4,85
0,25	1,70	1,78	1,83	2,04	7,19
0,00	1,49	1,63	1,53	1,81	7,72
–0,25	1,35	1,58	1,41	1,46	3,66

Таким образом, электрохимическая адсорбция моделей активного центра остеокальцина приводит к увеличению толщины ДЭС для всех использованных потенциалов поляризации. К сожалению, невозможно оценить влияние данного процесса на толщину внутреннего слоя Гельмгольца ввиду сильного влияния адсорбированных частиц на диэлектрическую проницаемость последнего [31].

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

Анализ адгезии микроорганизмов на электродной поверхности является гораздо более сложной и комплексной задачей по сравнению с аналогичными измерениями адсорбции химических веществ. В этом случае импедансная спектроскопия гораздо лучше подходит для изучения состояния межфазной границы «электрод-электролит» и «электрод-биопленка» по сравнению с ЦВА. Малая амплитуда налагаемого переменного тока в СЭИ оказывают крайне незначительное влияние на активность и число адгезированных клеток на поверхности электрода [213].

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, проведенной аналогично опытам с аминокислотами (рисунок 8). Для получения количественных характеристик емкости использовали эквивалентную схему [R(RC)(RQ)].

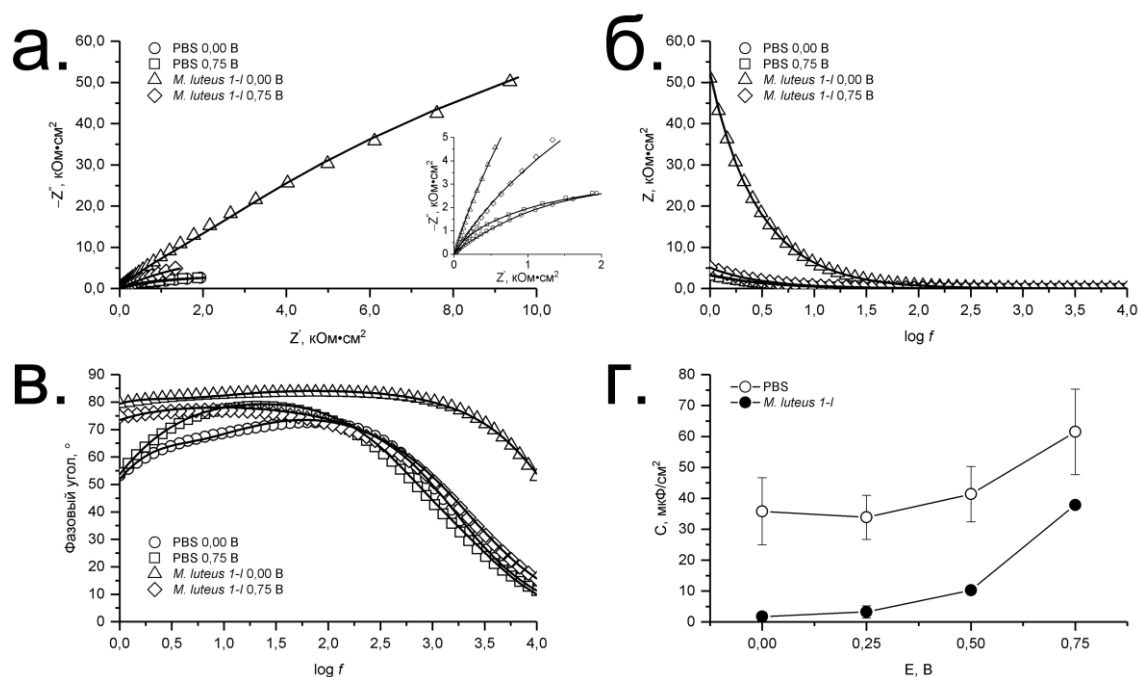


Рисунок 8 - (а) Диаграмма Найквиста и (б, в) диаграммы Боде, измеренные на платиновом электроде в PBS pH 7,4 и бактериальной суспензии *M. luteus* 1-I (10 мл на 25 мл PBS) при потенциалах поляризации 0,00 В и 0,75 В. Линии – смоделированные кривые. (г) Зависимость емкости C_{dl} в PBS pH 7,4 и бактериальной суспензии *M. luteus* 1-I от потенциала поляризации ($n = 3$).

Результаты, полученные на платиновом электроде, сравнивали с аналогичными для углеродных электродов. Выбор данных материалов обоснован предыдущими исследованиями электрохимических и биотехнологических свойств клеток *M. luteus* 1-I в биотопливных элементах с электродами из углеродного волокна [202,203]. Эквивалентную схему [R(RC)(RQ)] также использовали для GC. Для CPE применяли модифицированную схему Рэндлса-Эршлера вида [R(C[RQ])] (рисунок 9).

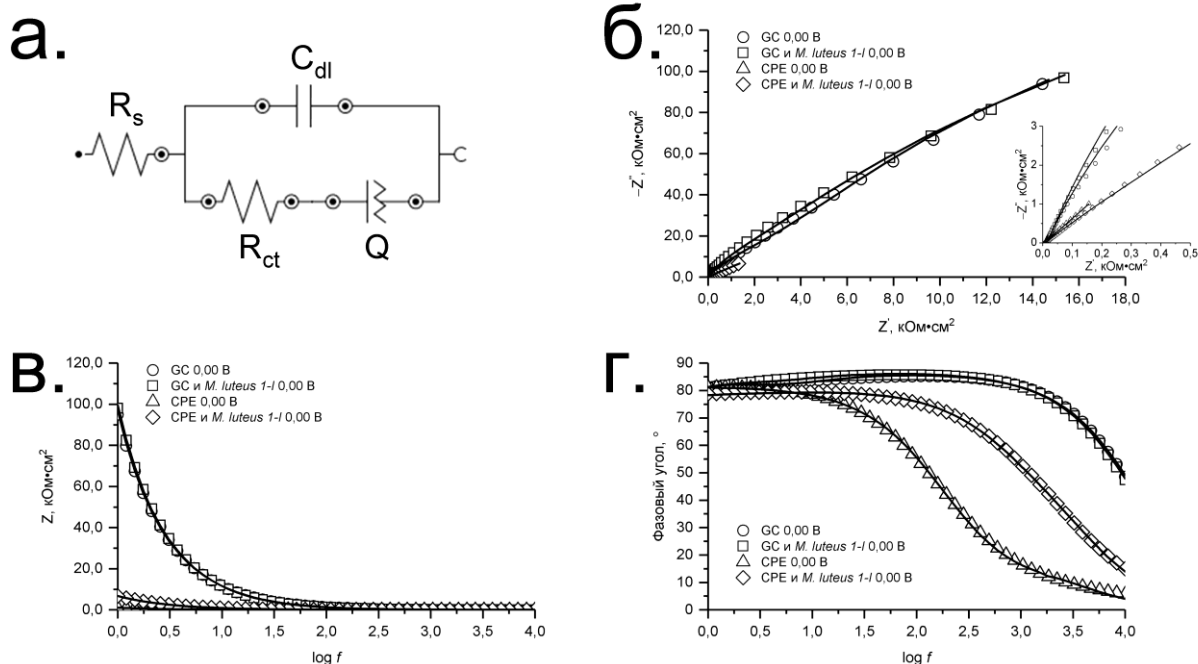


Рисунок 9 - (а) Эквивалентная схема $[R(C[RQ])]$, где R_s – сопротивление раствора; C_{dl} – емкость двойного электрического слоя; R_{ct} – сопротивление переноса заряда через двойной электрический слой; Q – элемент постоянной фазы, характеризующий емкость адсорбированного слоя C_{ads} (выражается адмиттансом Y_0 и фазовым числом N). (б) Диаграмма Найквиста и (в, г) диаграммы Бode, измеренные на стеклоуглеродном и угольно-пастовом электроде в PBS pH 7,4 и бактериальной суспензии *M. luteus* 1-I (10 мл на 25 мл PBS) при потенциале поляризации 0,00 В. Линии – смоделированные кривые. (г) Зависимость емкости C_{dl} для платинового электрода в PBS pH 7,4 и бактериальной суспензии *M. luteus* 1-I от потенциала поляризации.

Рассчитанные значения C_{dl} для углеродных материалов сильно отличаются от полученных C_{dl} при использовании платинового электрода. Это можно объяснить высокой реакционной способностью стеклоуглерода и угольной пасты к кислородсодержащим ионам фонового электролита, что приводит к функционализации электродной поверхности GC и CPE, а также существенному изменению ее электрохимического поведения [214]. Данное обстоятельство может серьезно влиять как на форму зависимости C_{dl} от E_{pol} , так и на адгезию клеток (рисунок 10).

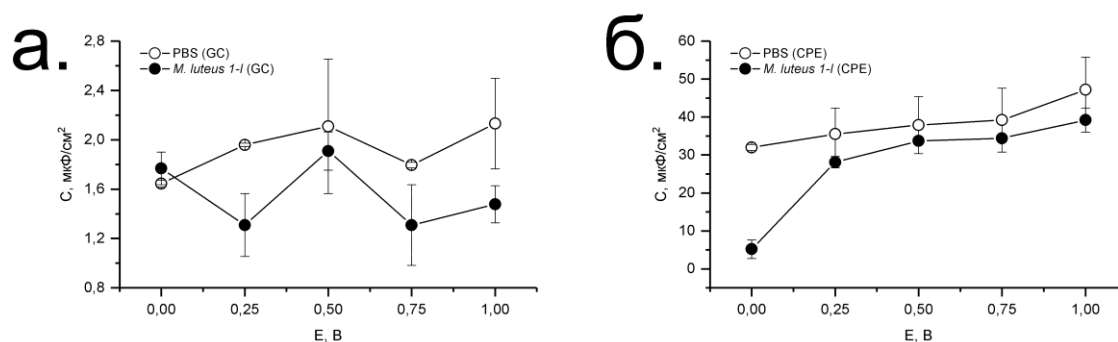


Рисунок 10 - Зависимость емкости C_{dl} для стеклоуглеродного и угольно-пастового электрода в PBS pH 7,4 и бактериальной суспензии *M. luteus* 1-I от потенциала поляризации ($n = 3$).

Значения остальных элементов эквивалентных схем для рабочих электродов приведены в таблице 5.

Таблица 5. Значения резистивных и емкостных характеристик Pt, GC и CP электрода в отсутствие и присутствии клеток *M. luteus* 1-I, измеренные при различных потенциалах поляризации E_{pol} ($n = 3$).

$E_{pol} = 0,00 \text{ В}$						
	Pt	Pt + <i>M. luteus</i> 1-I	GC	GC + <i>M. luteus</i> 1-I	CP	CP + <i>M. luteus</i> 1-I
$R_s, \text{ Ом см}^2$	$5,58 \pm 1,53$	$6,54 \pm 0,63$	$12,38 \pm 0,05$	$12,21 \pm 0,33$	$7,15 \pm 0,25$	$7,35 \pm 0,65$
$R_1, \text{ кОм см}^2$	$10,31 \pm 4,64$	532 ± 124	1040 ± 70	798 ± 132	$0,004 \pm 0,001$	$0,027 \pm 0,005$
$C_{dl}, \text{ мкФ см}^{-2}$	$35,80 \pm 10,87$	$1,74 \pm 1,39$	$1,65 \pm 0,03$	$1,77 \pm 0,13$	$32,00 \pm 0,80$	$5,19 \pm 2,43$
$R_2, \text{ кОм см}^2$	$0,60 \pm 0,01$	$2,23 \pm 1,73$	$6,13 \pm 0,01$	$6,24 \pm 0,16$	—	—
$Q(Y_0), \text{ мкСм с}^N \text{ см}^{-2}$	$70,33 \pm 18,67$	$10,30 \pm 9,50$	$10,73 \pm 1,00$	$11,36 \pm 1,09$	151 ± 6	21 ± 2
$Q(N),$	$0,788 \pm 0,040$	$0,794 \pm 0,043$	$0,870 \pm 0,007$	$0,867 \pm 0,001$	$0,885 \pm 0,001$	$0,778 \pm 0,036$
χ^2	$0,051 \pm$	$0,003 \pm$	$0,004 \pm$	$0,004 \pm$	$0,009 \pm$	$0,007 \pm$

	0,042	0,002	0,001	0,001	0,002	0,004
E _{pol} = 0,25 B						
	Pt	Pt + <i>M. luteus</i> 1-I	GC	GC + <i>M. luteus</i> 1-I	CP	CP + <i>M. luteus</i> 1-I
R _s , Ом см ²	5,88 ± 1,20	6,20 ± 0,32	12,21 ± 0,33	13,81 ± 0,50	7,88 ± 0,43	7,25 ± 0,80
R ₁ , кОм см ²	11,43 ± 4,80	668 ± 418	770 ± 14	950 ± 143	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,003
C _{dl} , мкФ см ⁻²	33,83 ± 7,17	3,27 ± 1,96	1,96 ± 0,01	1,31 ± 0,25	35,50 ± 6,90	28,10 ± 1,50
R ₂ , кОм см ²	0,81 ± 0,05	1,46 ± 1,26	5,93 ± 0,26	9,85 ± 2,36	—	—
Q(Y ₀), мкСм с ^N см ⁻²	59,17 ± 11,17	15,93 ± 13,64	11,68 ± 1,14	7,20 ± 1,25	157 ± 20	110 ± 3
Q(N),	0,790 ± 0,016	0,800 ± 0,026	0,861 ± 0,006	0,873 ± 0,002	0,881 ± 0,007	0,863 ± 0,003
χ ²	0,035 ± 0,027	0,004 ± 0,002	0,004 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,008 ± 0,003
E _{pol} = 0,50 B						
	Pt	Pt + <i>M. luteus</i> 1-I	GC	GC + <i>M. luteus</i> 1-I	CP	CP + <i>M. luteus</i> 1-I
R _s , Ом см ²	6,18 ± 0,99	5,73 ± 0,60	11,44 ± 0,55	11,94 ± 0,61	7,93 ± 0,48	7,23 ± 0,68
R ₁ , кОм см ²	7,40 ± 0,35	94,05 ± 3,15	726 ± 164	548 ± 55	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001
C _{dl} , мкФ см ⁻²	41,37 ± 8,97	10,28 ± 0,38	2,11 ± 0,55	1,91 ± 0,15	37,90 ± 7,50	33,70 ± 0,50
R ₂ , кОм см ²	1,63 ± 1,18	1,56 ± 0,03	6,61 ± 2,22	6,73 ± 0,89	—	—

$Q(Y_0)_{\text{MKCM}}$ $\text{c}^N \text{cm}^{-2}$	$108,67 \pm 53,67$	$53,17 \pm 1,50$	$12,14 \pm 3,77$	$8,47 \pm 0,62$	188 ± 24	165 ± 8
$Q(N)$,	$0,760 \pm 0,064$	$0,794 \pm 0,001$	$0,845 \pm 0,006$	$0,869 \pm 0,004$	$0,875 \pm 0,004$	$0,868 \pm 0,001$
χ^2	$0,021 \pm 0,015$	$0,017 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,002$	$0,018 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,004$
$E_{\text{pol}} = 0,75 \text{ B}$						
	Pt	Pt + <i>M. luteus</i> 1-I	GC	GC + <i>M. luteus</i> 1-I	CP	CP + <i>M. luteus</i> 1-I
$R_s, \text{OM cm}^2$	$6,35 \pm 0,83$	$5,72 \pm 0,23$	$11,17 \pm 0,39$	$12,49 \pm 0,39$	$7,73 \pm 0,48$	$7,15 \pm 0,70$
$R_1, \text{KOM cm}^2$	$4,88 \pm 1,37$	$28,56 \pm 0,36$	685 ± 52	653 ± 101	$0,004 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,001$
$C_{\text{dl}}, \text{MK}\Phi \text{cm}^{-2}$	$61,50 \pm 13,83$	$37,83 \pm 0,83$	$1,80 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,33$	$39,20 \pm 8,40$	$34,40 \pm 1,00$
$R_2, \text{KOM cm}^2$	$2,34 \pm 1,14$	$8,94 \pm 6,99$	$7,16 \pm 0,69$	$12,51 \pm 4,54$	—	—
$Q(Y_0)_{\text{MKCM}}$ $\text{c}^N \text{cm}^{-2}$	$208,83 \pm 167,83$	$120,83 \pm 44,17$	$9,05 \pm 0,77$	$4,61 \pm 1,89$	213 ± 15	179 ± 1
$Q(N)$,	$0,716 \pm 0,014$	$0,772 \pm 0,022$	$0,849 \pm 0,001$	$0,884 \pm 0,002$	$0,874 \pm 0,007$	$0,868 \pm 0,001$
χ^2	$0,032 \pm 0,007$	$0,033 \pm 0,009$	$0,008 \pm 0,001$	$0,016 \pm 0,003$	$0,015 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,004$
$E_{\text{pol}} = 1,00 \text{ B}$						
	GC	GC + <i>M. luteus</i> 1-I	CP	CP + <i>M. luteus</i> 1-I		
$R_s, \text{OM cm}^2$	$11,61 \pm 0,39$	$11,99 \pm 0,99$	$7,68 \pm 0,53$	$7,20 \pm 0,70$		
$R_1, \text{KOM cm}^2$	634 ± 67	573 ± 53	$0,004 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,001$		
$C_{\text{dl}}, \text{MK}\Phi$	$2,13 \pm 0,37$	$1,48 \pm 0,15$	$47,20 \pm 8,60$	$39,20 \pm 3,20$		

см^{-2}				
$R_2, \text{кОм см}^2$	$6,82 \pm 1,52$	$8,81 \pm 0,90$	—	—
$Q(Y_0), \text{мкСм}$ $\text{с}^N \text{см}^{-2}$	$11,91 \pm 3,18$	$5,50 \pm 0,68$	267 ± 9	228 ± 32
$Q(N),$	$0,840 \pm 0,007$	$0,877 \pm 0,004$	$0,878 \pm 0,008$	$0,871 \pm 0,007$
χ^2	$0,005 \pm 0,001$	$0,016 \pm 0,001$	$0,017 \pm 0,004$	$0,011 \pm 0,004$

В целом, данные рисунков 8 и 10 позволяют предположить, что вследствие незначительных изменений емкости при добавлении бактерий в фоновый электролит, бактериальная адгезия *M. luteus* 1-I на углеродных материалах протекает гораздо хуже по сравнению с платиной. Расчеты степени заполнения Θ_{EIS} по позволяет охарактеризовать данные процессы количественно (таблица 6).

Таблица 6. Значения Θ_{EIS} в условиях бактериальной адгезии *M. luteus* 1-I при анодной поляризации выбранных электродных материалов ($n = 3$).

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

Функционализация электродной поверхности углеродных материалов серьезно повлияла на емкость ДЭС в ходе анодной поляризации и привела к низкой адгезии клеток бактерий, за исключением экспериментов с угольно-пастовым электродом при $E_{\text{pol}} = 0,00\text{В}$. Использование эквивалентной схемы $[R(RC)(RQ)]$ для платинового электрода при потенциале поляризации $E_{\text{pol}} = 1,00 \text{ В}$ не дало корректных значений емкости.

По мере роста потенциала поляризации значения Θ_{EIS} уменьшаются, что связано как с увеличивающейся адсорбцией кислородсодержащих частиц на поверхности платинового электрода, так и началом выделения кислорода на поверхности электрода [215]. Это затрудняет процесс бактериальной адгезии в экспериментальных условиях. Однако, 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.

