

PACS numbers: 61.46.Fg, 61.46.Np, 68.37.Hk, 78.67.Ch, 78.67.Rb, 81.07.De, 82.45.Yz

Анодные покрытия на основе высокоупорядоченных диоксид-титановых нанотрубок в качестве носителя лекарственных веществ

С. А. Уласевич, А. И. Кулак, О. Н. Мусская, С. К. Позняк*,
Е. В. Скорб**

*Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси,
ул. Сурганова, 9/1,
220072 Минск, Беларусь*

**Научно-исследовательский институт физико-химических проблем,
Белорусский государственный университет,
ул. Ленинградская, 14,
220030 Минск, Беларусь*

***Белорусский государственный университет,
ул. Ленинградская, 14,
220030 Минск, Беларусь*

Анодным окислением титана в водно-этиленгликолевом растворе фторида аммония получены структурно упорядоченные TiO_2 -нанотрубки с вертикальным расположением пор, диаметром 50–80 нм, внутренней поверхностью пор 70–80 cm^2 на 1 cm^2 геометрической поверхности. Биологические тесты с использованием остеобластов МСЗТЗ-Е1 показали, что клетки, адсорбированные на поверхности TiO_2 -нанотрубок, сохраняют способность делиться и образовывать межклеточные контакты. Диоксид-титановые покрытия характеризуются высокой гидрофильностью (контактный угол $5,6 \pm 0,3^\circ$), биоактивностью и могут быть перспективными для использования в качестве нанорезервуаров с контролируемым высвобождением антибиотиков (тетрациклина, доксорубина) при лечении костных инфекций.

Highly-ordered TiO_2 nanotubes with vertical pores having a diameter of 50–80 nm and a specific internal pore surface area of about 70–80 cm^2 per 1 cm^2 or geometric-surface area are obtained by anodic oxidation of titanium in an ammonium-fluoride ethylene-glycol solution. Biological tests using МСЗТЗ-Е1 osteoblasts show that cells adsorbed on the surface of TiO_2 nanotubes retain the ability to reproduce and to form cell–cell contacts. Titanium dioxide coatings are characterized by a high hydrophilicity (with a contact angle of $5.6 \pm 0.3^\circ$) and bioactivity. These coatings are promising for fabrication of titanium implants and as nanocontainers of antibiotics (tetracycline, doxorubicin), providing a controllable release during the treatment of bone infections.

Анодным окисненням титану у водно-етиленгліколовому розчині фториду амонію одержано структурно впорядковані TiO_2 -нанорурки з вертикальним розташуванням пор, діаметром у 50–80 нм, внутрішньою поверхнею пор у 70–80 см^2 на 1 см^2 геометричної поверхні. Біологічні тести з використанням остеобластів МС3Т3-Е1 показали, що клітини, адсорбовані на поверхні TiO_2 -нанорурок, зберігають здатність ділитися та створювати міжклітинні контакти. Діоксид-титанові покриття характеризуються високою гідрофільністю (контактний кут — $5,6 \pm 0,3^\circ$), біоактивністю та можуть бути перспективними для використання як нанорезервуари з контрольованим вивільненням антибіотиків (тетрацикліну, доксорубіцину) при лікуванні кісткових інфекцій.

Ключевые слова: анодные покрытия, диоксид титана, нанотрубки, клеточная адгезия, остеобласты, антибиотик, биоактивность, носитель лекарственных веществ.

(Получено 18 ноября 2013 г.; после доработки — 28 ноября 2013 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Анодные покрытия из диоксида титана с вертикальными нанопорами способны оказывать сильное влияние на адгезию живых клеток, их размножение, дифференциацию и интенсифицируют рост биогенного гидроксиапатита [1–3]. Наличие развитой структуры и высокая гидрофильность позволяют использовать такие покрытия в качестве носителя водорастворимых лекарственных веществ для их локального высвобождения в инфицированных участках твёрдой и мягкой ткани [4]. Преимуществом использования покрытий в качестве систем доставки является возможность пролонгированного высвобождения лекарственного вещества, а также возможность использовать довольно высокие концентрации лекарственных веществ без общей интоксикации организма [5–6]. Известно, что диаметр пор оказывает влияние на скорость высвобождения лекарственных средств. Ранее выполнялись эксперименты с TiO_2 -нанотрубками с размером пор 100–120 нм и выявлено, что данный размер не обеспечивает достаточно длительного высвобождения лекарственных средств [7].

В связи с этим целью данной работы было исследование возможности использования полученных нами наноструктурированных TiO_2 -покрытий с меньшим диаметром пор в качестве нанорезервуара для тетрациклина и доксорубицина.

2. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Оптически прозрачные покрытия TiO_2 получали анодным окислением слоя титана, напылённого в вакууме на проводящие ИТО-

стёкла. Толщина слоя напылённого титана составляла приблизительно 700 нм. Анодное окисление титана осуществляли в водно-этиленгликолевом электролите (2 об.% воды), содержащем 0,75 масс.% NH_4F , вначале при линейном изменении напряжения от 0 до 40 В со скоростью подъёма напряжения $0,2 \text{ В}\cdot\text{с}^{-1}$, а затем в вольтастатическом режиме при 40 В в течение 15–20 мин до полного окисления металлического слоя. Полученные образцы тщательно промывали этиловым спиртом с последующим быстрым высушиванием в потоке воздуха и термообработкой при 450°C в течение 3 ч. После прогрева образцы обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 1–2 мин для удаления нарушенного тонкого поверхностного слоя.

Спектры дифракции рентгеновских лучей регистрировали на дифрактометре Bruker Advanced D8 ($\text{CuK}_\alpha = 0,154 \text{ нм}$). Гидрофильно-гидрофобные свойства покрытий изучали с помощью измерителя контактного угла Contact Angle Measuring System G10. Электронно-микроскопические исследования выполняли с использованием сканирующего электронного микроскопа LEO-1420.

Для оценки биосовместимости полученные покрытия засеивали клетками остеобластов MC3T3-E1 при плотности 100 клеток на 1 см^2 поверхности образца и культивировали в течение 3 дней в соответствии с методикой, описанной в работе [9]. Цитоскелет живой клетки изучали на оптическом инверсионном микроскопе Nikon Eclipse TS-100-F. Оценку биоактивности образцов осуществляли по удельному клеточному приросту.

Антибиотик в нанопоры TiO_2 инкорпорировали путём погружения образца в водные растворы тетрациклина и доксорубицина с концентрацией 0,5 мг/мл и выдерживания его в растворе в течение 3 ч. Выбор антибиотиков обусловлен их лекарственной значимостью и лёгкостью выполнения качественного и количественного анализа. Количество удерживаемого в порах антибиотика определяли фотометрически с помощью спектрофотометра UV-VIS Agilent 8453. Тетрациклин определяли на длине волны 375 нм, а доксорубицин — 525 нм. Измерение выполняли каждые 10 мин в течение первых трёх часов, затем каждый час в течение первых суток и каждые 24 ч в течение всего последующего времени.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при анодном окислении титана в водно-этиленгликолевом растворе фторида аммония образуются покрытия TiO_2 с вертикально расположенными нанотрубками, имеющими внутренний диаметр 50–80 нм (рис. 1). Толщина покрытий TiO_2 определяется толщиной напылённого титана и составляет 1,5 мкм, а внутренняя поверхность пор составляет $70\text{--}80 \text{ см}^2$ на 1 см^2 геомет-

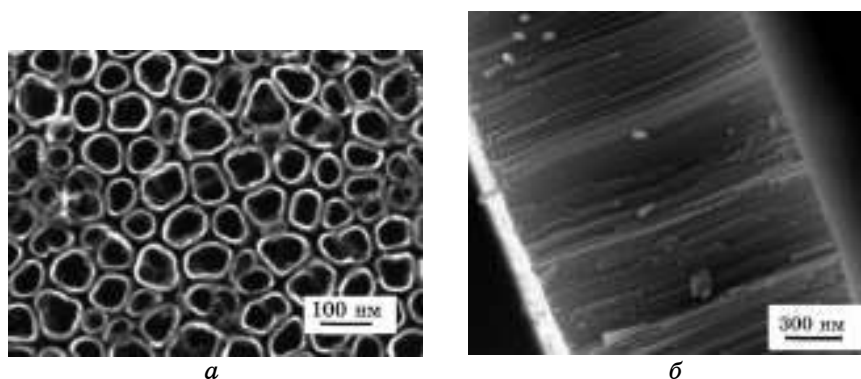


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение TiO_2 -нанотрубок: *а* — вид сверху; *б* — поперечное сечение покрытия.

