

УДК: 616.314-089.23:669.721-034.7:57.089.6(047.31)

УКПП

№ держреєстрації № 0119U100770

Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ (СумДУ)

40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2

тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58 e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
д.ф.-м.н., професор

А.М. Черноус

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Визначення ефективності застосування плазмової електрооксидзації для
модифікації біодеградуючих сплавів для ортопедії

**ФОРМУВАННЯ ЗАХИСНОЇ ПЛІВКИ НА ПОВЕРХНІ МАГНІЄВИХ
ІМПЛАНТАТІВ
(проміжний)**

Науковий керівник
к.мед наук

О.М. Олешко

2019

Рукопис закінчено 23 грудня 2019 р.
Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол № 4 від 26
листопада 2019 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Старш. наук. співроб., к.мед.наук	_____	Олешко О. М. (реферат, вступ, висновки, розділи 1,2,3)
	(23.12.2019)	
Наук. Співроб.	_____	Дейнека В. М. (розділ 1,2,3)
	(23.12.2019)	
Старш. наук. співроб., канд.мед.наук., договір цивільно-правового характеру	_____	Корнієнко В. В. (розділ 2)
Наук. співроб.	(23.12.2019)	
	_____	Гусак Є. В. (розділ 2, 3)
	(23.12.2019)	
Мол. наук. співроб.	_____	Гапченко А. В. (розділ 2)
	(23.12.2019)	
Аспірант, договір цивільно-правового характеру	_____	Дригваль Б. О. (розділ 3)
	(23.12.2019)	
Аспірант, договір цивільно-правового характеру	_____	Миронов П. Ф. (розділ 3)
	(23.12.2019)	
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____	Юсупова А. Ф. (розділ 2)
	(23.12.2019)	
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____	Любчак І. В. (розділ 3)
	(23.12.2019)	
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____	Зеленський Ю. С. (розділ 2)
	(23.12.2019)	
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____	Савченко А. В. (розділ 3)
	(23.12.2019)	
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____	Дудко Ю. С. (розділ 3)
	(23.12.2019)	
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____	В'юн О. П. (розділ 3)
	(23.12.2019)	

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 40 с., 17 рис., 1 табл., 35 джерел.

БІОДЕГРАДАЦІЯ, ІМПЛАНТИ, КОРОЗІЙНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ, МЕТАЛЕВІ ІМПЛАНТИ, НАНОЧАСТОЧКИ, ПЛАЗМОВА ЕЛЕКТРООКСИДАЦІЯ

Об'єкт дослідження – Процеси плазмової електрооксидзації магнієвих біодеградуючих імплантатів.

Предмет досліджень – Структура та фізико-хімічні й біологічні властивості покриття біодеградуючих магнієвих імплантатів, отриманого за допомогою плазмової електрооксидзації з наночасточками срібла та оксиду цинку.

Мета роботи – встановлення загальних закономірностей формування оксидної плівки на поверхні магнієвих сплавів з метою контролю процесів резорбції в біологічних середовищах та біосумісності імплантатів з модифікованою поверхнею.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Створення робочих розчинів та підбір режимів (напруга, сила току, час) плазмової електрооксидзації для створення оксидних плівок на поверхні магнієвих сплавів.
2. Формування оксидної плівки на поверхні магнієвих сплавів з додаванням різної концентрації та форми наночасточок срібла та оксиду цинку.
3. Визначення фізико-хімічних, корозійних, структурних та оптичних характеристик поверхні імплантатів, отриманих різними методами.
4. Визначення ступеню адгезії, проліферації та метаболізму клітин при культивуванні на імплантатах з функціоналізованою поверхнею.
5. Узагальнення результатів дослідження з точки зору можливості створення біодеградуючих ортопедичних імплантатів.

Отримані дані щодо швидкості деградації сплавів магнію, підібрані розчини електролітів для забезпечення корозійної стійкості сплаву та

подальшої його остеointegraції. Проведений експеримент дозволив вибрати оптимальний режим напруги та струму для створення контрольованих параметрів морфології поверхні та хімічного складу зразків. В результаті експериментів *in-vitro* підтверджено відсутність токсичного впливу анодного покриття на культуру клітин.