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

3.3.1 Импеданс платинового электрода в бактериальных суспензиях *M. luteus* 1-I

В отличие от адсорбции химических соединений, процесс адгезии клеток и формирования биопленки на электродной поверхности может занимать гораздо более длительное время из-за формирования внеклеточного матрикса, а также пролиферации и дифференцировки клеток [216]. Таким образом, следующим шагом 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, представленную на рисунке 11а.

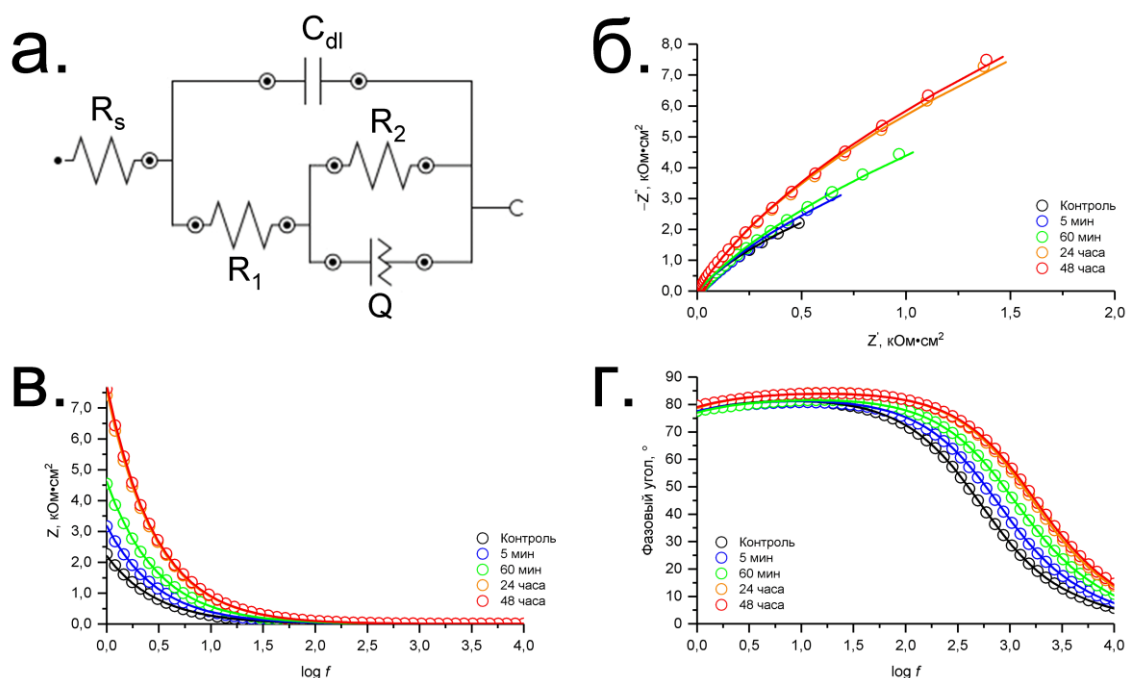


Рисунок 11 - (а) Эквивалентная схема $[R(C[R(RQ)])]$, где R_s – сопротивление раствора; C_{dl} – емкость двойного электрического слоя; R_1 – сопротивление переноса заряда через двойной электрический слой; Q – элемент постоянной фазы, характеризующий емкость адсорбированного слоя C_{ads} (выражается адмиттансом Y_0 и фазовым числом N), R_2 – сопротивление переноса заряда через адсорбированный слой. (б) Диаграмма Найквиста и диаграммы Боде (в, г), измеренные на платиновом электроде в контрольной среде (PBS pH 7,4 с 10 mM Glc) и в суспензиях *M. luteus* 1-I 2,5 мл/25 мл PBS через 5 и 60 минут, 24 и 48 часов. Линии – смоделированные кривые.

С ростом времени выдерживания рабочего электрода в бактериальной суспензии, импеданс и фазовый угол исследуемой системы увеличиваются, особенно в области малых частот (рисунки 11в и 11г). В работе [217] приводится возможная причина этого явления, а именно увеличение степени заполнения поверхности электрода при бактериальной адгезии.

Таким образом, с увеличением времени погружения электрода в бактериальную суспензию, емкость как двойного электрического слоя, так и его адсорбционной части в исследуемой системе снижается (таблица 7). Значения C_{ads} в этом случае также рассчитывали по уравнению 27.

Таблица 7. Значения элементов эквивалентной схемы в контрольной среде (PBS с 10 мМ Glc), а также при добавлении 2,5 мл суспензии *M. luteus* 1-І. Длительность экспериментов составила 48 часов (n = 3).

	Контроль	5 мин	60 мин	24 часа	48 часов
E_{OC} , мВ	222 ± 15	169 ± 33	76 ± 24	93 ± 29	141 ± 10
R_s , Ом см ²	6,45 ± 0,29	6,48 ± 0,32	6,56 ± 0,38	6,68 ± 0,53	6,60 ± 0,59
R_1 , Ом см ²	2,92 ± 0,09	3,62 ± 0,11	5,07 ± 0,17	7,34 ± 0,13	7,56 ± 0,32
C_{dl} , мкФ см ⁻²	24,77 ± 0,82	18,88 ± 1,35	15,13 ± 2,15	12,07 ± 1,93	11,92 ± 2,05
R_2 , кОм см ²	37,71 ± 9,63	49,20 ± 4,41	68,40 ± 10,04	98,85 ± 16,04	104,10 ± 11,76
$Q(Y_0)$, мкСм с ^N см ⁻²	65,33 ± 5,99	47,33 ± 4,35	35,12 ± 5,62	19,97 ± 4,95	19,92 ± 4,99
$Q(N)$,	0,864 ± 0,008	0,849 ± 0,010	0,837 ± 0,016	0,851 ± 0,024	0,850 ± 0,023
C_{ads} , мкФ см ⁻²	75,33 ± 11,84	55,50 ± 7,48	42,73 ± 10,02	23,65 ± 7,80	23,70 ± 7,76
χ^2 *	0,001	0,002	0,002	0,003	0,002

*Стандартное отклонение не превышало величину 0,001.

Аналогичная картина наблюдается при увеличении концентрации микроорганизмов в бактериальной суспензии (рисунок 12 и таблица 8).

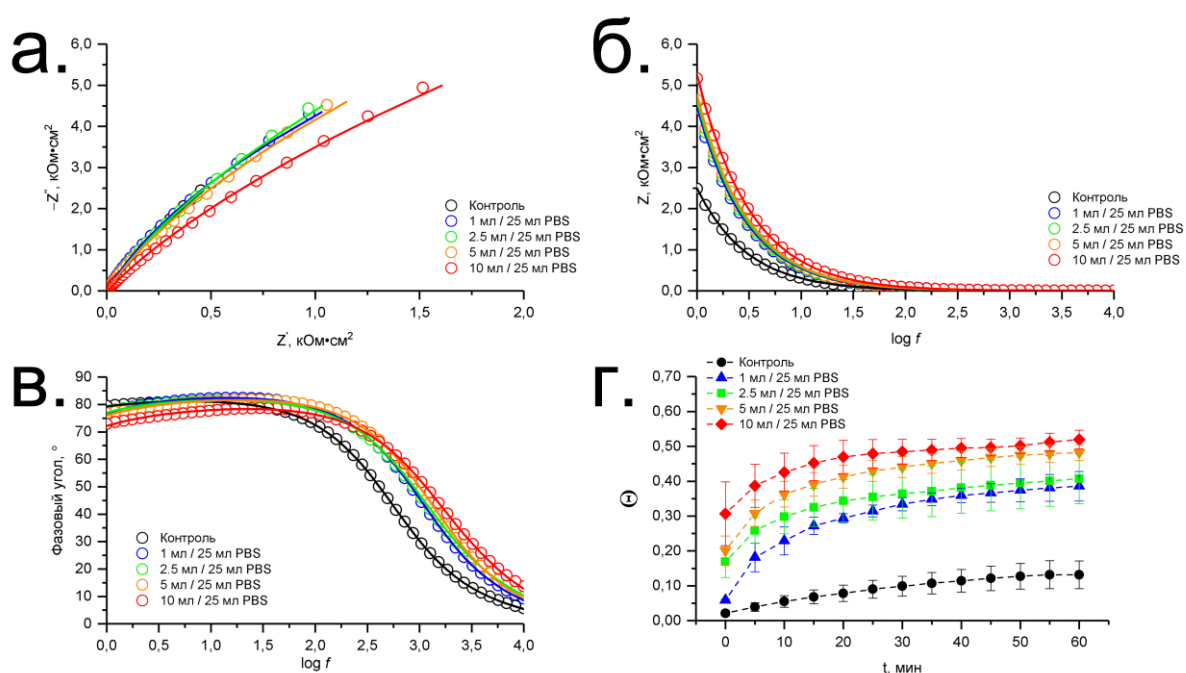


Рисунок 12 - (а) Диаграмма Найквиста и диаграммы Боде (б, в), измеренные на платиновом электроде в контрольной среде (PBS pH 7,4 с 10 мМ Glc) и в суспензиях 1; 2,5; 5 и 10 мл *M. luteus* 1-I на 25 мл PBS при времени выдерживания электрода 60 минут. Линии – смоделированные кривые. (г) График зависимости изменения степени заполнения Θ_{EIS} для исследуемых бактериальных суспензий ($n = 3$).

Таблица 8. Значения элементов эквивалентной схемы в контрольной среде (PBS с 10 мМ Glc), а также при добавлении 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мл суспензии *M. luteus* 1-I. Длительность экспериментов составила 1 час ($n = 3$).

	Контроль	1,0 мл	2,5 мл	5,0 мл	10,0 мл
E_{OC} , мВ	226 ± 12	69 ± 26	76 ± 24	29 ± 13	17 ± 23
R_s , Ом см ²	$6,68 \pm 0,33$	$6,53 \pm 0,33$	$6,56 \pm 0,38$	$6,60 \pm 0,01$	$6,72 \pm 0,02$
R_1 , Ом см ²	$3,72 \pm 0,59$	$4,47 \pm 0,66$	$5,07 \pm 0,17$	$7,58 \pm 0,28$	$7,16 \pm 0,97$
C_{dl} , мкФ см ⁻²	$23,09 \pm 1,89$	$16,78 \pm 0,97$	$15,13 \pm 2,15$	$15,37 \pm 0,03$	$11,75 \pm 2,03$
R_2 , кОм см ²	$55,70 \pm 6,12$	$46,20 \pm 2,69$	$68,40 \pm 10,04$	$52,35 \pm 3,55$	$87,45 \pm 25,11$

$Q(Y_0), \text{мкСм с}^N$	$53,00 \pm 8,28$	$25,12 \pm 0,42$	$35,12 \pm 5,62$	$26,52 \pm 0,75$	$29,92 \pm 0,04$
$Q(N),$	$0,852 \pm 0,009$	$0,848 \pm 0,005$	$0,837 \pm 0,016$	$0,813 \pm 0,001$	$0,813 \pm 0,011$
$C_{\text{ads}}, \text{мкФ см}^{-2}$	$63,56 \pm 9,78$	$25,80 \pm 0,22$	$42,73 \pm 10,02$	$28,57 \pm 0,52$	$36,67 \pm 1,91$
χ^2^*	0,002	0,003	0,002	0,006	0,004

*Стандартное отклонение не превышало величину 0,001.

Использование эквивалентных условий позволяет сравнить изменения емкости при бактериальной адгезии *M. luteus* 1-I в стационарных условиях и условиях анодной поляризации. Значения Θ в этом случае рассчитывали аналогично уравнению 26. Полученные результаты приведены в таблице 9.

Таблица 9. Сравнительная оценка параметра степени заполнения Θ , характеризующего бактериальную адгезию на Pt в стационарных условиях и условиях анодной поляризации, соответственно.

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

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 [218]. 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 [219].

Также из работы [220] известно, что степень заполнения глюкозы Θ_{Glc} при ее концентрации в 11 мМ в фосфатном буферном растворе с pH 7,4 в области используемых потенциалов 0,00 – 0,25 В не превышает 0,10. Таким образом, влиянием присутствия глюкозы на величину Θ_{EIS} в исследуемых условиях можно пренебречь.

3.3.2 Сканирующая электронная микроскопия

Результаты СЭМ показали, что через 2 суток нахождения платинового образца в бактериальной суспензии на его поверхности наблюдалась адгезия агрегатов *M. luteus* 1-I различных размеров – в среднем от 50 до 450 мкм² (рисунок 13).

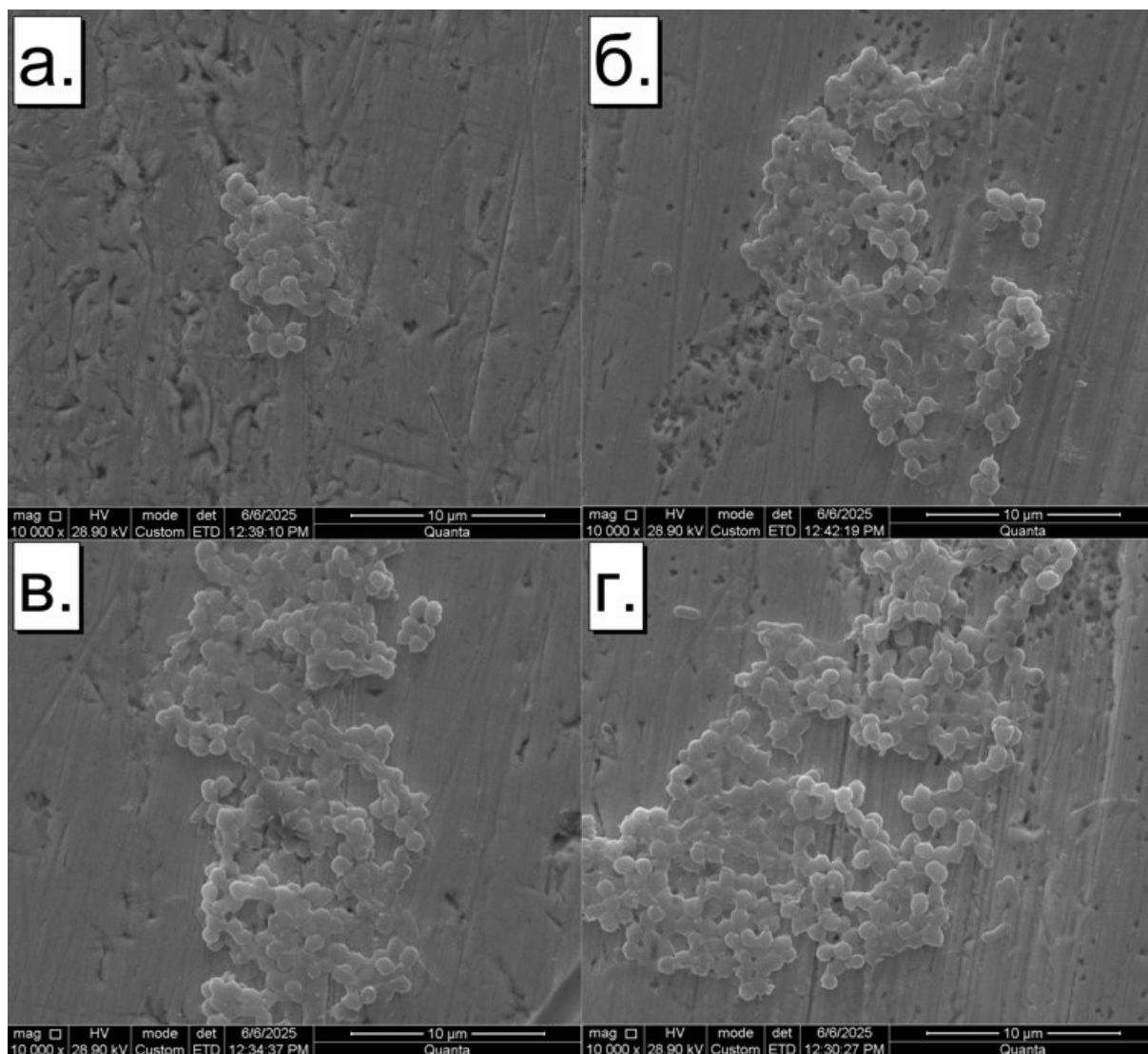


Рисунок 13 - (а-г) Адгезия клеток *M. luteus* 1-I в различных участках платиновой пластины после ее инкубации в суспензии данных микроорганизмов (1мл/25 мл PBS) в течение 48 часов.

Для данных экспериментов была использована суспензия с наименьшим содержанием клеток исследуемого штамма. Этот факт обусловлен адгезией клеток друг с другом при их высокой концентрации, а также последующим осаждением примерно через 24 часа эксперимента. Тем не менее, результаты СЭМ показали присутствие клеток *M. luteus* 1-I на поверхности пластины. Они имеют характерную сферическую форму, как и в других СЭМ-исследованиях этой бактерии [221,222]. Однако, в связи с разным размером полученных клеточных агрегатов оценка влияния времени пребывания образца в растворе на бактериальную адгезию является достаточно сложной задачей. Таким образом, СЭМ-изображения в данном

исследовании являются прямым подтверждением бактериальной адгезии клеток *M. luteus* 1-I на поверхности платины, но на данный момент этот процесс можно охарактеризовать только качественно.

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

3.4.1 Циклическая вольтамперометрия и поляризационные кривые

Циклические вольтамперограммы титанового электрода, измеренные при различном времени погружения, представлены на рисунке 14а.

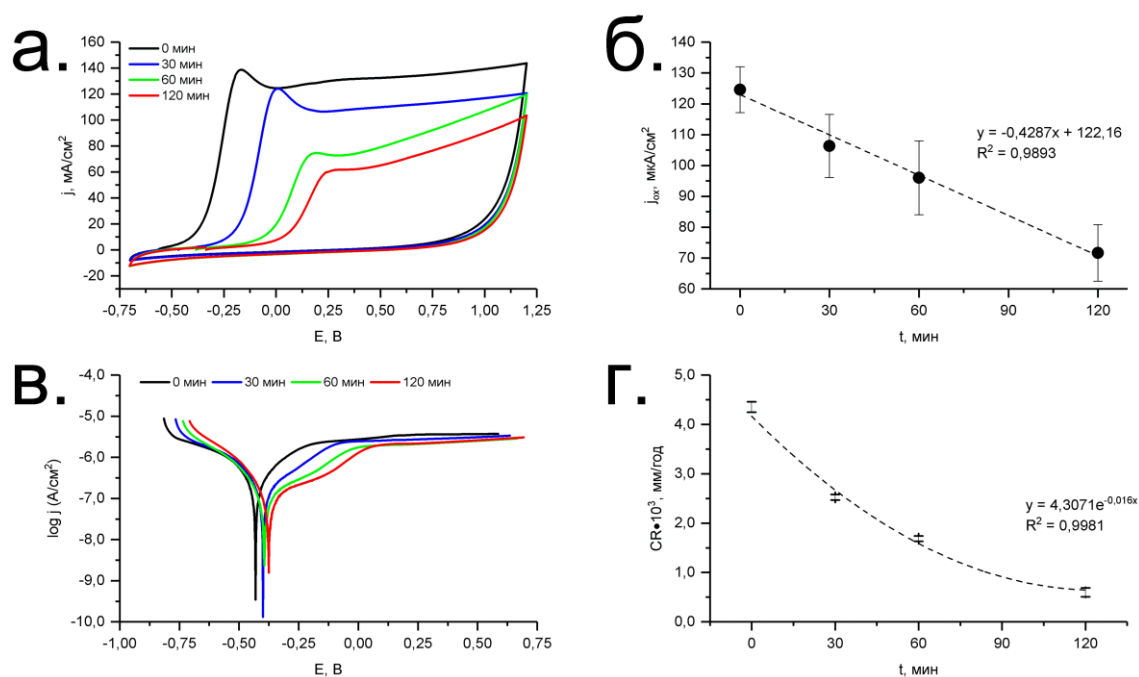


Рисунок 14 - (а) Циклические вольтамперограммы, измеренные в PBS pH 7,4 при времени погружения электрода 0, 30, 60 и 120 минут. Скорость развертки 50 мВ/с. (б) Зависимость плотности тока пика окисления j_{ox} от времени погружения t . Планки погрешностей – стандартные отклонения ($n = 3$). (в) Поляризационные кривые, измеренные в PBS pH 7,4 при времени погружения электрода 0, 30, 60 и 120 минут. Скорость развертки $v = 1$ мВ/с. (г) Зависимость скорости коррозии титанового электрода от времени погружения t . Планки погрешностей – стандартные отклонения ($n = 3$).