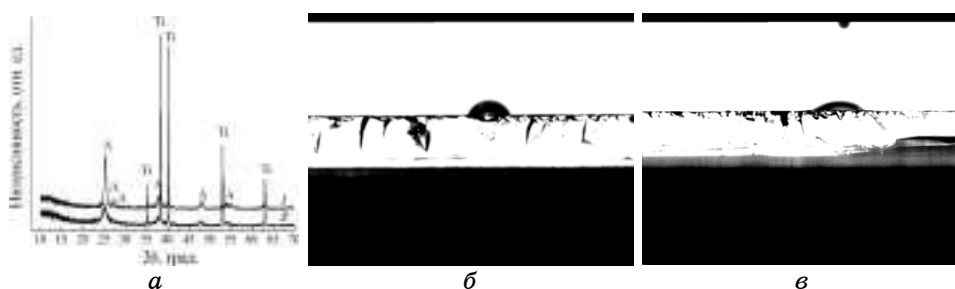


Рис. 2. (*а*) рентгенограммы покрытий TiO_2 -нанотрубок до (1) и после (2) термообработки при 450°C в течение 3 ч, где А — анатаз, Тi — титан; фотографии капли на поверхности ITO-подложки (*б*) и поверхности TiO_2 -нанотрубок (*в*) при измерении гидрофильно-гидрофобных свойств и величина контактного угла.

рической площади полученного покрытия. Рентгенофазовым анализом установлено, что TiO_2 -нанотрубки плохо закристаллизованы (рис. 2, *а*, кривая 1). Однако, их термическая обработка при 450°C в течение 3 ч приводит к кристаллизации оксида со структурой анатаза, при этом, не изменяя заметно морфологию поверхности (рис. 2, *а*, кривая 2) и значительно улучшая адгезию полученного покрытия к подложке.

Поверхность TiO_2 -покрытий характеризуется высоким уровнем смачиваемости. Следует отметить, что при нанесении на поверхность образца капли наблюдается её впитывание в течение 10–30 с, что может быть обусловлено капиллярным эффектом нанотрубок (рис. 2, *б*, *в*). Максимальная величина контактного угла составляет $5,6 \pm 0,3^\circ$, в то время как величина контактного угла ITO-стекла с напылённым на него слоем титана составляет $74,8 \pm 0,3^\circ$.

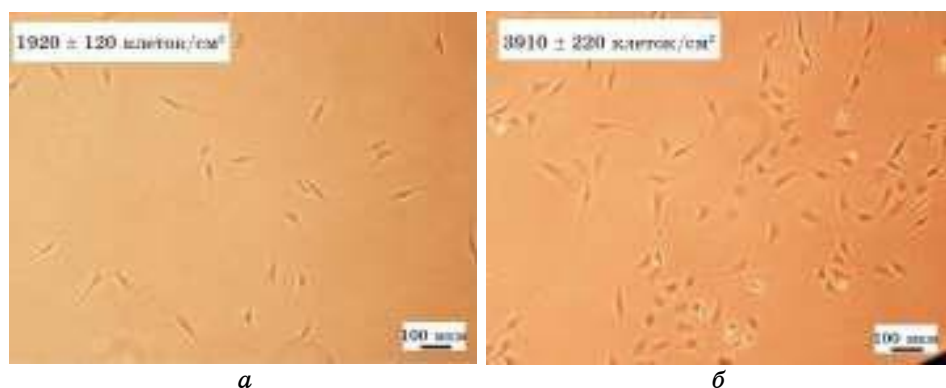


Рис. 3. Изображения живых остеобластов MC3T3-E1 на 3 суток культивирования на ITO-стекле (а) и на поверхности нанотрубок TiO_2 (б).

Выполнение биологических тестов с использованием остеобластов MC3T3-E1 подтвердило, что данные покрытия обладают более чем в два раза высокой биоактивностью, чем поверхность исходной подложки (рис. 3).

Исследование цитоскелета живой клетки на оптическом инверсионном микроскопе показало, что клетка, прикрепляясь к поверхности TiO_2 -нанотрубок, сохраняет способность делиться и образовывать межклеточные контакты. Никакие повреждения или жизненно несовместимые деформации цитоскелета не выявлены. На 3 суток культивирования удельная клеточная плотность на покрытиях TiO_2 составляет в среднем 3910 ± 220 клеток/ cm^2 , что более чем в два раза выше удельной клеточной плотности на исходной подложке 1920 ± 120 клеток/ cm^2 .

Высокая гидрофильность и развитая морфология поверхности полученных покрытий могут благоприятствовать их использованию в качестве носителя лекарственных веществ. Для изучения скорости высвобождения антибиотика из нанопор TiO_2 использовали оптически прозрачные в области 340–1100 нм покрытия TiO_2 , полученные на основе проводящих ITO-стёкол. Следует отметить, что пропитка полученных покрытий водными растворами тетрациклина и доксорубицина приводит к небольшому увеличению их оптической плотности в спектральной области, где поглощает антибиотик. На дифференциальных спектрах оптического поглощения TiO_2 -нанотрубок, модифицированных тетрациклином и доксорубицином, видны пики при 368 нм и 521 нм, что соответствует полосам поглощения тетрациклина и доксорубицина в растворе, соответственно (рис. 4, а). На основании спектрофотометрических данных установлено, что в нанопоры полученных покрытий загружается около $11,4$ мкг/ cm^2 тетрациклина и около $7,5$ мкг/ cm^2 доксоруби-