ЗМІСТ

	С.
Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів	6
ВСТУП.....	7
1 ОГЛЯД	
ЛІТЕРАТУРИ.....	9
2 МАТЕРІАЛИ	ТА
	МЕТОДИ
ДОСЛІДЖЕННЯ.....	15
2.1 Матеріали.....	15
2.2.1 Синтез	наночастинок
Ag.....	15
2.2.2 Синтез наночастинок ZnO.....	16
2.3 Плазмова	електролітична
оксидація.....	16
2.4 Аналіз SEM та EDX.....	17
2.5 XPS-аналіз.....	17
2.6 Визначення контактного кута.....	18
2.7. Оцінка біоактивності зразків.....	18
2.7.1 In vitro оцінка вивільнення іонів для	
ZrNb.....	18
2.7.2 SBF тест для	
Zr ₆₀ Nb ₂₁ Ti ₁₉	19
2.8 Культура клітин.....	19
2.9 Тест на бактеріальну адгезію.....	20
2.10 Статистичні методи.....	21
3	РЕЗУЛЬТАТИ
ДОСЛІДЖЕННЯ.....	22
3.1 Плазмова електрооксидація зразків ZrNb з AgNP.....	22
3.2 Плазмова електрооксидація (ПЕО) зразків	
TiZr.....	26
3.2.1 SEM з	
EDX.....	26
3.2.2 SBF тест.....	28
3.2.3 Культура клітин.....	29
3.2.4. Тест на адгезію бактерій.....	30
3.3 Плазмова електрооксидація зразків TiZr з наночастинками оксиду	
цинку.....	31
3.3.1 SEM, EDX and	
SA.....	31

3.3.2 Оцінка біоактивності.....	32
3.3.3 Культура клітин.....	33
3.3.4 Мікробіологічне дослідження.....	33
ВИСНОВКИ.....	35
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	37

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

Mg – магній

ПЕО – плазмова електрооксидация

КК – контактний кут

SEM – скануюча електронна мікроскопія

Ag - срібло

AgNP – наночастинки срібла

Al₂O₃ – оксид алюмінію

Fe – ферум

Zn – цинк

ZnONPs – наночасточки оксиду цинку

Ca - кальцій

TiO₂ – оксид титану

CO₂ – оксид вуглеця

ZrO – оксид цирконію

ZnO – оксид цинку

BF – simulated body fluid

EDX – Energy Dispersive X-ray

SEM – scanning electron microscopy

°C – градус Цельсія

(CFU) – колонієутворюючих одиниць

ВСТУП

Використання постійних металевих протезів на основі титану, танталу та сталі знайшло широке використання в ортопедії, хірургії, щелепно-лицевій хірургії та стоматологічній імплантології. При цьому останніми роками спостерігається підвищення інтересу до біодеградуючих сплавів на основі магнію, цинку та заліза [1].

Завдяки біосумісності та задовільним біомеханічним властивостям, сплави на основі магнію є найбільш перспективними для клінічного застосування. На відміну від Європи, в Україні відсутні власні комерційні імплантати, що обмежує їх широке застосування.

Серед біодеградуючих імплантів слави магнію (Mg) привертають значну увагу як перспективні завдяки їх біосумісності, фізичним властивостям та здатності повністю заміщуватись тканиною у фізіологічних умовах, що виключає необхідність повторного хірургічного втручання. Проте основною проблемою розробки сучасних імплантів для медичного застосування на основі Mg залишилось узгодження процесів деградації матеріалу та швидкості формування тканин намісці останнього. Оскільки ортопедичні імплантати мають зберігати свої механічні властивості щонайменше 3 місяці, то метою є використання сплавів з відповідними фізико-механічними характеристиками для уникнення низки клінічних ускладнень, наприклад другого перелому, який може виникнути внаслідок швидкої резорбції імплантату. Окрім того покращення корозійних властивостей

біодеградуючих сплавів можна досягнути застосувавши додаткові методи: моделювання і виготовлення нових сплавів з включенням рідкоземельних елементів та post-cast обробка, а також формування захисного покриття на основі кальцій-фосфатних матеріалів [2].