Можно отметить, что 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. Зависимость j_{ox} от времени погружения в исследуемых условиях хорошо линейризовалась (рисунок 14б).

На качественном уровне также наблюдалось аналогичное смещение значения коррозионного потенциала E_{corr} и потенциала пассивации E_{pass} в анодную сторону при увеличении времени погружения t (рисунок 14в). Плотность коррозионного тока j_{corr} и тока пассивации j_{pass} также уменьшалась.

Далее параметр j_{corr} был использован для расчета скорости коррозии титана в исследуемых условиях по уравнению 18 (рисунок 14г). Количественные характеристики коррозионного процесса приведены в таблице 10.

Таблица 10. Поляризационные характеристики процесса пассивации поверхности титанового электрода в исследуемых условиях. Доверительные интервалы – стандартные отклонения ($n = 3$).

Параметр / t , мин	0	30	60	120
E_{OC} , мВ	-414 ± 22	-363 ± 11	-338 ± 11	-303 ± 4
b_a	261 ± 13	228 ± 7	185 ± 8	229 ± 67
b_c	399 ± 64	366 ± 76	584 ± 16	128 ± 10
E_{corr} , мВ	-428 ± 3	-408 ± 6	-397 ± 2	-378 ± 13
j_{corr} , нА/см ²	501 ± 12	291 ± 7	194 ± 6	69 ± 11
R_p , кОм см ²	136 ± 11	254 ± 36	314 ± 2	491 ± 37
E_{pass} , мВ	-190 ± 21	-82 ± 18	-28 ± 4	41 ± 17
j_{pass} , мкА/см ²	$1,74 \pm 0,69$	$1,80 \pm 0,71$	$1,36 \pm 0,53$	$1,12 \pm 0,46$

3.4.2 Влияние времени погружения титанового электрода на его импедансные характеристики

Увеличение времени погружения титанового электрода в раствор, имитирующий биологическую среду, также меняет и импедансные

характеристики исследуемой системы. Для соответствия условиям вольтамперометрических и поляризационных опытов, импедансные эксперименты проводили при потенциале разомкнутой цепи E_{OC} в том же временном диапазоне и интервалах.

Экспериментальные данные (диаграммы Боде и Найквиста) анализировали с помощью эквивалентной схемы с подключенным конденсатором и элементом постоянной фазы (рисунок 15).

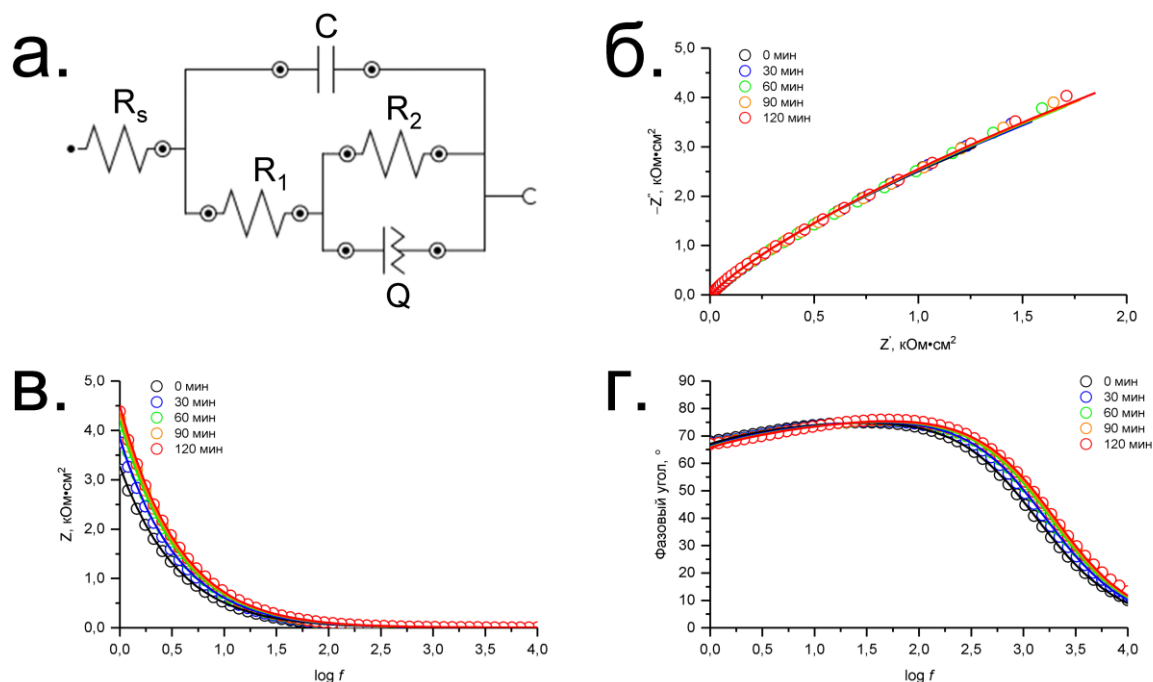


Рисунок 15 - (а) Эквивалентная схема $[R(C[R(RQ)])]$, где R_s – сопротивление раствора; R_1 – сопротивление переноса заряда через внешнюю пористую часть оксидной пленки (TiO_2 – раствор) ; C – емкость внешней пористой части оксидной пленки; R_2 - сопротивление переноса заряда через внутреннюю барьерную часть оксидной пленки ($\text{Ti} - \text{TiO}_2$); Q – элемент постоянной фазы, характеризующий емкость внутренней барьерной части оксидной пленки (выражается адмиттансом Y_0 и фазовым числом N). (б) диаграмма Найквиста и диаграммы Боде (в, г), измеренные на титановом электроде в PBS pH 7,4 при различном времени погружения. Линии – смоделированные кривые.

Значения Q конвертировали в псевдоемкость (эффективную емкость) C_{pseudo} по уравнению 27. Соотнесение участков (R_1C) и (R_2Q) к различным

частям оксидной пленки проводили с помощью модели плоского конденсатора. Поскольку рассчитанные значения C меньше чем C_{pseudo} для стационарных условий и условий анодной поляризации (см. таблицу 11 и далее), то участок (R_1C) относится к широкой пористой части оксидной пленки, а участок (R_2Q) – к тонкому барьерному слою.

Таблица 11. Количественные значения элементов эквивалентной цепи в экспериментах, проведенных в стационарных условиях. Доверительные интервалы – стандартные отклонения ($n = 3$).

	0 мин	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
E_{OC} , мВ	-531 ± 18	-374 ± 4	-331 ± 6	-314 ± 7	-298 ± 9
R_s , Ом cm^2	$7,42 \pm 0,18$	$7,47 \pm 0,19$	$7,49 \pm 0,21$	$7,47 \pm 0,19$	$7,44 \pm 0,20$
R_1 , Ом cm^2	$6,22 \pm 0,27$	$8,66 \pm 0,50$	$9,75 \pm 0,73$	$10,27 \pm 0,80$	$10,64 \pm 0,88$
C , мкФ cm^{-2}	$13,97 \pm 1,16$	$11,39 \pm 0,92$	$10,67 \pm 0,95$	$10,38 \pm 0,97$	$10,11 \pm 0,95$
R_2 , кОм cm^2	$26,65 \pm 4,25$	$42,00 \pm 0,94$	$50,80 \pm 3,38$	$54,90 \pm 5,42$	$57,42 \pm 6,09$
$Q(Y_0)$, мкСм cm^{-2}	$44,81 \pm 6,24$	$35,67 \pm 6,99$	$33,19 \pm 6,53$	$32,14 \pm 6,42$	$31,10 \pm 6,23$
$Q(N)$	$0,780 \pm 0,023$	$0,762 \pm 0,023$	$0,754 \pm 0,024$	$0,752 \pm 0,025$	$0,751 \pm 0,026$
C_{pseudo} , мкФ cm^{-2}	$49,24 \pm 11,71$	$42,00 \pm 11,61$	$40,67 \pm 11,05$	$39,76 \pm 10,78$	$38,62 \pm 10,49$
χ^2	$0,007 \pm 0,002$	$0,008 \pm 0,002$	$0,008 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$

3.4.3 Влияние анодной поляризации титанового электрода на его импедансные характеристики

В случае анодной поляризации, на диаграммах Найквиста и Боде наблюдается еще большее увеличение импеданса в области малых частот (f

→ 1 Гц) по мере роста прикладываемого анодного потенциала (рисунки 16а-16в).

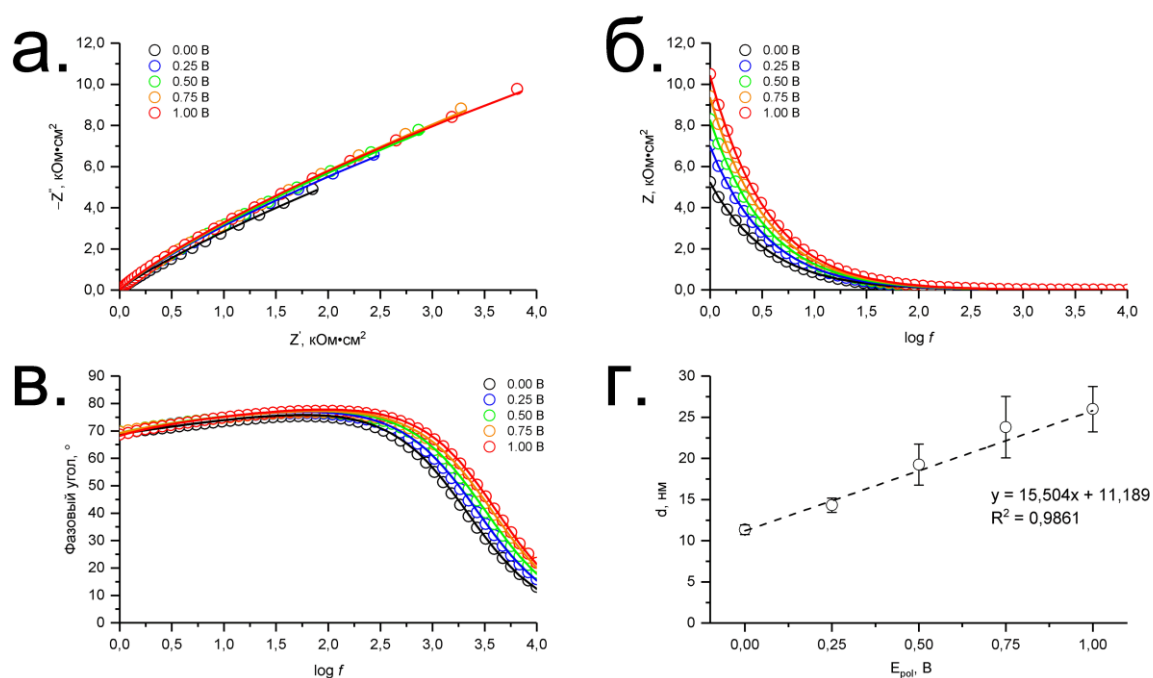


Рисунок 16 - (а) Диаграмма Найквиста, а также диаграммы Боде (б, в), измеренные на титановом электроде в PBS pH 7,4 при различных анодных потенциалах поляризации. Линии – смоделированные кривые. (г)

Зависимость суммарной толщины оксидной пленки титанового электрода от налагаемого потенциала поляризации E_{pol} .

Используя полученные значения C и C_{pseudo} , можно рассчитать условную толщину внутреннего буферного слоя d_{BL} и внешнего поверхностного слоя d_{SL} оксидной пленки по формуле плоского конденсатора (см. уравнения 19 и 20). Также для оценки толщины оксидной пленки подобным способом нужно ввести два допущения:

- Образующаяся в ходе опытов оксидная пленка титана структурно полностью соответствует рутилу. Такое уже было продемонстрировано в коррозионных исследованиях коммерчески чистого титана в средах, близких к физиологическим [223].
- Диэлектрическая проницаемость рутила ϵ_r достигает значения 100 [71].

Так же, как и в случае опытов с различным временем погружения, результаты расчетов приведены в таблице 12.

Таблица 12. Количественные значения элементов эквивалентной схемы в условиях анодной поляризации. Доверительные интервалы – стандартные отклонения ($n = 3$).

	0,00 В	0,25 В	0,50 В	0,75 В	1,00 В
R_s , Ом см ²	$7,63 \pm 0,11$	$7,86 \pm 0,24$	$7,86 \pm 0,41$	$8,00 \pm 0,55$	$8,17 \pm 0,35$
R_1 , Ом см ²	$11,50 \pm 1,21$	$13,18 \pm 3,87$	$15,36 \pm 6,10$	$15,04 \pm 6,27$	$15,80 \pm 7,74$
C , мкФ см ⁻²	$8,67 \pm 0,21$	$7,07 \pm 0,37$	$5,22 \pm 0,58$	$4,51 \pm 0,43$	$4,10 \pm 0,21$
R_2 , кОм см ²	147 ± 20	112 ± 28	164 ± 16	223 ± 78	168 ± 44
$Q(Y_0)$, мкСм c^N см ⁻²	$37,57 \pm 2,54$	$29,19 \pm 1,64$	$24,81 \pm 2,10$	$16,84 \pm 3,89$	$16,03 \pm 3,38$
$Q(N)$	$0,685 \pm 0,015$	$0,693 \pm 0,019$	$0,702 \pm 0,016$	$0,710 \pm 0,013$	$0,708 \pm 0,015$
C_{pseudo} , мкФ см ⁻²	$84,14 \pm 13,91$	$53,52 \pm 7,79$	$52,14 \pm 9,17$	$26,52 \pm 5,69$	$23,30 \pm 5,40$
χ^2	$0,005 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,002$	$0,004 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,003$	$0,006 \pm 0,002$

При сравнении данных в таблицах 11 и 12 становится видно, что значения емкости C при анодной поляризации существенно меньше чем аналогичные значения в стационарных условиях. Значения C_{pseudo} также уменьшаются по мере роста потенциала поляризации, но более значительно, чем при различном времени погружения как в таблице 11. Все это позволяет сделать вывод об увеличении толщины оксидной пленки титана в условиях анодной поляризации.

Использование малого времени поляризации, а также эквивалентных условий (состав фонового электролита, потенциалы поляризации и электрод сравнения) позволяет сравнить расчеты толщины оксидной пленки титана с

результатами эллипсометрических экспериментов в [14]. Данные представлены в таблице 13.

Таблица 13. Значения величин толщины внутреннего буферного слоя и внешнего поверхностного слоя оксидной пленки титана в исследуемых условиях.

Стационарные условия (различное время погружения)						
t, мин		d _{BL} , нм		d _{SL} , нм		Σd, нм
0		1,99 ± 0,40		6,42 ± 0,49		8,41 ± 0,60
30		2,40 ± 0,53		7,88 ± 0,65		10,28 ± 0,94
60		2,47 ± 0,53		8,43 ± 0,75		10,90 ± 0,99
90		2,52 ± 0,54		8,68 ± 0,81		11,20 ± 1,05
120		2,59 ± 0,56		8,91 ± 0,84		11,51 ± 1,06
Условия анодной поляризации						
E _{pol} , В	d _{BL} , нм	d _{BL} , нм [14]	d _{SL} , нм	d _{SL} , нм [14]	Σd, нм	Σd, нм [14]
0,00	1,12 ± 0,26	—	10,22 ± 0,32	—	11,35 ± 0,58	—
0,25	1,73 ± 0,30	—	12,60 ± 0,78	—	14,32 ± 0,87	—
0,50	1,84 ± 0,48	1,80	17,42 ± 2,60	4,30	19,25 ± 2,49	6,10
0,75	3,76 ± 1,22	0,50	20,03 ± 2,52	9,00	23,79 ± 3,73	9,50
1,00	4,30 ± 1,36	0,70	21,69 ± 1,43	21,40	25,99 ± 2,75	22,10

В исследуемых условиях суммарная толщина оксидной пленки титанового электрода прямо пропорциональна потенциалу поляризации (рисунок 16г), что соответствует литературным данным (см. уравнение 23 и работу [91]).

Также следует обратить внимание на используемый элемент постоянной фазы Q , так как он часто используется для описания электрохимических свойств межфазной границы электрод/электролит в тех случаях, когда поверхность электрода является пористой или сильно шероховатой [38]. В этом случае фазовое число N описывает состояние поверхности: чем меньше значение N , тем более неоднородна поверхность электрода.

Из приведенных в этом исследовании данных видно, что значения N для импедансных экспериментов в стационарных условиях немного больше чем в опытах с анодной поляризацией. Это свидетельствует о большей однородности внутреннего буферного слоя оксидной пленки, сформированной в отсутствие анодной поляризации. При потенциалах 0,00 и 0,25 В, напротив, фазовое число N обладает наименьшими значениями. Это свидетельствует о том, что при низких анодных потенциалах образующийся буферный слой наиболее неоднороден по составу.

При суммировании всех экспериментальных данных по импедансной спектроскопии, можно сделать промежуточный вывод о том, что шероховатость внутреннего буферного слоя оксидной пленки титана приблизительно одинакова для всех экспериментов ввиду малых различий в значениях N . Это можно подтвердить тем, что стабильность роста оксидной пленки при увеличении потенциала поляризации может быть, в основном, нарушена только реакцией выделения кислорода. В свою очередь, она протекает при использовании гораздо более высоких анодных потенциалов, чем в этом исследовании [224].

Применение электрохимических методов позволило модифицировать и качественно охарактеризовать поверхность титанового электрода. Таким образом, данные СЭИ были получены одновременно с поляризацией электрода/ростом оксидного слоя. Следовательно, спектры импеданса дают лишь усредненную характеристику процесса образования оксидной пленки и должны рассматриваться как качественная (или, в лучшем случае,

полуколичественная) оценка. Для более точного анализа поверхности, в частности для определения фазового состава и структуры, были использованы методы рентгеновской и электронной микроскопии.

3.4.4 Рентгеноспектральный анализ анодно поляризованных образцов титана

Результаты РСМА показали однородность состава в образцах механически обработанного титана, а также титана после эксперимента в стационарных условиях и условиях анодной поляризации. Во всех случаях титан довольно равномерно распределен по основной матрице (рисунок 17).