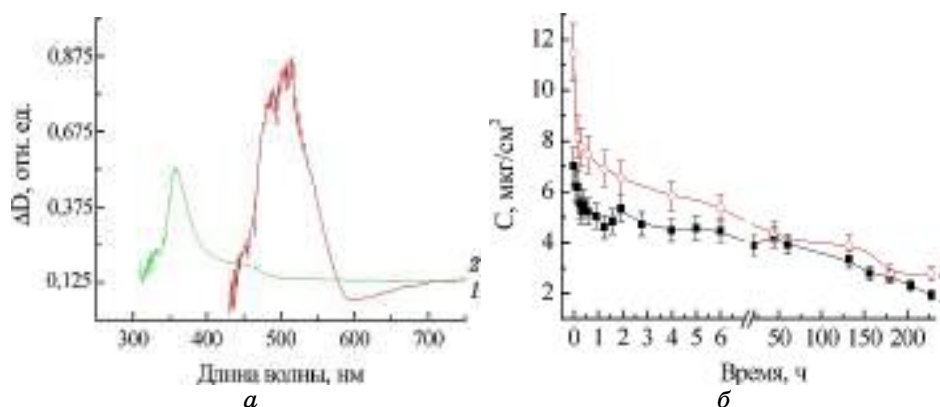


Рис. 4. (а) Дифференциальные спектры оптического поглощения TiO_2 -нанотрубок, модифицированных тетрациклином (1) и доксорубицином (2) в количестве 7,5 и 11,4 $\text{мкг}/\text{см}^2$; (б) зависимость поверхностной концентрации удерживаемого в порах нанотрубок доксорубицина (1) и тетрациклина (2) от времени выдерживания в воде.

цина.

В первые сутки высвобождается около 30% и 40% загруженного тетрациклина и доксорубицина, соответственно. Важно, что высокая начальная скорость высвобождения может способствовать быстрой доставке антибиотика в инфицированные области организма. Затем каждые последующие сутки высвобождается около 2–4% антибиотика, а скорость высвобождения доксорубицина и тетрациклина снижается до уровня 0,6 и 0,3 $\text{мкг}/(\text{см}^2 \cdot \text{сут})$, соответственно. Следует отметить, что по истечении 200 ч высвобождается примерно одинаковое количество тетрациклина и доксорубицина — до 80%, что может обеспечивать длительный антибактериальный эффект.

4. ВЫВОДЫ

Таким образом, анодное окисление титана в водно-этиленгликолевом растворе фторида аммония позволяет получить покрытия из структурно упорядоченных TiO_2 -нанотрубок с вертикальным расположением пор, имеющих внутренний диаметр 50–80 нм и внутреннюю поверхность 70–80 см^2 на 1 см^2 геометрической поверхности. Полученные покрытия обладают высокой гидрофильностью (контактный угол $5,6 \pm 3^\circ$), высокой биосовместимостью и являются перспективными для использования в качестве нанорезервуаров с контролируемым высвобождением антибиотиков для лечения костных инфекций.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № X13К-057).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА—REFERENCES

1. P. Roy, S. Berger, and P. Schmuki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**: 2904 (2011).
2. K. Niespodziana, K. Jurczyk, and M. Jurczyk, *Rev. Adv. Mater. Sci.*, **18**: 236 (2008).
3. A. Kar, K. S. Raja, and M. Misra, *Surf. Coat. Technol.*, **201**: 3723 (2006).
4. S. Minagar, C. Berndt, J. Wang, E. Ivanova, and C. Wen, *Acta Biomater.*, **8**: 2875 (2012).
5. A. Kodama, S. Bauer, A. Komatsu, H. Asoh, S. Ono, and P. Schmuki, *Acta Biomater.*, **5**: 2322 (2009).
6. K. Gulati, M. Sinn Aw, D. M. Findlay, and D. Losic, *Therapeutic Delivery*, **3**: 857 (2012).
7. J. Yan and F. Zhou, *J. Mater. Chem.*, **21**: 9406 (2011).
8. S. A. Ulasevich, S. K. Poznyak, E. V. Skorb, and A. I. Kulak, *Physics, Chemistry and Application of Nanostructures*, **4**: 301 (2013).
9. C. M. Bidan, K. P. Kommareddy, M. Rumppler, P. Kollmannsberger, Y. J. M. Bréchet, P. Fratzl, and J. W. C. Dunlop, *PLoS One*, **7**: e36336 (2012).