Плазмова електрооксидация (ПЕО) це сучасний перспективний метод модифікації поверхні, а саме створення оксидного шару з пористою структурою. Моделюванням електролітного складу, режимами сили току та напруги можна виготовити поверхню з унікальними характеристиками. Біокермічна поверхня може володіти як високою біосумісністю, що створює ідеальну поверхню для прикріплення та проліферації остеогенних клітин з подальшою успішною остеоінтеграцією. В методі ПЕО змінюючи склад електролітів, силу току та напругу можна контролювати розмір пор, товщину оксидного шару та його склад. Окрім того що плазмова електрооксидация є екологічно чистим методом, процес осадження оксидів швидкий і контрольований [3].

Іншою причиною неповної остеоінтеграції імплантів є мікробна інфекція [4]. Сучасна стратегія виготовлення заміщуючих матеріалів зосереджена на модифікації поверхні з одного боку для поліпшення остеоінтеграції, а з іншого надання їй антибактеріальних властивостей. Додавання наночастинок (NPs) до складу електроліту під час ПЕО процесу може вирішити цю проблему [5].

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Металеві імпланти використовуються для заміни та/або регенерації травмованої кісткової тканини. Такі матеріали мають відповідати ряду вимог, що обумовлені структурою, складом і властивостями кісткової тканини: 1) близькість механічних характеристик до характеристик кістки; 2) близькість хімічного складу штучного матеріалу і кістки; 3) для швидкого вrostання кісткової тканини в імплантат необхідна наявність у ньому пор розміром 100-150 мкм [6]. Серед ортопедичних металевих імплантатів виділяють тимчасові – на основі магнію та цинку, та постійні на основі сталі, кобальту, титану, хрому. При несумісності механічних характеристик постійних імплантатів з властивостями тканин відбувається розвиток ефекту стресового зміщення, що призводить до резорбції кісткової тканини навколо імплантату [7] і як наслідок до розвитку остеопорозу та можливої втрати з'єднання в системі «імплантат-кістка». У зв'язку з цим, інертні та корозійно стійкі імпланти були витіснені появою нового класу металевих біоматеріалів, які біологічно розкладаються [8].

Метали, порівняно з іншими матеріалами, мають високу зносостійкість, ударну міцність, високу пластичність і в'язкість [9]. Це дозволяє широко застосовувати дані сплави в ортопедії, загальній та серцево-судинній хірургії. Відповідність механічних властивостей та швидкості корозії, додаткова структурна підтримка протягом певного періоду необхідні для завершення репаративних процесів. В основі даної лінії імплантів, що використовуються для медичного застосування розглядаються три метали: залізо, цинк та магній. Механічні параметри чистих Fe, Zn і Mg наведені в таблиці 1.

З точки зору механічних властивостей Залізо є цікавим матеріалом для виготовлення біорезорбуючих імплантів. Більш високий модуль пружності надає залізу високу радіальну міцність. Окрім того воно має високу пластичність, що застосовується при виготовленні тонких складових матеріалу та імплантів з деформаціями [10]. Історія виготовлення таких імплантів почалась з металевого стенту Armco® iron (Fe > 99.8%) та

імпланції його у низхідну аорту новозеландських білих кроликів у 2001 році [11].

Таблиця 1.1 – Механічні параметри чистих Fe, Zn і Mg

Table 1 Mechanical parameters and degradation rate of pure Fe, Zn, and Mg used for medical application (compare the stainless steel).