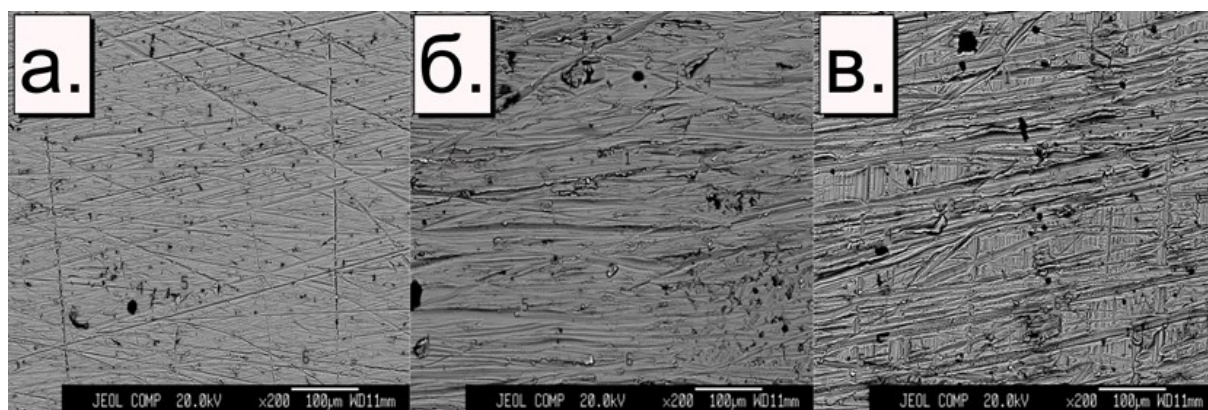


Рисунок 17 - Изображения РСМА фронтального среза образцов титана в обратно рассеянных электронах. Увеличение 200х. Общий вид распределения неорганических фаз по поверхности в образцах: (а) механически обработанный Ti; (б) Ti в стационарных условиях; (в) поляризованный Ti ($E_{pol} = 0,75$ В).

Состав серых частиц подобен составу матрицы. Черные ограниченные частицы представлены, по-видимому, оксидными фазами и продуктами взаимодействия с раствором. Химический состав этих включений достаточно сложный и, по данным РСМА, в них входят различные неорганические элементы (рисунок 18).

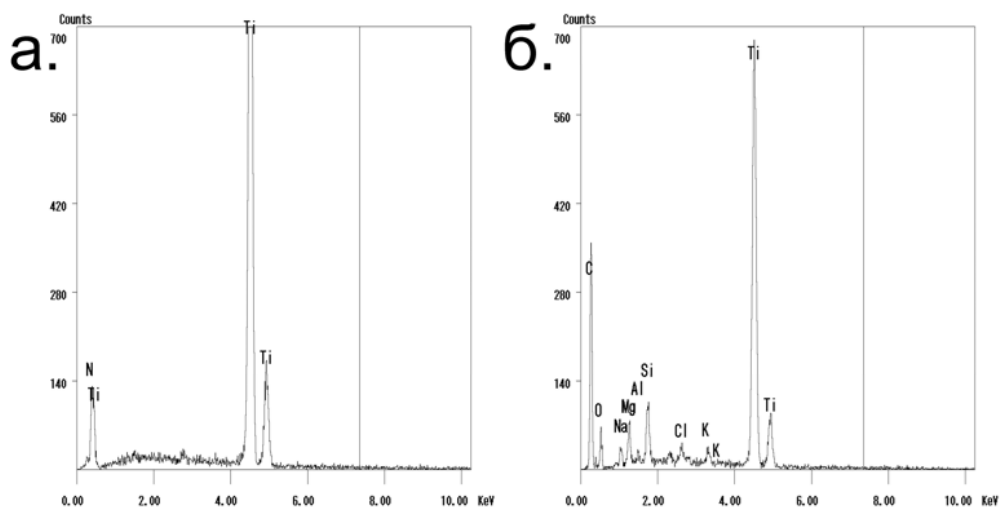


Рисунок 18 - Спектр РСМА титановой матрицы (а) и черной ограниченной частицы-включения (б).

На качественном уровне можно заметить, что шероховатость поверхности титана при анодной поляризации действительно больше чем в случае измерения в стационарных условиях. Этот результат хорошо дополняет выводы импедансометрических экспериментов.

Изображения боковой поверхности образцов титана также свидетельствуют об увеличении толщины оксидной пленки (рисунок 19).

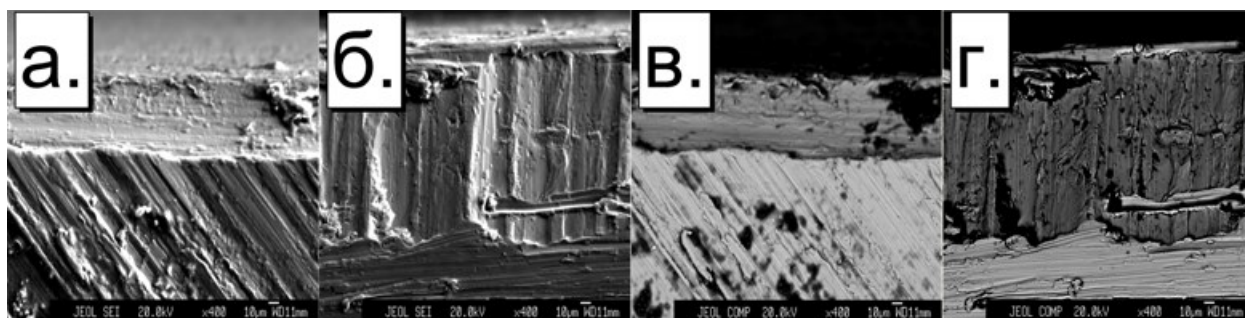


Рисунок 19 - Изображение поперечного среза титановой пластины во вторичных (а, б) и обратно рассеянных электронах (в, г), полученные методом рентгеноспектрального электронно-зондового микроанализа, где (а) и (в) – Ti в стационарных условиях; (б) и (г) – анодно поляризованный Ti ($E_{pol} = 0,75$ В). Увеличение 400х.

3.4.5 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия анодно поляризованных образцов титана

Увеличение концентрации структурного оксида и гидроксида при использовании анодной поляризации показано на рисунке 20.

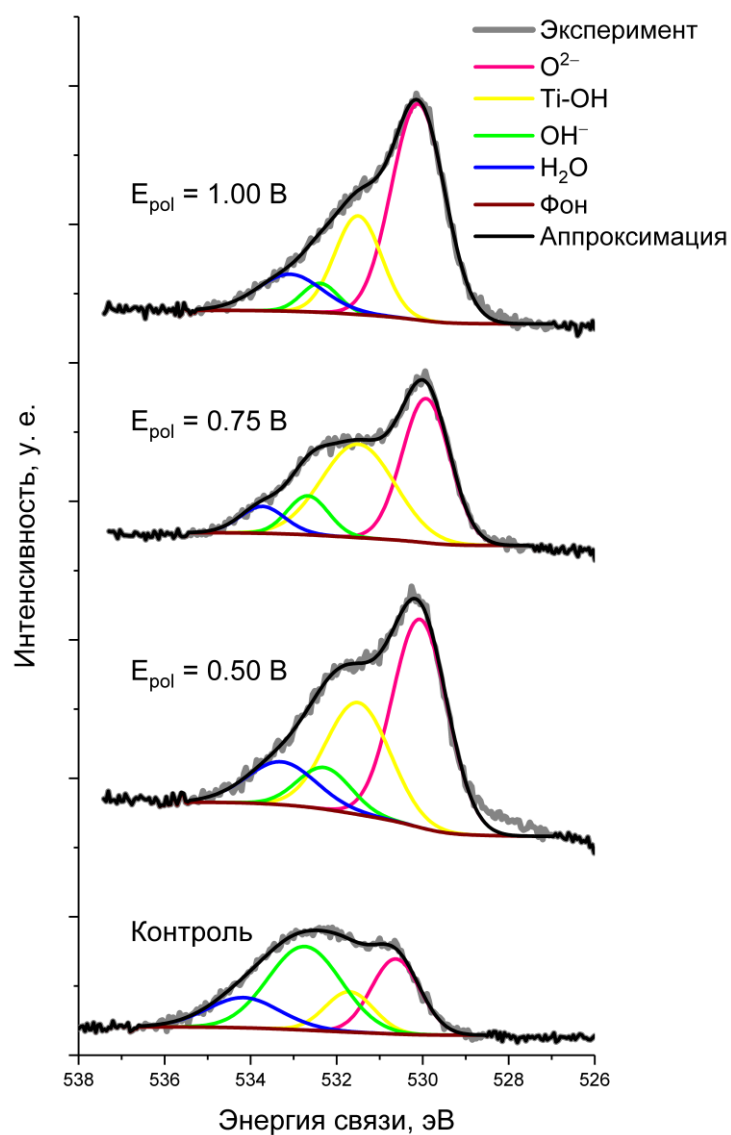


Рисунок 20 - РФЭС спектры O 1s, полученные для контрольного образца и анодно поляризованного Ti в отсутствие травления аргоном.

Увеличение потенциала поляризации приводит к изменению соотношения поверхностных оксидов титана, что особенно хорошо заметно при сравнении результатов с контрольным образцом (рисунок 21).

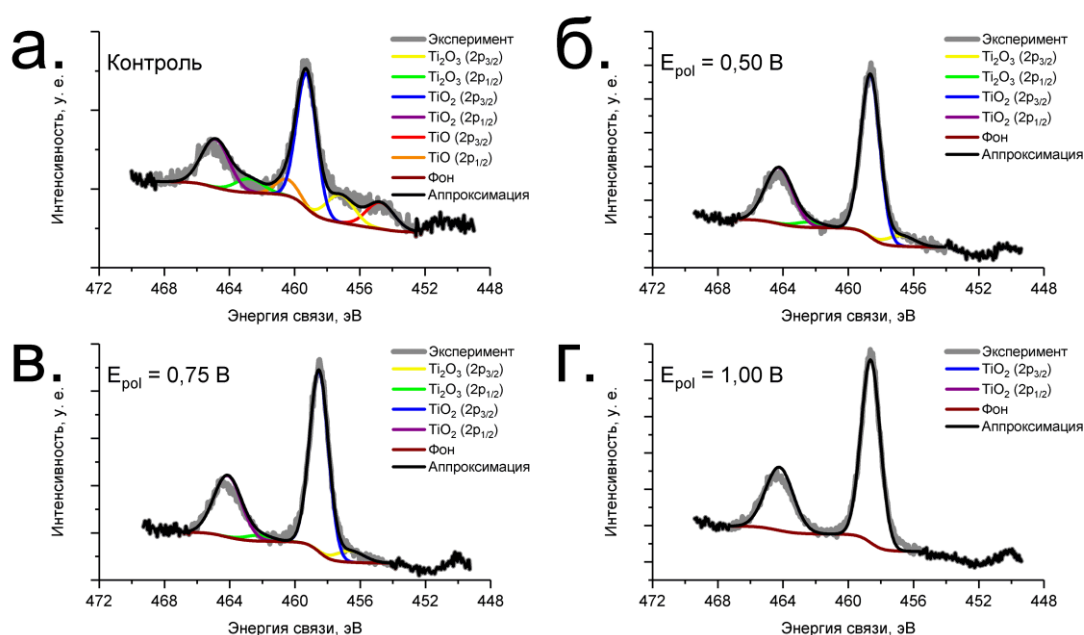


Рисунок 21 - РФЭС спектры Ti 2p, полученные для контрольного образца (а) и анодно поляризованного Ti (б-г) в отсутствие травления аргонном.

Также было рассмотрено влияние величины E_{pol} на распределение форм кислорода и титана в приповерхностных слоях оксидной пленки (рисунок 22).

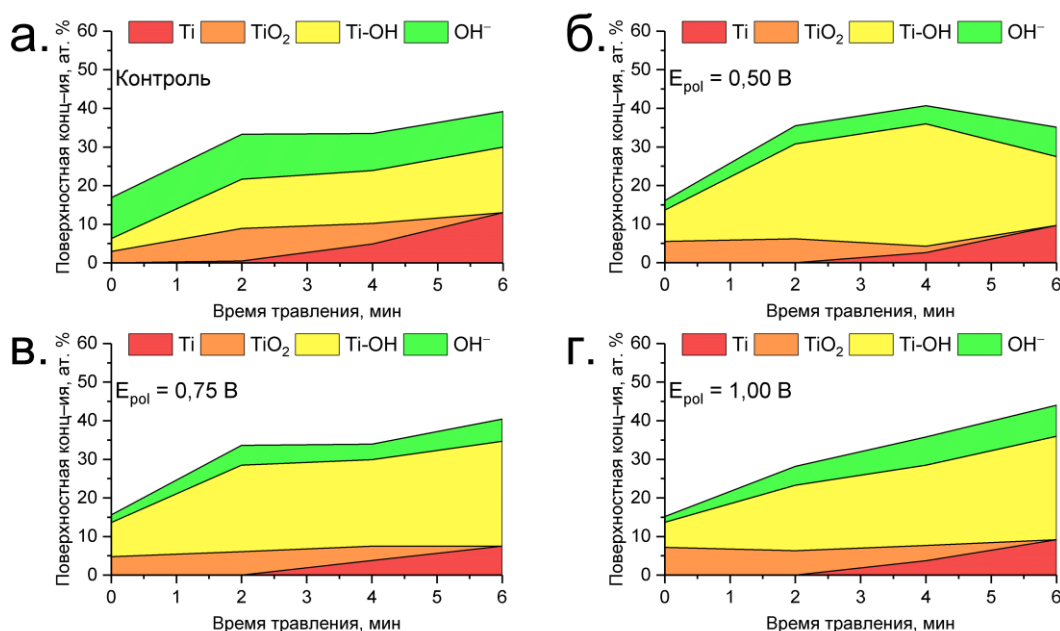


Рисунок 22 - Диаграммы распределения поверхностных и приповерхностных концентраций титана Ti, диоксида титана TiO_2 , мостиковых гидроксильных групп (Ti-OH), и терминальных гидроксильных групп (OH^-) при различном времени травления аргонном.

Данные РФЭС свидетельствуют об изменении соотношения между концентрациями структурных оксидных групп (O^{2-}) и терминальных гидроксильных групп (OH^-) для анодированных образцов титана по сравнению с неполяризованным контролем. В работе [225] было показано, что уменьшение соотношения площади пиков OH^-/O^{2-} приводило к снижению значений краевого угла смачивания и увеличению гидрофильности оксидной поверхности. Схожая тенденция наблюдается и в данном исследовании: величина $S(OH^-)/S(O^{2-})$ 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. Авторы исследования [226], также с помощью РФЭС и АСМ продемонстрировали, что гидрофильность оксидной пленки титана определяется в большей степени ее химическим составом, а не шероховатостью поверхности. Таким образом, использование потенциалов поляризации E_{pol} в диапазоне от 0,50 до 1,00 В может способствовать увеличению гидрофильности поверхности оксидной пленки титана, а, следовательно, и ее биосовместимости.

3.4.6 Определение шероховатости анодно поляризованных образцов титана

Для описания и детализации поверхностных структур, характеризующих морфологию, рельеф и топографию поверхности, использовалась среднеквадратичная шероховатость поверхности R_a , которую определяли по уравнению 29:

$$R_a = \left(\frac{1}{N}\right) \sum_{i,j=1}^N |z(i,j) - z_{mean}|, \quad (29)$$

где $z(i, j)$ – значение высоты рельефа в точке с координатами (i, j) , измеренное с помощью АСМ, N - количество точек в строке сканирования, z_{mean} – среднее значение высоты рельефа на изображении.

Фотографии оксидных пленок титана, полученных с помощью анодного окисления при различных потенциалах поляризации, приведены на рисунке 23.

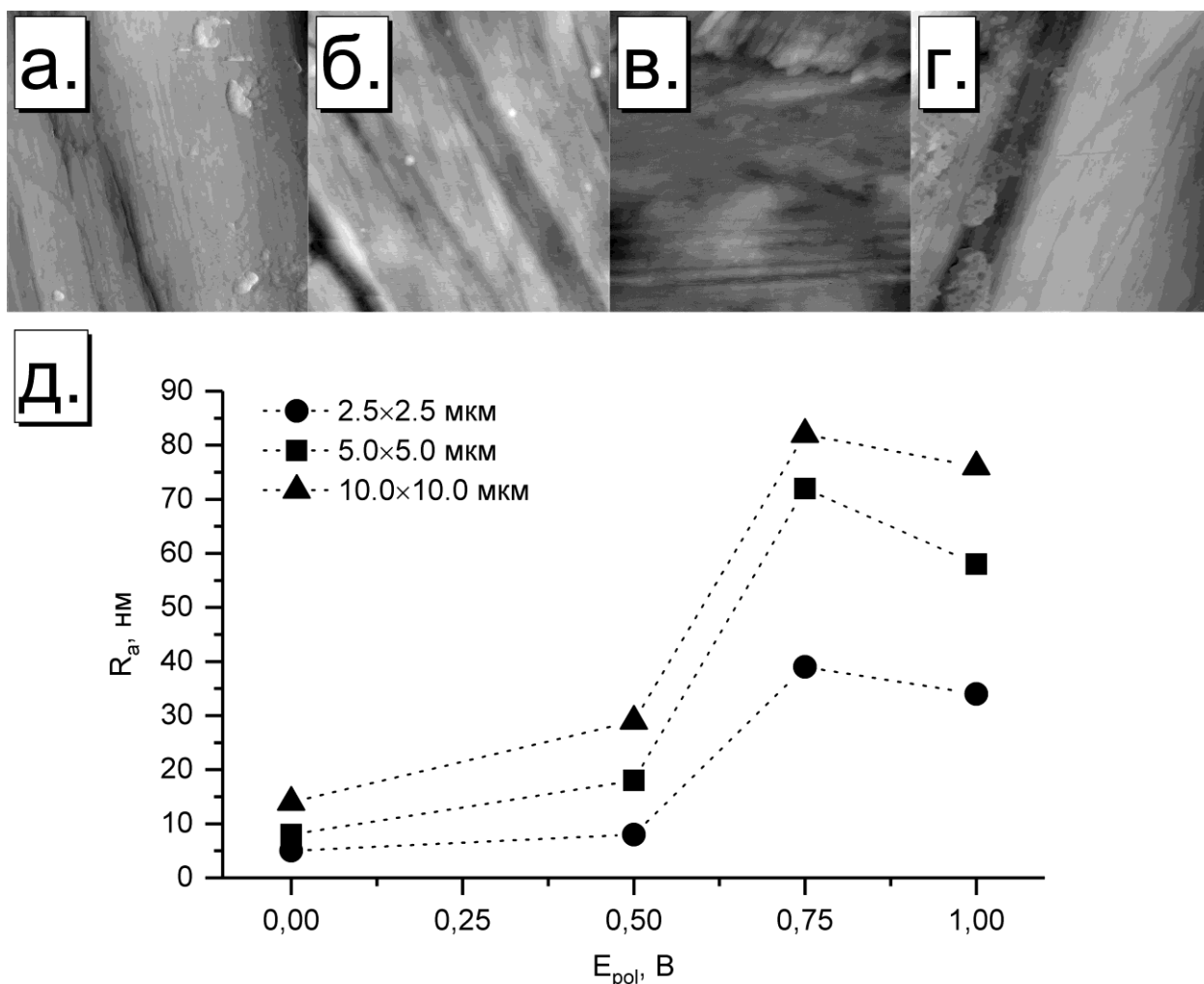


Рисунок 23 - (а) АСМ изображения неполяризованного образца титана и анодно поляризованного Тi при потенциалах 0.50 В (б), 0.75 В (в) и 1.00 В (г). Размер области сканирования 5×5 мкм. (д) Зависимость среднеквадратичной шероховатости R_a от значения потенциала анодной поляризации при использовании различных областей сканирования.

Из рисунка 23д видно, что параметр R_a сложным образом зависит от E_{pol} и размера области сканирования S . В области низких и средних значений E_{pol} (до 750 мВ) наблюдается монотонный, но ускоренный рост R_a с увеличением E_{pol} . Это может свидетельствовать о заметной роли E_{pol} при формировании оксидной пленки на титане: процесс окисления титана стимулируется ростом параметра E_{pol} , однако только до определенного

значения в 750 мВ. Дальнейшее увеличение потенциала E_{pol} не приводит к росту шероховатости, даже наоборот, наблюдается незначительное уменьшение R_a , что хорошо согласуется с эллипсометрическими данными в [14].

3.4.7. Влияние морфологических свойств образцов титана на адгезивные свойства и пролиферативную активность фибробластов.

Анализ изображений, полученных с Nikon BioStation СТ показывает, что адгезия фибробластов и активация пролиферативной активности в зоне взаимодействия клеток с поверхностью металла в большей степени обнаруживается на образцах титана, поляризованного при низких анодных потенциалах (рисунок 24).

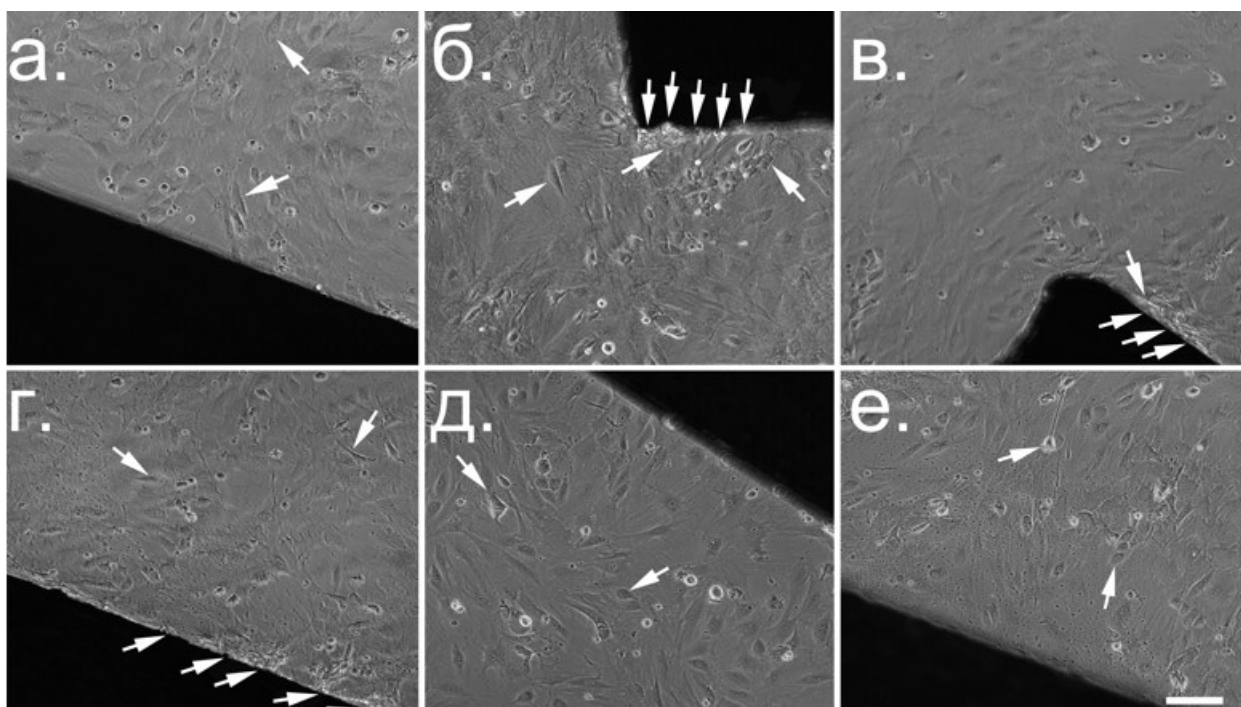


Рисунок 24 - Фибробласты (показаны стрелками) на образцах неполяризованного (а) и анодно поляризованного титана при потенциалах 0,00 В (б); 0,25 В (в); 0,50 В (г); 0,75 В (д) и 1,00 В (е) на третий день эксперимента. Увеличение количества фибробластов на образцах титана, поляризованных при низких анодных 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.

Контрольные образцы неполяризованного титана характеризуются сохранностью адгезированных на культуральном пластике фибробластов. Однако адгезии клеток на металлических пластинах и/или повышения их пролиферативной активности при этом не выявлено, так же, как и токсического воздействия контрольного образца на культуру клеток (рисунок 24а). При анализе воздействия образцов титановых пластин, поляризованных при $E_{pol} = 0.00 \text{ В}; 0.25 \text{ В}; 0.50 \text{ В}$ выявлена активная адгезия фибробластов (рисунки 24б-24г, соответственно). Однако, при исследовании образца, поляризованного при 0.50 В , в области непосредственного контакта с клетками отмечено увеличение числа открепившихся фибробластов. Отсутствие адгезии клеток наблюдается также при тестировании образца, поляризованного при $E_{pol} = 0.75 \text{ В}$ (рисунок 24д), тем не менее в данном случае отмечается снижение плотности культуры вблизи титановой пластины, что свидетельствует о слабой токсической реакции. В образце с титановой пластиной, поляризованной при 1.00 В , контакта поверхности титановой пластины с культурой клеток не отмечено. В то же время наблюдались морфологические изменения фибробластов, а также снижение плотности клеточного монослоя вблизи испытуемого образца (рисунок 24е).

Таким образом, в процессе эксперимента выявлено, что титановые пластины, поляризованные при $0.00 \text{ В}; 0.25 \text{ В}; 0.50 \text{ В}$ 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.

Количественная оценка адгезивных свойств осуществлялась путем сравнения параметров шероховатости (площадь проекции A , полная площадь поверхности с учетом шероховатости $S_{об}$, объем V) снимков оптической

микроскопии в двух зонах: в объеме питательной среды для фибробластов и, непосредственно, у поверхности титановой пластины (рисунок 25).

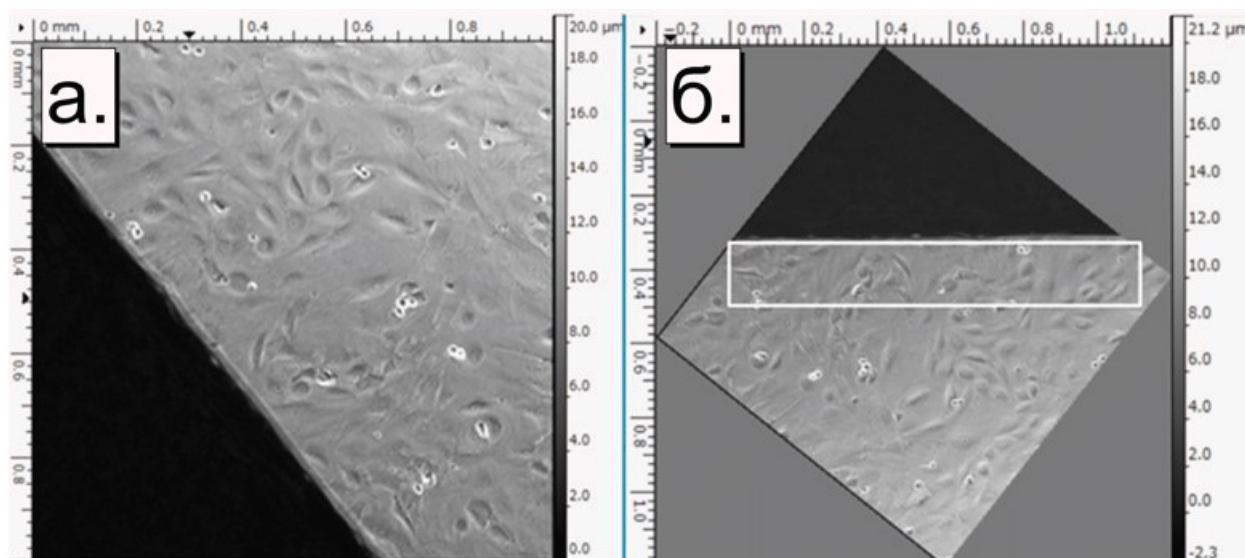


Рисунок 25 - Пример обработки изображения, полученного с помощью оптической микроскопии на BioStation CT, для определения адгезии фибробластов к титановой поверхности, где (а): исходное изображение с BioStation CT: тёмная область – часть титановой пластины, серая область – фибробласты в исследуемой среде; (б): область, ограниченная белой рамкой, использованная для расчета параметров адгезии клеток. Потенциал поляризации E_{pol} равен 0,75 В.

Для исследуемого и стандартного образцов были рассчитаны следующие 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:

$$K^{ad} = K_i/K_{st}, \quad (30)$$

$$K_i = V_i/A_i, \quad (31)$$

$$K_{st} = V_{st}/A_{st}, \quad (32)$$

где V_i и V_{st} представляют собой объемы шероховатой поверхности для исследуемого и стандартного образцов соответственно, а A_i и A_{st} – соответствующие им площади проекции образцов в исследуемой области.

В связи с невозможностью получения значений V_i и A_i из данных оптической микроскопии, ввиду невозможности прямого определения положения по z , были сделаны некоторые допущения. Во-первых, было предположено, что V_i и A_i совпадают с аналогичными величинами для эталона (питательной среды с фибробластами) V_{st} и A_{st} . При этом R_a эталона принималась равной 1 мкм. Это означает, что величина по оси z для исследуемого образца изменялась до тех пор, пока параметры V_i и A_i вдали от титана не стали равны параметрам V_{st} и A_{st} для эталона. Ширина области вблизи поверхности титана была выбрана равной примерно 100 мкм. Такой подход к оценке адгезии позволяет получить объективные количественные данные о взаимодействии клеток с поверхностью титанового материала (таблица 14), что критически важно для оценки перспектив клинического применения модифицированного титанового материала.

Таблица 14. Значения параметров шероховатости и степени адгезии K^{ad} фибробластов с поверхностью неполяризованного и анодно поляризованного титана ($n = 4$).

	$A_i, \text{мм}^2$	$S_{об}, \text{мм}^2$	$1000V_i, \text{мм}^3$	$1000V_i/A_i, \text{мм}$	$S_{об}/A_i$	K^{ad}
Эталон	1,00	1,04	5,77	5,77	1,04	1,00
Контроль *	$0,18 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,04$	$1,47 \pm 0,26$	$8,43 \pm 0,82$	$1,21 \pm 0,14$	$1,46 \pm 0,14$
0,00 В	$0,20 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,03$	$1,76 \pm 0,22$	$8,76 \pm 0,86$	$1,08 \pm 0,01$	$1,52 \pm 0,15$
0,25 В	$0,22 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,04$	$2,50 \pm 0,51$	$11,65 \pm 0,85$	$1,10 \pm 0,03$	$2,02 \pm 0,15$
0,50 В	$0,17 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03$	$1,58 \pm 0,31$	$9,13 \pm 0,72$	$1,21 \pm 0,04$	$1,58 \pm 0,13$
0,75 В	$0,21 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,02$	$1,87 \pm 0,19$	$8,97 \pm 0,21$	$1,14 \pm 0,04$	$1,56 \pm 0,04$
1,00 В	$0,20 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$	$1,85 \pm 0,24$	$9,26 \pm 1,33$	$1,12 \pm 0,03$	$1,61 \pm 0,23$

Анализ данных таблицы 14 показывает, что независимо от величины потенциала поляризации титана, степень адгезии K^{ad} фибробластов к его поверхности составляет примерно 1,6. Наиболее активное взаимодействие фибробластов с титановой поверхностью наблюдается при значениях $K^{ad} > 2$. Образцами с такими характеристиками являются титановые пластинки, подвергнутые электрохимической поляризации при $E_{pol} = 0,25$ В.

Морфология анодно поляризованных образцов титана с адгезированными фибробластами была также проанализирована с помощью сканирующей электронной микроскопии. Результаты представлены на рисунке 26.

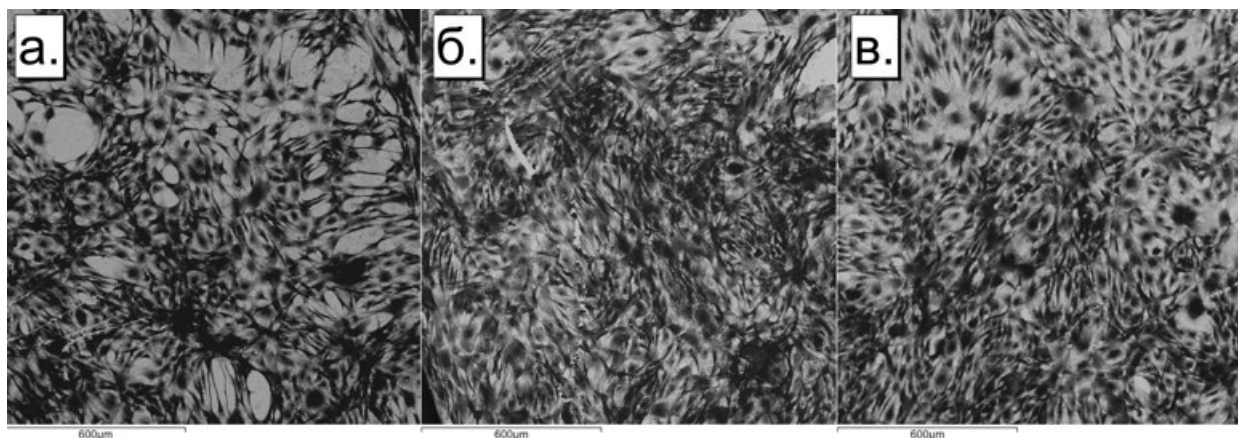


Рисунок 26 - Изображения СЭМ (в режиме обратно рассеянных электронов) фибробластов на образцах титана, поляризованного при потенциалах 0,00 В (а), 0,25 В (б) и 1,00 В (в).

После этого было проанализировано распределение фибробластов для оценки размеров их ядер и отростков. На рисунке 27 представлены полученные размерные характеристики, которые находятся в диапазоне от 3 до 5 мкм для ядер фибробластов и от 20 до 30 мкм для отростков.

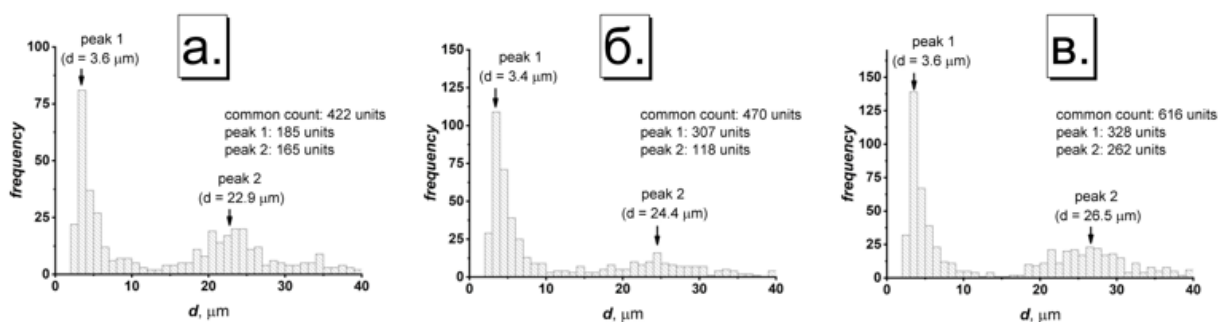


Рисунок 27 - Гистограммы распределения по размерам ядер (пик 1) и отростков (пик 2) фибробластов на поверхности электрохимически поляризованных образцов титана при потенциалах поляризации 0,00 В (а), 0,25 В (б) и 1,00 В (в).

Анализ гистограмм показывает, что значительное увеличение числа ядер фибробластов происходит на начальном этапе анодной поляризации титана при напряжении 0,25 В. Их количество возрастает с 185 при $E_{\text{pol}} = 0,00$ В до 307 при $E_{\text{pol}} = 0,25$ В. Дальнейшее увеличение поляризационного напряжения до 1,00 В приводит лишь к незначительному увеличению числа ядер фибробластов до 328. Данные о размерах клеток также согласуются с результатами других исследователей, изучавших различные виды фибробластов [227–229].

Проведенный элементный анализ показал, что темные участки на СЭМ изображениях соответствуют фибробластам, а светлые – поверхности титановых образцов (рисунок 28). Результаты ЭДС анализа по выбранным точкам на рисунке 28а представлен в Приложении (таблица 1П).

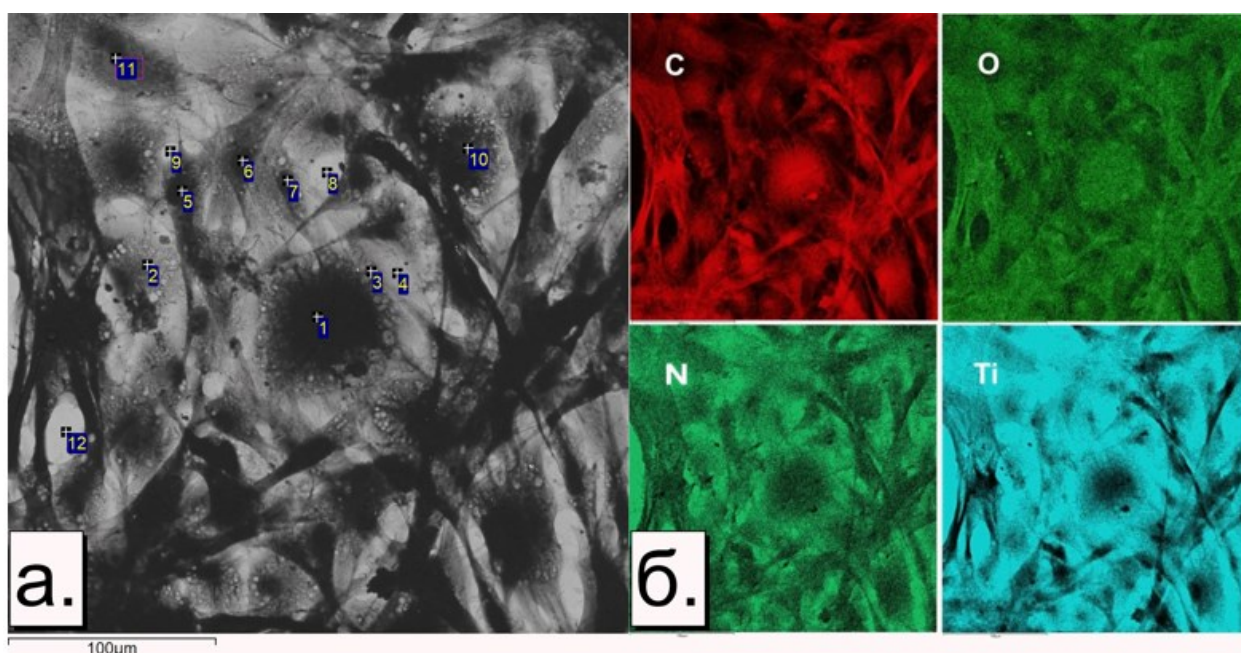


Рисунок 28 - СЭМ-изображение фибробластов на поляризованном образце титана ($E_{pol} = 0,00$ В) с отмеченными точками для ЭДС анализа (а) и элементного картирования этого образца (б).

Несмотря на определенную корреляцию между адгезией фибробластов к поверхности оксидной пленки и гидрофильностью последней (рисунок 29а), гораздо большее влияние на величину K^{ad} оказывает R_a (рисунок 29б). Образцы 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 [230], после чего их биосовместимость может быть снова проверена на модельных клетках.

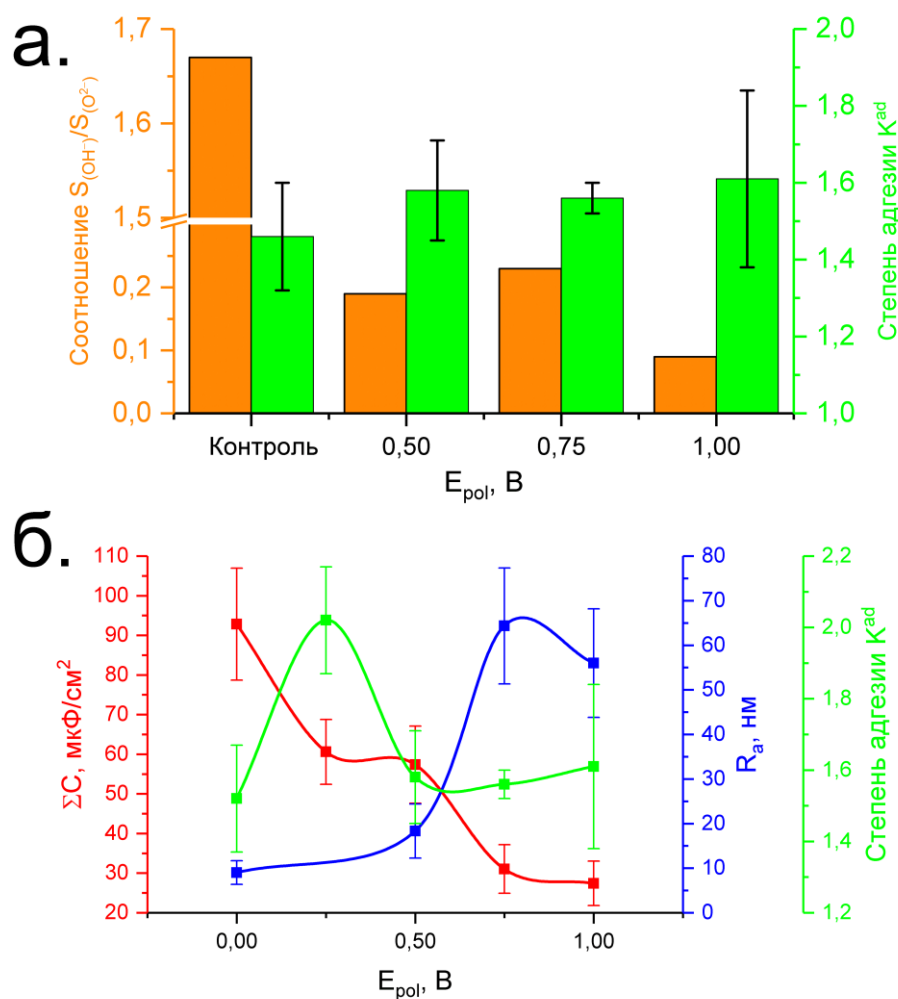


Рисунок 29 - (а) Влияние E_{pol} на соотношение пиков РФЭС O 1s, пропорциональное гидрофильности оксидной поверхности (без травления Ar^+), и величину K^{ad} . (б) Зависимость суммарной емкости оксидной пленки титана ΣC ($n = 3$), степени адгезии K^{ad} ($n = 4$) и среднеквадратичной шероховатости поверхности R_a (различные области сканирования, $n = 3$) от потенциала поляризации титановых образцов.

3.6 Заключение к главе 3

В этой главе были представлены результаты электрохимических и спектроскопических экспериментов с платиной и титаном, показавшие способность данных металлов к взаимодействию как с низкомолекулярными адсорбатами, так и различными клетками.

В случае платины было показано влияние катодной и анодной поляризации на емкость и толщину ДЭС при электрохимической адсорбции моделей активного центра остеокальцина. Этилмалоновая кислота

адсорбировалась на поверхности платины со значениями степени заполнения, схожими с глутаминовой и аспарагиновой кислотой.

Адгезия клеток *M. luteus* 1-I на платиновом электроде протекала гораздо лучше по сравнению с такими электродными материалами, как стеклоуглерод и угольная паста. Анодная поляризация, в свою очередь, негативно влияла на этот процесс. Результаты электрохимических экспериментов были подтверждены фотографиями СЭМ.

Анодная поляризация также была использована для получения оксидных пленок титана с различной морфологией и химическим составом. В исследуемых условиях было продемонстрировано, что данный процесс способствовал возможному увеличению гидрофильности поверхности анодированных образцов. Повышение потенциала поляризации приводило к росту толщины оксидной пленки и ее шероховатости. Биосовместимость полученных образцов в большей степени определялась шероховатостью поверхности, а не изменением соотношения оксидных/гидроксидных форм кислорода, определяющего гидрофильность поверхностного слоя оксидной пленки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено комплексное электрохимическое и спектроскопическое исследование поведения платины и титана в средах, содержащих модельные низкомолекулярные адсорбаты или клетки (микро)организмов. Адсорбция выбранных аминокислот и ЕМА на Pt была количественно охарактеризована в широком диапазоне потенциалов поляризации (от $-0,25$ до $0,50$ В) с помощью ЦВА и СЭИ. Разработанная методика была успешно апробирована для описания адгезии клеток *M. luteus* 1-I на поверхности платинового электрода, а факт прикрепления клеток был подтвержден с помощью СЭМ. Диапазон потенциалов поляризации $0,00$ - $1,00$ В был использован для электрохимической модификации титановых образцов с получением оксидных пленок различной морфологии. Это значительно влияло на адгезию клеток фибробластов крысы, причем основным фактором, влияющим на данный процесс, являлась среднеквадратичная шероховатость поверхности оксидной пленки титана.

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 $\Theta = 0,25$ (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*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marin E., Lanzutti A. Biomedical applications of titanium alloys: a comprehensive review // *Materials*. 2023. Vol. 17, № 1. P. 114.
2. Sinitsyna O. et al. Platinum in biomedical applications // *Biomedical applications of metals* / ed. Rai M., Ingle A.P., Medici S. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 151–165.
3. Basova T.V. et al. The use of noble metal coatings and nanoparticles for the modification of medical implant materials // *Materials & Design*. 2021. Vol. 204. P. 109672.
4. И.В. Усольцев и др. Оценка электрохимических характеристик биметаллического имплантата в биологических средах как метод исследования костной регенерации // *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. 2011. Т. 3, № 79. С. 165–168.
5. Е.А. Тюхай и др. Электрохимические характеристики биметаллического имплантата для остеосинтеза // *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. 2012. Т. 4, № 86. С. 198–200.
6. Szczęsny G., Kopec M., Kowalewski Z.L. Toxicity, irritation, and allergy of metal implants: historical perspective and modern solutions // *Coatings*. 2025. Vol. 15, № 3. P. 361.
7. Lee N.K. et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton // *Cell*. 2007. Vol. 130, № 3. P. 456–469.
8. Wang W. et al. Various antibacterial strategies utilizing titanium dioxide nanotubes prepared via electrochemical anodization biofabrication method // *Biomimetics*. 2024. Vol. 9, № 7. P. 408.
9. Mehta K. et al. Effect of specific electrochemical settings and anion types on titanium oxide layer properties after anodization in near-neutral electrolytes for dental applications // *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. Туманова Е.А., Сафронов А.Ю., Капустин А.В. Основные закономерности механизма электрохимического взаимодействия серосодержащих аминокислот с поверхностью платинового электрода при анодной поляризации // Электрохимия. 2001. Т. 37, № 9. С. 1127–1130. [Tumanova E.A., Safronov A.Yu., Kapustin A.V. Mechanism of electrochemical interaction between sulfur-containing amino acids and anodically polarized platinum electrode // Russian Journal of Electrochemistry. 2001. Vol. 37, № 9. P. 972–975.]
12. Туманова Е.А., Сафронов А.Ю. Адсорбция некоторых аминокислот и дипептидов на платиновом электроде // Электрохимия. 1998. Т. 34, № 2. С. 170–176. [Tumanova E.A., Safronov A.Yu. Adsorption of some amino acids and dipeptides at the platinum electrode // Russian Journal of Electrochemistry. 1998. Vol. 34, № 2. P. 153–159.]
13. Korniyushova E.A. et al. Electrochemical behavior of titanium and platinum in dicarboxylic amino acids solution // Bioelectrochemistry. 2019. Vol. 126. P. 113–120.
14. Akimov V.V. et al. Characteristics of morphology, structure and composition of titanium surface under its modification by electrochemical polarization in phosphate-alkaline solutions // Surface & Interface Analysis. 2015. Vol. 47, № 12. P. 1081–1097.
15. Патент № 2523553С2 Российская Федерация, заявл. 19.04.2012 : опубл. 20.07.2014 / Пушкарев Б.Г. и др.
16. Amsheev D.Yu. et al. Research of the adhesion of the strain *Micrococcus luteus* I-I on various electrode materials by electrochemical impedance spectroscopy // AIP Conference Proceedings. 2023. Vol. 2777. P. 020020.

17. Amsheev D.Y. et al. Osteocalcin active center models: Electrochemical adsorption on platinum and quantum chemical analysis // *Electrochimica Acta*. 2023. Vol. 437. P. 141466.
18. Amsheev D.Yu. et al. Morphology and biological characteristics of the electrochemically modified titanium surface // *Bioelectrochemistry*. 2026. Vol. 168. P. 109156.
19. Grahame D.C. The electrical double layer and the theory of electrocapillarity // *Chemical Reviews*. 1947. Vol. 41, № 3. P. 441–501.
20. Bagotsky V.S. *Fundamentals of electrochemistry*. 1st ed. Wiley, 2005.
21. Pajkossy T., Kolb D.M. Double layer capacitance of the platinum group metals in the double layer region // *Electrochemistry Communications*. 2007. Vol. 9, № 5. P. 1171–1174.
22. Faulkner L.L., Bard A.J. *Electrochemical methods and applications*. 2nd ed. New Yor: Wiley, 2001.
23. Lockett V. et al. Differential capacitance of the double layer at the electrode/ionic liquids interface // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2010. Vol. 12, № 39. P. 12499.
24. Wu J. Understanding the electric double-layer structure, capacitance, and charging dynamics // *Chemical Reviews*. 2022. Vol. 122, № 12. P. 10821–10859.
25. Morales D.M., Risch M. Seven steps to reliable cyclic voltammetry measurements for the determination of double layer capacitance // *JPhys Energy*. 2021. Vol. 3, № 3. P. 034013.
26. Fröhlich N.L., Eggebeen J.J.J., Koper M.T.M. Measurement of the double-layer capacitance of Pt(111) in acidic conditions near the potential of zero charge // *Electrochimica Acta*. 2024. Vol. 494. P. 144456.
27. Schalenbach M. et al. A dynamic transmission line model to describe the potential dependence of double-layer capacitances in cyclic voltammetry // *Journal of Physical Chemistry C*. 2021. Vol. 125, № 49. P. 27465–27471.

28. Schalenbach M. et al. Double layer capacitances analysed with impedance spectroscopy and cyclic voltammetry: validity and limits of the constant phase element parameterization // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2021. Vol. 23, № 37. P. 21097–21105.
29. Lazanas A.Ch., Prodromidis M.I. Electrochemical impedance spectroscopy—a tutorial // *ACS Measurement Science Au*. 2023. Vol. 3, № 3. P. 162–193.
30. Harrington D.A., Van Den Driessche P. Mechanism and equivalent circuits in electrochemical impedance spectroscopy // *Electrochimica Acta*. 2011. Vol. 56, № 23. P. 8005–8013.
31. Khademi M., Barz D.P.J. Structure of the electrical double layer revisited: electrode capacitance in aqueous solutions // *Langmuir*. 2020. Vol. 36, № 16. P. 4250–4260.
32. Schouten K.J.P., Van Der Niet M.J.T.C., Koper M.T.M. Impedance spectroscopy of H and OH adsorption on stepped single-crystal platinum electrodes in alkaline and acidic media // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2010. Vol. 12, № 46. P. 15217.
33. Pajkossy T., Kolb D.M. Double layer capacitance of Pt(111) single crystal electrodes // *Electrochimica Acta*. 2001. Vol. 46, № 20–21. P. 3063–3071.
34. Kerner Z., Pajkossy T. Impedance of rough capacitive electrodes: the role of surface disorder // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1998. Vol. 448, № 1. P. 139–142.
35. Pajkossy T., Wandlowski T., Kolb D.M. Impedance aspects of anion adsorption on gold single crystal electrodes // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1996. Vol. 414, № 2. P. 209–220.
36. Hirschorn B. et al. Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters // *Electrochimica Acta*. 2010. Vol. 55, № 21. P. 6218–6227.

37. Huang V.M.-W. et al. The apparent constant-phase-element behavior of a disk electrode with faradaic reactions // *Journal of the Electrochemical Society*. 2007. Vol. 154, № 2. P. C99–C107.
38. Lasia A. The origin of the constant phase element // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2022. Vol. 13, № 2. P. 580–589.
39. Orazem M.E., Tribollet B. *Electrochemical impedance spectroscopy*. 1st ed. Wiley, 2008.
40. Chang B.-Y. Conversion of a constant phase element to an equivalent capacitor // *The Journal of Electrochemical Science and Technology*. 2020. Vol. 11, № 3. P. 318–321.
41. Huang J. Zooming into the inner Helmholtz plane of Pt(111)–aqueous solution interfaces: chemisorbed water and partially charged ions // *JACS Au*. 2023. Vol. 3, № 2. P. 550–564.
42. Fröhlich N.L., Koper M.T.M. Progress and pitfalls in measuring the double-layer capacitance of platinum electrodes // *Current Opinion in Electrochemistry*. 2025. Vol. 53. P. 101727.
43. Ojha K. et al. Double layer at the Pt(111)–aqueous electrolyte interface: potential of zero charge and anomalous Gouy–Chapman screening // *Angewandte Chemie International Edition*. 2020. Vol. 59, № 2. P. 711–715.
44. Climent V., Feliu J.M. *Surface electrochemistry with Pt single-crystal electrodes* // *Advances in electrochemical sciences and engineering*. 1st ed. / ed. Alkire R.C., Bartlett P.N., Lipkowski J. Wiley, 2017. Vol. 17. P. 1–57.
45. Schalenbach M. et al. The role of the double layer for the pseudocapacitance of the hydrogen adsorption on platinum // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 3375.
46. Zhang Z., Huang J. Microstructure of electrical double layers at highly charged states // *JACS Au*. 2025. Vol. 5, № 7. P. 3453–3467.
47. Kornyshev A.A. Double-layer in ionic liquids: paradigm change? // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007. Vol. 111, № 20. P. 5545–5557.

48. Budkov Y.A., Kolesnikov A.L. Electric double layer theory for room temperature ionic liquids on charged electrodes: Milestones and prospects // *Current Opinion in Electrochemistry*. 2022. Vol. 33. P. 100931.
49. Xue S. et al. How the nature of the alkali metal cations influences the double-layer capacitance of Cu, Au, and Pt single-crystal electrodes // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2020. Vol. 124, № 23. P. 12442–12447.
50. Ojha K., Doblhoff-Dier K., Koper M.T.M. Double-layer structure of the Pt(111)–aqueous electrolyte interface // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. Vol. 119, № 3. P. e2116016119.
51. Fröhlich N.L. et al. A comprehensive model for the electric double layer of stepped platinum electrodes // *Nature Chemistry*. 2026.
52. Zhang L., Huang J. Measurement and interpretation of the double layer capacitance of Pt(111)/aqueous solution interfaces // *Current Opinion in Electrochemistry*. 2023. Vol. 42. P. 101419.
53. Garlyyev B. et al. Influence of the nature of the alkali metal cations on the electrical double-layer capacitance of model Pt(111) and Au(111) electrodes // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2018. Vol. 9, № 8. P. 1927–1930.
54. Feliu J.M., Herrero E. Pt single crystal surfaces in electrochemistry and electrocatalysis // *EES Catalysis*. 2024. Vol. 2, № 2. P. 399–410.
55. Xue S. et al. Impact of Pt(*hkl*) electrode surface structure on the electrical double layer capacitance // *Journal of the American Chemical Society*. 2024. Vol. 146, № 6. P. 3883–3889.
56. Fröhlich N.L. et al. Correlating surface structure and electrochemical properties of polycrystalline platinum electrodes // *Electrochimica Acta*. 2026. Vol. 548. P. 147977.
57. Watzele S.A. et al. Temperature dependences of the double layer capacitance of some solid/liquid and solid/solid electrified interfaces. An experimental study // *Electrochimica Acta*. 2021. Vol. 391. P. 138969.

58. Song K. et al. Influence of the electrolyte pH on the double layer capacitance of polycrystalline Pt and Au electrodes in acidic solutions // *ChemElectroChem*. 2025. Vol. 12, № 4. P. e202400587.
59. Sarraf M. et al. A state-of-the-art review of the fabrication and characteristics of titanium and its alloys for biomedical applications // *Bio-Design and Manufacturing*. 2022. Vol. 5, № 2. P. 371–395.
60. Jäger M. et al. Antimicrobial and osseointegration properties of nanostructured titanium orthopaedic implants // *Materials*. 2017. Vol. 10, № 11. P. 1302.
61. Winiarski J. et al. Titanium anodizing in a choline dihydrogen citrate salt–oxalic acid deep eutectic solvent: a step towards green chemistry in surface finishing of titanium and its alloys // *RSC Advances*. 2021. Vol. 11, № 34. P. 21104–21115.
62. Brocklebank M. et al. Mechanism of titanium electrochemical oxidation via isotopic labeling, high resolution ion depth profiling, and impedance spectroscopy // *Electrochimica Acta*. 2022. Vol. 435. P. 141342.
63. Cui X. et al. Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation // *Dental Materials*. 2009. Vol. 25, № 1. P. 80–86.
64. Raut S.K. et al. Chloride ions in health and disease // *Bioscience Reports*. 2024. Vol. 44, № 5. P. BSR20240029.
65. Chen A., Kurmis A.P. Understanding immune-mediated titanium allergy to in situ orthopaedic implants: a narrative review of the current literature // *ANZ Journal of Surgery*. 2024. Vol. 94, № 11. P. 1925–1934.
66. Kandaswamy E., Harsha M., Joshi V.M. Titanium corrosion products from dental implants and their effect on cells and cytokine release: A review // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2024. Vol. 84. P. 127464.
67. Zhang X.L. et al. Effects of scan rate on the potentiodynamic polarization curve obtained to determine the Tafel slopes and corrosion current density // *Corrosion Science*. 2009. Vol. 51, № 3. P. 581–587.

68. Butler J.A.V. Studies in heterogeneous equilibria. Part III. A kinetic theory of reversible oxidation potentials at inert electrodes // Transactions of the Faraday Society. 1924. Vol. 19. P. 734–739.
69. Liamas E. et al. Effect of the electrochemical characteristics of titanium on the adsorption kinetics of albumin // RSC Advances. 2019. Vol. 9, № 59. P. 34265–34273.
70. Contu F. The cathodic behavior of titanium: Serum effect // The Journal of Biomedical Materials Research. 2012. Vol. 100B, № 2. P. 544–552.
71. Gudić S. et al. Electrochemical behaviour of Ti and Ti-6Al-4V alloy in phosphate buffered saline solution // Materials. 2021. Vol. 14, № 24. P. 7495.
72. Heljo P.S. et al. Anodic oxidation of ultra-thin Ti layers on ITO substrates and their application in organic electronic memory elements // Electrochimica Acta. 2014. Vol. 137. P. 91–98.
73. Seo D.-I., Lee J.-B. Localized corrosion and repassivation behaviors of additively manufactured titanium alloys in simulated biomedical solutions // npj Material Degradation. 2023. Vol. 7, № 1. P. 44.
74. Li H. et al. The electrochemical corrosion behavior of Ti-5Al-5Mo-5V-1Cr-1Fe titanium alloy with different initial microstructures // Materials Today Communications. 2024. Vol. 39. P. 108975.
75. Cheng J. et al. Corrosion behavior of As-Cast Ti-10Mo-6Zr-4Sn-3Nb and Ti-6Al-4V in Hank's solution: a comparison investigation // Metals. 2020. Vol. 11, № 1. P. 11.
76. Dai N. et al. Distinction in corrosion resistance of selective laser melted Ti-6Al-4V alloy on different planes // Corrosion Science. 2016. Vol. 111. P. 703–710.
77. Zhong X. et al. Corrosion electrochemical behaviors of titanium in HCl-acidizing fluid used in natural gas exploitation // International Journal of Electrochemical Science. 2017. Vol. 12, № 4. P. 2875–2892.

78. Pan J., Thierry D., Leygraf C. Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on titanium for implant application // *Electrochimica Acta*. 1996. Vol. 41, № 7–8. P. 1143–1153.
79. Jáquez-Muñoz J.M. et al. Corrosion of titanium alloys anodized using electrochemical techniques // *Metals*. 2023. Vol. 13, № 3. P. 476.
80. Zhang L. et al. The effect of potential on surface characteristic and corrosion resistance of anodic oxide film formed on commercial pure titanium at the potentiodynamic-aging mode // *Materials*. 2019. Vol. 12, № 3. P. 370.
81. Jáquez-Muñoz J.M. et al. Corrosion of anodized titanium alloys // *Coatings*. 2024. Vol. 14, № 7. P. 809.
82. Han X. et al. Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical orthopaedics applications: a review // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023. Vol. 227. P. 113339.
83. Alipal J. et al. Evolution of anodised titanium for implant applications // *Heliyon*. 2021. Vol. 7, № 7. P. e07408.
84. Diamanti M. V., Del Curto B., Peddeferri M. Anodic oxidation of titanium: from technical aspects to biomedical applications // *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2011. Vol. 9, № 1. P. 55–69.
85. Ishizawa H., Ogino M. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P // *The Journal of Biomedical Materials Research*. 1995. Vol. 29, № 1. P. 65–72.
86. Connor P.A., McQuillan A.J. Phosphate adsorption onto TiO₂ from aqueous solutions: an *in situ* internal reflection infrared spectroscopic study // *Langmuir*. 1999. Vol. 15, № 8. P. 2916–2921.
87. Zwilling V., Aucouturier M., Darque-Ceretti E. Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach // *Electrochimica Acta*. 1999. Vol. 45, № 6. P. 921–929.
88. Civantos A. et al. Titanium coatings and surface modifications: toward clinically useful bioactive implants // *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2017. Vol. 3, № 7. P. 1245–1261.

89. Parcharoen Y. et al. Hydroxyapatite electrodeposition on anodized titanium nanotubes for orthopedic applications // *Applied Surface Science*. 2014. Vol. 311. P. 54–61.
90. Ayon A.A. et al. Drug loading of nanoporous TiO₂ films // *Biomedical Materials*. 2006. Vol. 1, № 4. P. L11–L15.
91. Ellerbrock D., Macdonald D.D. Passivity of titanium, part 1: film growth model diagnostics // *The Journal of Solid State Electrochemistry*. 2014. Vol. 18, № 5. P. 1485–1493.
92. Choi Y., Jeong C. Correlation of oxide film thickness with interference coloration and corrosion resistance in anodized titanium // *Electrochimica Acta*. 2026. Vol. 545. P. 147737.
93. Liu X., Chu P., Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications // *Materials Science and Engineering: Reports*. 2004. Vol. 47, № 3–4. P. 49–121.
94. Teng F.-Y. et al. The structures, electrochemical and cell performance of titania films formed on titanium by micro-arc oxidation // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2014. Vol. 45, № 4. P. 1331–1337.
95. Gemelli E., Camargo N.H.A. Low voltage anodization of titanium in nitric acid solution: A new method to bioactivate titanium // *Materials Characterization*. 2011. Vol. 62, № 10. P. 938–942.
96. Wang Q. et al. Influences of formation potential on oxide film of TC4 in 0.5 M sulfuric acid // *Applied Surface Science*. 2021. Vol. 544. P. 148888.
97. Yang Z. et al. Evolution and corrosion resistance of passive film with polarization potential on Ti-5Al-5Mo-5V-1Fe-1Cr alloy in simulated marine environments // *Corrosion Science*. 2023. Vol. 221. P. 111334.
98. Wen S. et al. Study on growth kinetics of passivation film of Ti-6Al-3Nb-2Zr-1Mo alloy Based on point defect model // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2024. Vol. 973. P. 118660.

99. Hsu H.-C. et al. Fabrication of nanotube arrays on commercially pure titanium and their apatite-forming ability in a simulated body fluid // *Materials Characterization*. 2015. Vol. 100. P. 170–177.
100. Michalska-Domańska M., Nyga P., Czerwiński M. Ethanol-based electrolyte for nanotubular anodic TiO₂ formation // *Corrosion Science*. 2018. Vol. 134. P. 99–102.
101. Su Z., Zhou W. Formation, morphology control and applications of anodic TiO₂ nanotube arrays // *Journal of Materials Chemistry*. 2011. Vol. 21, № 25. P. 8955–8970.
102. Zhang L. et al. The effect of potential on surface characteristic and corrosion resistance of anodic oxide film formed on commercial pure titanium at the potentiodynamic-aging mode // *Materials*. 2019. Vol. 12, № 3. P. 370.
103. Xing J.-H. et al. Growth and crystallization of titanium oxide films at different anodization modes // *Journal of the Electrochemical Society*. 2013. Vol. 160, № 6. P. C239–C246.
104. Horányi G., Rizmayer E.M. Study of the adsorption of γ -amino-butyric acid on platinized platinum electrodes by tracer methods // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1977. Vol. 80, № 2. P. 401–403.
105. Horányi G., Rizmayer E.M. Study of the adsorption of glycine on platinized platinum electrodes by tracer methods // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1975. Vol. 64, № 1. P. 15–19.
106. Horányi G. Recent developments in the application of the radiotracer method to the investigation of adsorption and electrocatalytic phenomena // *Electrochimica Acta*. 1980. Vol. 25, № 1. P. 43–57.
107. Horányi G., Rizmayer E.M. Reinvestigation of the potential dependence of the adsorption of acetic acid on platinum electrodes by a radiotracer method // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1987. Vol. 227, № 1–2. P. 223–228.

108. Horányi G. Radiotracer study of the potential dependence of the adsorption of L-methionine at a platinized platinum electrode // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1990. Vol. 280, № 2. P. 425–427.
109. Horányi G. A direct and indirect radiotracer study of the adsorption of serine at a platinized platinum electrode // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1991. Vol. 304, № 1–2. P. 211–217.
110. Huerta F. et al. Electrochemical behaviour of amino acids on Pt(h,k,l): a voltammetric and in situ FTIR study. Part I. Glycine on Pt(111) // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1997. Vol. 421, № 1–2. P. 179–185.
111. Huerta F. et al. Electrochemical behaviour of amino acids on Pt(hkl). A voltammetric and in situ FTIR study: Part III. Glycine on Pt(100) and Pt(110) // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1998. Vol. 445, № 1–2. P. 155–164.
112. Xiao X.-Y. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopic studies of dissociative adsorption of amino acids on platinum and gold electrodes in alkaline solutions // *Langmuir*. 2002. Vol. 18, № 16. P. 6274–6279.
113. Lamy-Pitara E., Tainon Y., Barbier J. Modification of the catalytic properties of platinum by the adsorption of mercaptans // *Applied Catalysis*. 1991. Vol. 68, № 1. P. 179–189.
114. Lang P. et al. Self-assembled alkylthiols monolayers onto platinum; Influence of the adsorbed oxygen // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1998. Vol. 441, № 1–2. P. 83–93.
115. Dourado A.H.B. et al. Investigation of the electrochemical behavior of l-cysteine in acidic media // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2016. Vol. 765. P. 87–91.
116. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine // *Bioelectrochemistry*. 2011. Vol. 81, № 1. P. 46–52.

117. Herzog G., Arrigan D.W.M. Electrochemical strategies for the label-free detection of amino acids, peptides and proteins // *Analyst*. 2007. Vol. 132, № 7. P. 615–632.
118. Dourado A.H.B. et al. Cysteine electrooxidation in alkaline and acidic media: a combined spectroelectrochemical and computational study // *RSC Advances*. 2017. Vol. 7, № 13. P. 7492–7501.
119. Dourado A.H.B., Arenz M., Córdoba de Torresi S.I. Mechanism of electrochemical L-cysteine oxidation on Pt // *ChemElectroChem*. 2019. Vol. 6, № 4. P. 1009–1013.
120. Hibbert D.B. et al. Mass changes and dissolution of platinum during electrical stimulation in artificial perilymph solution // *Biomaterials*. 2000. Vol. 21, № 21. P. 2177–2182.
121. MacDonald S.M., Roscoe S.G. Electrochemical oxidation reactions of tyrosine, tryptophan and related dipeptides // *Electrochimica Acta*. 1997. Vol. 42, № 8. P. 1189–1200.
122. Ogura K. et al. In-situ FTIR studies on the electrochemical oxidation of histidine and tyrosine // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1999. Vol. 463, № 2. P. 218–223.
123. Herlem G. et al. Electrocatalyzed synthesis of polypeptides on platinum surface in concentrated glycine electrolytes and ab initio calculations coupled to spectroscopic analysis // *Electrochimica Acta*. 2009. Vol. 54, № 27. P. 6797–6802.
124. Herlem G. et al. One-pot electrosynthesis of polyglycine-like thin film on platinum electrodes as transducer for solid state pH measurements // *Talanta*. 2010. Vol. 82, № 1. P. 417–421.
125. Alhedabi T. et al. Experimental and theoretical studies on electropolymerization of polar amino acids on platinum electrode // *Materials Chemistry and Physics*. 2017. Vol. 185. P. 183–194.
126. Alhedabi T. et al. Electrosynthesis of poly(alanine)-like peptides in concentrated alanine based electrolytes, characterization coupled to DFT study and

application to pH proton receptor // The Journal of Physical Chemistry C. 2014. Vol. 118, № 43. P. 25041–25050.

127. Введенский А. В. и др. Кинетика анодного окисления анионов моно- и дикарбоновых аминокислот на Pt // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. 2013. № 2. С. 19–26.

128. Köhler C. et al. Poisoning of highly porous platinum electrodes by amino acids and tissue fluid constituents // ChemElectroChem. 2015. Vol. 2, № 11. P. 1785–1793.

129. Köhler C. et al. Performance loss of a Pt-based implantable glucose fuel cell in simulated tissue and cerebrospinal fluids // ChemElectroChem. 2014. Vol. 1, № 11. P. 1895–1900.

130. Кулешова Н.Е., Введенский А.В., Бобринская Е.В. Анодное окисление аниона серина на гладкой и платинированной платине // Электрохимия. 2018. Т. 54, № 7. С. 679–685. [Kuleshova N.E., Vvedenskii A.V., Bobrinskaya E.V. Anodic oxidation of serine anion on smooth and platinized platinum // Russian Journal of Electrochemistry. 2018. Vol. 54, № 7. P. 592–597.]

131. Кулешова Н.Е., Введенский А.В., Бобринская Е.В. Адсорбция аниона серина на гладкой и платинированной платине // Электрохимия. 2018. Т. 54, № 11. С. 928–935. [Kuleshova N. E., Vvedenskii A. V., Bobrinskaya E. V. Adsorption of serine anion on smooth and platinized platinum // Russian Journal of Electrochemistry. 2018. Vol. 54, № 11. P. 949–955.]

132. Brown J., Grimaud A. Proton-donating and chemistry-dependent buffering capability of amino acids for the hydrogen evolution reaction // Physical Chemistry Chemical Physics. 2023. Vol. 25, № 11. P. 8005–8012.

133. Xuan W., Ma J. Pinpointing acidic residues in proteins // ChemMedChem. 2024. Vol. 19, № 5. P. e202300623.

134. Holeček M. Aspartic acid in health and disease // Nutrients. 2023. Vol. 15, № 18. P. 4023.

135. Cowley A., Woodward B. A Healthy Future: Platinum in medical applications: platinum group metals enhance the quality of life of the global population // *Platinum Metals Review*. 2011. Vol. 55, № 2. P. 98–107.
136. Woodward B.K. Platinum group metals (PGMs) for permanent implantable electronic devices // *Precious metals for biomedical applications* / ed. Baltzer N., Copponnex T. Elsevier, Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2014. P. 130–147.
137. Harris A.R. et al. Comparison of the *in vitro* and *in vivo* electrochemical performance of bionic electrodes // *Micromachines*. 2022. Vol. 13, № 1. P. 103.
138. Harris A.R. et al. Impact of protein fouling on the charge injection capacity, impedance, and effective electrode area of platinum electrodes for bionic devices // *ChemElectroChem*. 2021. Vol. 8, № 6. P. 1078–1090.
139. Spiers K. et al. An X-ray fluorescence microscopic analysis of the tissue surrounding the multi-channel cochlear implant electrode array // *Cochlear Implants International*. 2016. Vol. 17, № 13. P. 1–4.
140. Bandzerewicz A., Gadomska-Gajadhur A. Into the tissues: extracellular matrix and its artificial substitutes: cell signalling mechanisms // *Cells*. 2022. Vol. 11, № 5. P. 914.
141. Pennisi C.P. et al. Nanoscale topography reduces fibroblast growth, focal adhesion size and migration-related gene expression on platinum surfaces // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011. Vol. 85, № 2. P. 189–197.
142. Jang L.-W. et al. Investigation of structural, optical, electrical, and biological properties of a porous platinum electrode for neurostimulation devices // *ACS Applied Bio Materials*. 2025. Vol. 8, № 4. P. 3111–3118.
143. Soon C.F. et al. Characterization of platinum electrodes and *in-situ* cell confluency measurement based on current changes of cell-electrodes // *Sensors and Transducers*. 2015. Vol. 187, № 4. P. 113–119.

144. Blume G. et al. Electrical Stimulation of NIH-3T3 Cells with Platinum-PEDOT-Electrodes Integrated in a Bioreactor // The Open Biomedical Engineering Journal. 2013. Vol. 7, № 1. P. 125–132.
145. Turner N. et al. An *in vitro* model to evaluate cell adhesion to metals used in implantation shows significant differences between palladium and gold or platinum // Cell Biology International. 2004. Vol. 28, № 7. P. 541–547.
146. Geninatti T. et al. Impedance characterization, degradation, and *in vitro* biocompatibility for platinum electrodes on BioMEMS // Biomedical Microdevices. 2015. Vol. 17, № 1. P. 24.
147. Wissel K. et al. Platinum corrosion products from electrode contacts of human cochlear implants induce cell death in cell culture models // PLoS ONE / ed. Deli M. A. 2018. Vol. 13, № 5. P. e0196649.
148. Hulander M. et al. Blood interactions with noble metals: coagulation and immune complement activation // ACS Applied Materials & Interfaces. 2009. Vol. 1, № 5. P. 1053–1062.
149. Lam D.V. et al. Platelets and hemostatic proteins are co-localized with chronic neuroinflammation surrounding implanted intracortical microelectrodes // Acta Biomaterialia. 2023. Vol. 166. P. 278–290.
150. Lee H. Y., Barber C., Minerick A.R. Platinum electrode modification: Unique surface carbonization approach to improve performance and sensitivity // Electrophoresis. 2015. Vol. 36, № 15. P. 1666–1673.
151. Цивадзе А.Ю. и др. Электрохимические взаимодействия при контакте эритроцитов с платиной // Электрохимия. 2018. Т. 54, №12. С. 1070–1075. [Tsivadze A.Yu. et al. Electrochemical interactions upon contact of erythrocytes with platinum // Russian Journal of Electrochemistry. 2018. Vol. 54, № 12. P. 1126–1131.]
152. Tsivadze A. Yu. et al. Electron transport and morphological changes in the electrode/erythrocyte system // Mendelev Communications. 2017. Vol. 27, № 2. P. 183–185.

153. Цивадзе А.Ю. и др. Электрохимическая оценка жизнеспособности тромбоцитов // Доклады Академии наук. 2016. Т. 471, № 1. С. 58–61. [Tsivadze A. Yu. et al. Electrochemical evaluation of the viability of platelets // Doklady Physical Chemistry. 2016. Vol. 471, № 1. P. 178–180.]
154. Ayaz Ahmed K.B., Raman T., Anbazhagan V. Platinum nanoparticles inhibit bacteria proliferation and rescue zebrafish from bacterial infection // RSC Adv. 2016. Vol. 6, № 50. P. 44415–44424.
155. Yamane K. et al. Bacterial adhesion affinities of various implant abutment materials // Clinical Oral Implants Research. 2013. Vol. 24, № 12. P. 1310–1315.
156. Van Hoogstraten S.W.G. et al. Antimicrobial and biocompatibility assessment of platinum-based metal alloy coatings for total joint arthroplasty // Surface and Coatings Technology. 2025. Vol. 511. P. 132281.
157. Czerwińska-Główka D. et al. Bacterial surface colonization of sputter-coated platinum films // Materials. 2020. Vol. 13, № 12. P. 2674.
158. Kim T. et al. Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy // Water Research. 2011. Vol. 45, № 15. P. 4615–4622.
159. Kang J. et al. Cyclic voltammetry for monitoring bacterial attachment and biofilm formation // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2012. Vol. 18, № 2. P. 800–807.
160. Gião M.S., Montenegro M.I., Vieira M.J. The influence of hydrogen bubble formation on the removal of *Pseudomonas fluorescens* biofilms from platinum electrode surfaces // Process Biochemistry. 2005. Vol. 40, № 5. P. 1815–1821.
161. Karakovskaya K.I. et al. Volatile iridium and platinum MOCVD precursors: chemistry, thermal properties, materials and prospects for their application in medicine // Coatings. 2021. Vol. 11, № 1. P. 78.

162. Dorovskikh S.I. et al. Bimetallic Pt,Ir-containing coatings formed by MOCVD for medical applications // The Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2019. Vol. 30, № 6. P. 69.
163. Dorovskikh S. et al. Heterostructures based on noble metal films with Ag and Au nanoparticles: fabrication, study of *in vivo* biocompatibility and antibacterial activity // Coatings. 2023. Vol. 13, № 7. P. 1269.
164. Migita S., Sato M. Protein adsorption and cell adhesion on metallic biomaterial surfaces // Adhesives. 2025. Vol. 1, № 4. P. 15.
165. Hanawa T. Biocompatibility of titanium from the viewpoint of its surface // Science and Technology of Advanced Materials. 2022. Vol. 23, № 1. P. 457–472.
166. Barberi J. et al. Albumin and fibronectin adsorption on treated titanium surfaces for osseointegration: an advanced investigation // Applied Surface Science. 2022. Vol. 599. P. 154023.
167. Cao H. et al. The antimicrobial effect of calcium-doped titanium is activated by fibrinogen adsorption // Materials Horizons. 2022. Vol. 9, № 7. P. 1962–1968.
168. Hamraoui A. Cell adhesion and surface interactions: A comprehensive review of surface energy, wettability, and topography effects // AIP Advances. 2025. Vol. 15, № 9. P. 090702.
169. Lima J.H.C.D. et al. Fibroblasts and osteoblasts behavior after contact with different titanium surfaces used as implant abutment: An *in vitro* experimental study // Heliyon. 2024. Vol. 10, № 3. P. e25038.
170. Mounghong K. et al. The impact of anodization modification on titanium interaction with human osteoblasts and fibroblasts (*in vitro* study) // PLoS One / ed. Rautray T. R. 2025. Vol. 20, № 11. P. e0336639.
171. Huang H.-H. et al. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion // Biomolecular Engineering. 2004. Vol. 21, № 3–5. P. 93–97.

172. Webster T.J., Ejiofor J.U. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo // *Biomaterials*. 2004. Vol. 25, № 19. P. 4731–4739.
173. Pacha-Olivenza M.Á. et al. Relevance of topographic parameters on the adhesion and proliferation of human gingival fibroblasts and oral bacterial strains // *BioMed Research International*. 2019. Vol. 2019. P. 1–13.
174. Stoilov M. et al. Effects of different titanium surface treatments on adhesion, proliferation and differentiation of bone cells: an *in vitro* study // *Journal of Functional Biomaterials*. 2022. Vol. 13, № 3. P. 143.
175. Zeng L. et al. 3D-printed surfaces of titanium implant: the fibroblasts response // *Biomaterials Advances*. 2025. Vol. 166. P. 214006.
176. Shao H. et al. Advances in the superhydrophilicity-modified titanium surfaces with antibacterial and pro-osteogenesis properties: a review // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022. Vol. 10. P. 1000401.
177. Takadama H. et al. An X-ray photoelectron spectroscopy study of the process of apatite formation on bioactive titanium metal // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001. Vol. 55, № 2. P. 185–193.
178. Kokubo T. et al. Bioactive metals: preparation and properties // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004. Vol. 15, № 2. P. 99–107.
179. Akashi Y. et al. Attachment of human epithelial cells to an anodized titanium surface // *Materials*. 2025. Vol. 18, № 14. P. 3305.
180. Durdu S. et al. Surface characterization, wettability and antimicrobial ability of anodic oxide TiO₂ layers on Ti45Nb alloy // *Scientific Reports*. 2025. Vol. 15, № 1. P. 32974.
181. Knapic D. et al. Hindrance of osteoblast cell adhesion on titanium by surface nanostructuring // *Surfaces and Interfaces*. 2024. Vol. 46. P. 103990.
182. Deng Z. et al. Highly ordered nanotube-like microstructure on titanium dental implant surface fabricated via anodization enhanced cell adhesion

and migration of human gingival fibroblasts // International Journal of Nanomedicine. 2024. Vol. Volume 19. P. 2469–2485.

183. Zhai S. et al. Overview of strategies to improve the antibacterial property of dental implants // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2023. Vol. 11. P. 1267128.

184. Li Y. et al. Enhanced antibacterial properties of orthopedic implants by titanium nanotube surface modification: a review of current techniques // International Journal of Nanomedicine. 2019. Vol. Volume 14. P. 7217–7236.

185. Camargo S.E.A. et al. Nanostructured surfaces to promote osteoblast proliferation and minimize bacterial adhesion on titanium // Materials. 2021. Vol. 14, № 16. P. 4357.

186. Zhao X. et al. Dual effects and mechanism of TiO₂ nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion // International Journal of Nanomedicine. 2013. Vol. 8, № 1. P. 3093–3105.

187. Kim H.-S. et al. Biological effects of the novel mulberry surface characterized by micro/nanopores and plasma-based graphene oxide deposition on titanium // International Journal of Nanomedicine. 2021. Vol. Volume 16. P. 7307–7317.

188. Khalid S. et al. Tuning surface topographies on biomaterials to control bacterial infection // Biomaterials Science. 2020. Vol. 8, № 24. P. 6840–6857.

189. Pan C. et al. Preparation of chitosan-Zn²⁺ complex coating on polydopamine-modified TiO₂ nanotubes to enhance osteoblast behaviors // Materials Letters. 2021. Vol. 282. P. 128665.

190. Staats K. et al. Antimicrobial potential and osteoblastic cell growth on electrochemically modified titanium surfaces with nanotubes and selenium or silver incorporation // Scientific Reports. 2022. Vol. 12, № 1. P. 8298.

191. Akshaya S. et al. Antibacterial coatings for titanium implants: recent trends and future perspectives // Antibiotics. 2022. Vol. 11, № 12. P. 1719.

192. Shi H. et al. Hydroxyapatite based materials for bone tissue engineering: a brief and comprehensive introduction // Crystals. 2021. Vol. 11, № 2. P. 149.
193. Bal Z. et al. Bone regeneration with hydroxyapatite-based biomaterials // Emergent Materials. 2020. Vol. 3, № 4. P. 521–544.
194. Ressler A. et al. Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: a review // Open Ceramics. 2021. Vol. 6. P. 100122.
195. Mishchenko O. et al. Advanced strategies for enhancing the biocompatibility and antibacterial properties of implantable structures // Materials. 2025. Vol. 18, № 4. P. 822.
196. Amirhaeri S. et al. ^1H and ^{13}C NMR studies on malonic and ethylmalonic acids and their cobalt(III) complexes // Inorganica Chimica Acta. 1979. Vol. 33. P. 57–61.
197. Lee A.J., Hodges S., Eastell R. Measurement of osteocalcin // Annals of Clinical Biochemistry. 2000. Vol. 37, № 4. P. 432–446.
198. Титан и сплавы титановые деформируемые. Марки ГОСТ 19807-91. – 1992.
199. Shi X. et al. Pathogenetic characterization of a *Micrococcus luteus* strain isolated from an infant // Frontiers in Pediatrics. 2023. Vol. 11. P. 1303040.
200. Arroyo-Herrera I. et al. Arsenic and chromium resistance mechanisms in the *Micrococcus luteus* group // Pedosphere. 2023. Vol. 33, № 4. P. 600–611.
201. Tang T. et al. Adaptive laboratory evolution of *Micrococcus luteus* and identification of genes associated with radioresistance through genome-wide association study // Scientific Reports. 2025. Vol. 15, № 1. P. 5614.
202. Stom D.I. et al. Effect of sodium lauryl sulfate on sorption of cells of the electrogenic bacterium strain *Micrococcus luteus* on carbon cloth // Indian Journal of Microbiology. 2023. Vol. 63, № 1. P. 50–55.
203. Чеснокова А.Н. и др. Электрохимические параметры микробных топливных элементов на основе штамма *Micrococcus luteus*, новых ионообменных мембран и различных сахаров // Электрохимия. 2023. Т. 59,

№9. C. 510–516. [Chesnokova A.N. et al. Electrochemical parameters of microbial fuel cells based on the *Micrococcus luteus* strain, new ion-exchange membranes and various sugars // Russian Journal of Electrochemistry. 2023. Vol. 59, № 9. P. 660–665.]

204. Erdenechimeg D., Maralmaa B., Kashevskii A. Electrochemical investigation of mineral electrodes in phosphate-buffered alkaline solution // Mongolian Journal of Chemistry. 2014. Vol. 15. P. 33–35.

205. Josowicz M., Janata J., Levy M. Electrochemical pretreatment of thin film platinum electrodes // Journal of the Electrochemical Society. 1988. Vol. 135, № 1. P. 112–115.

206. Stan D. et al. What is the optimal method for cleaning screen-printed electrodes? // Processes. 2022. Vol. 10, № 4. P. 723.

207. Shirley D.A. High-resolution X-ray photoemission spectrum of the valence bands of gold // Physical Review B. 1972. Vol. 5, № 12. P. 4709–4714.

208. Bogdanovskaya V.A. et al. Adsorption and anodic oxidation of glycylglycine and some amino acids on a gold electrode // Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. 1986. Vol. 202, № 1–2. P. 147–167.

209. Frumkin A.N., Petrii O.A. Potentials of zero total and zero free charge of platinum group metals // Electrochimica Acta. 1975. Vol. 20, № 5. P. 347–359.

210. Bockris J.O. et al. Trends in electrochemistry // Journal of the Electrochemical Society. 1978. Vol. 125, № 9. P. 400C-402C.

211. Orazem M. E., Tribollet B. Electrochemical impedance spectroscopy. Wiley, 2008.

212. Wang S. et al. Electrical double layer effects on alkaline hydrogen reactions on platinum // Precision Chemistry. 2025. Vol. 3, № 10. P. 604–611.

213. He Z., Mansfeld F. Exploring the use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in microbial fuel cell studies // Energy & Environmental Science. 2009. Vol. 2, № 2. P. 215–219.

214. Bystron T. et al. Glassy carbon electrode activation – a way towards highly active, reproducible and stable electrode surface // *Electrochimica Acta*. 2019. Vol. 299. P. 963–970.
215. Brandes B.A. et al. Unifying the ORR and OER with surface oxygen and extracting their intrinsic activities on platinum // *Nature Communications*. 2024. Vol. 15, № 1. P. 7336.
216. Elghajiji A. et al. Electrochemical impedance spectroscopy as a tool for monitoring cell differentiation from floor plate progenitors to midbrain neurons in real time // *Advanced Biology*. 2021. Vol. 5, № 6. P. 2100330.
217. Kampouraki Z.C. et al. Highly sensitive resistance spectroscopy technique for online monitoring of biofilm growth on metallic surfaces // *Environmental Research*. 2024. Vol. 240. P. 117401.
218. Yu M. et al. Towards rapid formation of electroactive biofilm: insights from thermodynamics and electric field manipulation // *Water Research*. 2024. Vol. 261. P. 121992.
219. Zhang J. et al. Impact of reactive oxygen species on cell activity and structural integrity of Gram-positive and Gram-negative bacteria in electrochemical disinfection system // *Chemical Engineering Journal*. 2023. Vol. 451. P. 138879.
220. Vassilyev Yu.B., Khazova O.A., Nikolaeva N.N. Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1985. Vol. 196, № 1. P. 105–125.
221. Monodane T. et al. Cell surface of *Micrococcus luteus*: chemical treatment of the cells and teichuronic acids on the surface // *Microbiology and Immunology*. 1989. Vol. 33, № 3. P. 165–174.
222. Liao S. et al. Membrane damage mechanism of protocatechualdehyde against *Micrococcus luteus* and its effect on pork quality characteristics // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 18856.

223. Kuphasuk C. et al. Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys // The Journal of Prosthetic Dentistry. 2001. Vol. 85, № 2. P. 195–202.
224. Liu Z.J. et al. Anodic film growth of titanium oxide using the 3-electrode electrochemical technique: effects of oxygen evolution and morphological characterizations // Journal of the Electrochemical Society. 2016. Vol. 163. P. E75.
225. Lee M.-K., Park Y.-C. Super-hydrophilic anatase TiO₂ thin film *in situ* deposited by DC magnetron sputtering // Thin Solid Films. 2017. Vol. 638. P. 9–16.
226. Kuźmicz-Mirosław E. et al. Effect of various surface treatments on wettability and morphological properties of titanium oxide thin films // Materials. 2022. Vol. 15, № 12. P. 4113.
227. Uhal B.D. et al. Cell size, cell cycle, and α -smooth muscle actin expression by primary human lung fibroblasts // American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 1998. Vol. 275, № 5. P. L998–L1005.
228. Markov P. et al. Delayed reorganisation of F-actin cytoskeleton and reversible chromatin condensation in scleral fibroblasts under simulated pathological strain // Biochemistry and Biophysics Reports. 2022. Vol. 32. P. 101338.
229. Vo P.H., Do N.M., Nguyen S.T. Primary evaluation the effects of Boesenbergia pandurata ethanol extract on etoposide-induced senescence in fibroblasts // Biomedical Research and Therapy. 2024. Vol. 11, № 11. P. 6869–6882.
230. Lee K. et al. Surface characteristics of hydroxyapatite films deposited on anodized titanium by an electrochemical method // Thin Solid Films. 2013. Vol. 546. P. 185–188.

ПРИЛОЖЕНИЕ

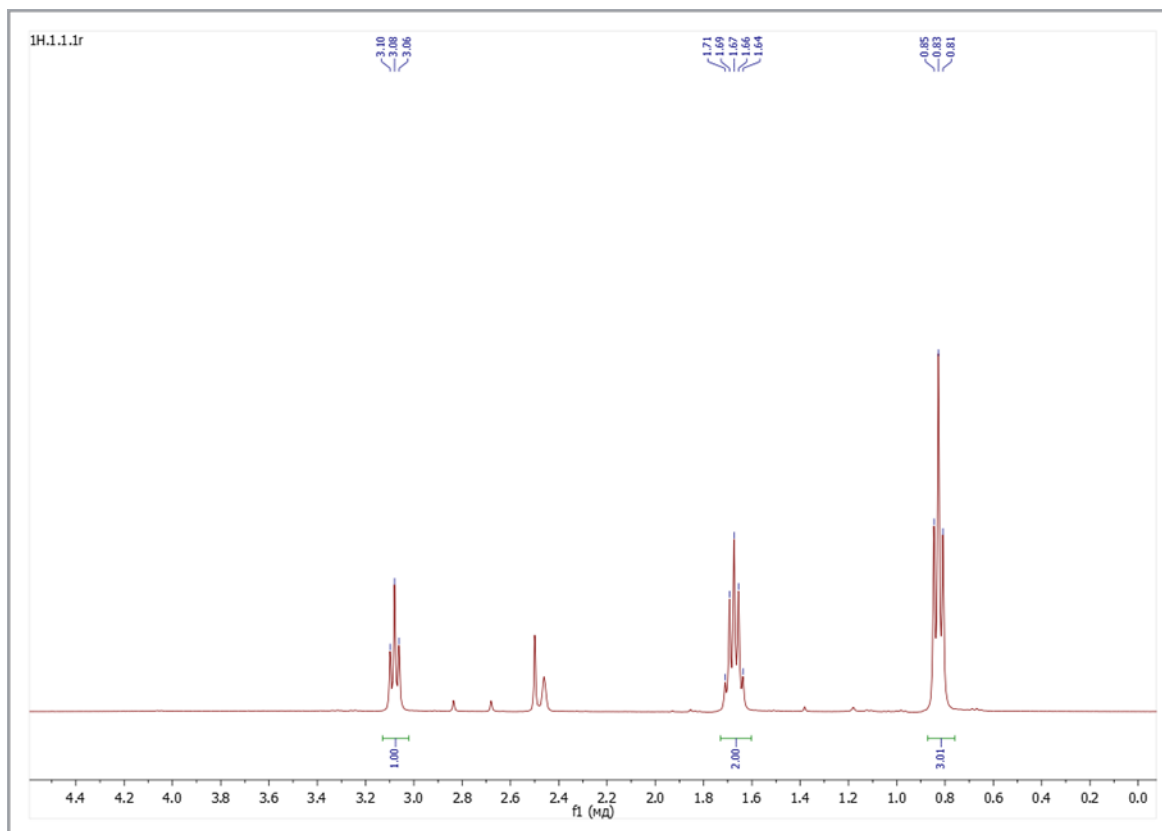


Рисунок 1П – Спектр ^1H ЯМР этилмалоновой кислоты в DMSO-d_6 .

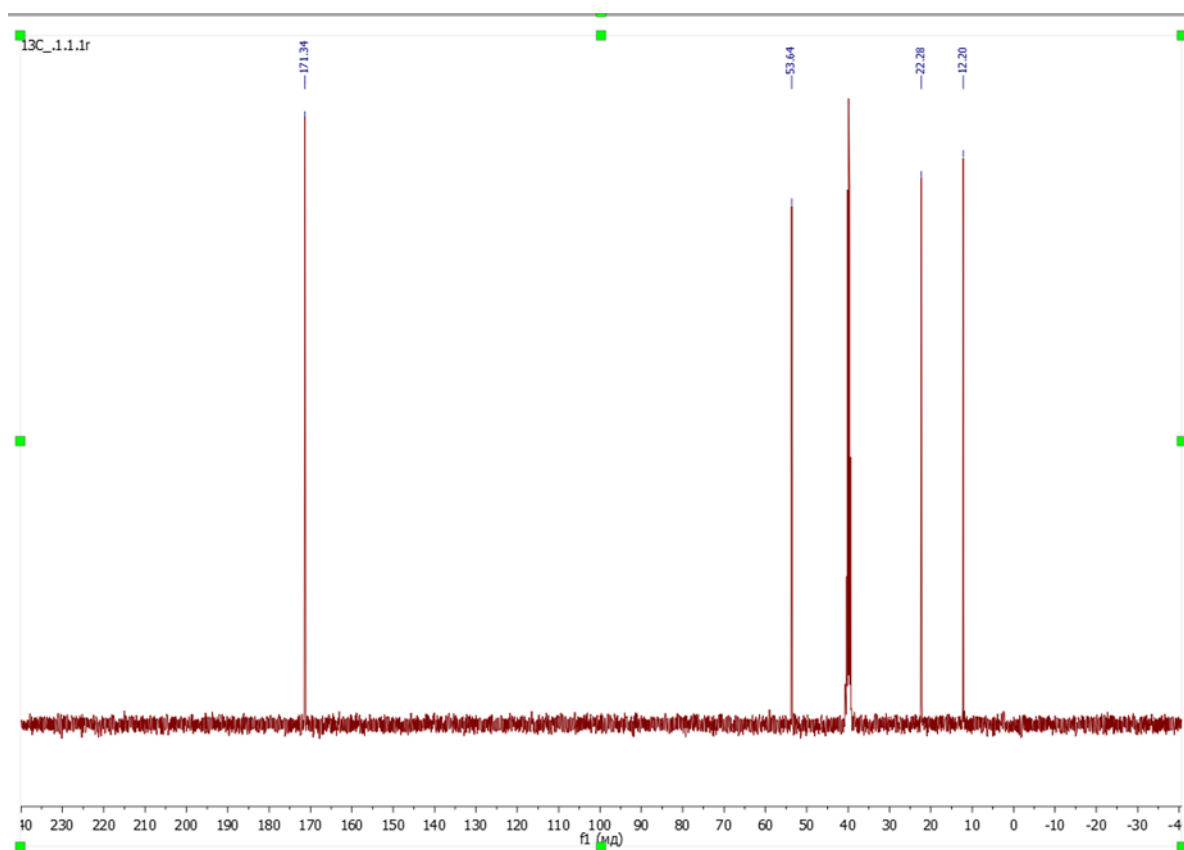


Рисунок 2П – Спектр ^{13}C ЯМР этилмалоновой кислоты в DMSO-d_6 .

Таблица 1П. Элементный состав пронумерованных точек на рисунке 28а.

Точка/Элемент (%)	Ti	Al	Si	C	N	O	S	P	Cl	Na
1	—	—	—	66.16	11.03	19.77	1.14	0.76	0.76	0.38
2	75.00	0.27	—	14.25	0.81	9.41	0.27	—	—	
3	65.33	0.27	0.27	12.27	—	15.73	0.27	0.80	—	0.53
4	99.65	0.35	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	0.46	—	61.64	10.5	22.83	0.91	0.91	0.46	0.46
6	—	—	—	59.78	15.64	15.08	0.56	0.56	0.56	—
7	—	0.63	—	61.39	13.29	22.78	0.63	0.63	0.63	—
8	98.99	0.34	—	—	—	—	—	0.34	—	0.34
9	99.68	0.32	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	0.51	—	60.1	16.67	20.71	1.01	0.51	0.51	—
11	—	0.61	—	56.97	23.64	16.36	0.61	0.61	0.61	0.61
12	99.68	0.32	—	—	—	—	—	—	—	—