	Yield Strength (MPa)	Tensile Strength (MPa)	Elongation (%)	<i>In vitro</i> Degradation Rate (mm year ⁻¹)
316L SS: annealed	190	490	40	-
Pure Fe: annealed	150	200	40	0.16
Pure Zn: as cast	17	20	0.2	0.2
Pure Mg: as cast	20	86	13	407

Перші результати імплантації не звідчили суттєвих доказів наявності ні запальної реакції ні системної органної токсичності. Однак, повільна деградація (0,16 мм рік⁻¹) і феромагнітна природа чистого Fe викликало проблеми при використанні заліза у якості імплантаційних дивайсів [12]. Додавання до сплаву Mn збільшило швидкість деградації до 0,44 мм року⁻¹, але це не вирішило проблеми і ці сплави не набули широкого застосування.

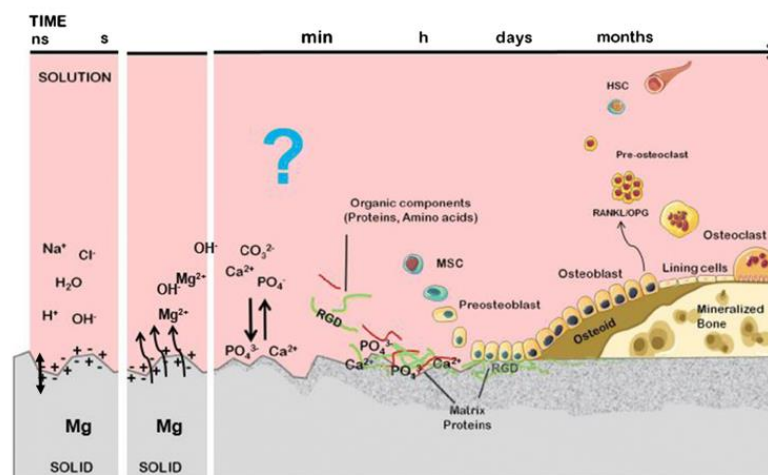
Наступними перспективними кандидатами для біорезорбтивних імплантів є сплави на основі Zn. Їх перевагами є низька температура плавлення і низька реакційна здатність у розплавленому стані. Що дозволяє виготовляти матеріали простим плавленням, гравітацією або штампуванням в атмосфері повітря та гарячим формуванням [13]. Застосування таких імплантів також не виявило місцевої чи загальної токсичної дії [14]. Однак один з важливих недоліків чистого Zn як потенційного біорезорбтивного металу, що він має досить низьку міцність і пластичність.

Магній (Mg) та його сплави є біологічно сумісними матеріалами з відповідними біомеханічними параметрами та повною резорбцією у фізіологічних середовищах. Ці властивості зробили їх перспективними

кандидатами для біомедичного застосування [15] (рис 1.1). Деградація Mg в межах фізіологічних умов позбавляє необхідності повторних операцій для видалення імплантату (рис 1.2). Останнє століття магнієві сплави активно досліджуються, зайняли широку нішу серед медичних матеріалів, але поки не стали оптимальним матеріалом, через необхідність контролю біодеградації. Корозійні властивості Mg сплавів залежать від багатьох параметрів: способу лиття, виготовлення, складу, мікроструктури сплавів залежно від текстури, розміру зерна та техніки обробки кінцевого матеріалу [16,17,18].



Рисунок 1.1 – Медичне застосування матеріалів на основі Магнію



International scientific and practical conference of student, postgraduates and young scientists:
«BIOMEDICAL PERSPECTIVES» 16 – 18.10.2019

Рисунок 1.2 – Схема деградації Магнієвих сплавів у фізіологічних умовах з заміщенням на новоутворену тканину.

Отже для покращення корозійних і механічних властивостей використовуються різні методи легування, швидкого охолодження, додавання до сплаву інших елементів (Ca, Zn, Mn) [19.]. Низька стійкість до корозії магнієвих імплантатів [20] призводить до неспівпадіння процесів формування нової кісткової тканини на місці деградуючого імплантату. Одним з популярних і сучасних методів обробки є модифікації поверхні [21]. В даний час для модифікації поверхні сплавів Mg застосовується широкий спектр механічних, хімічних та фізичних методів. Одним із яких є процес плазменної електрооксидзації (ПЕО), в наслідок якого створюється захисний оксидний шар (рис 1.3).

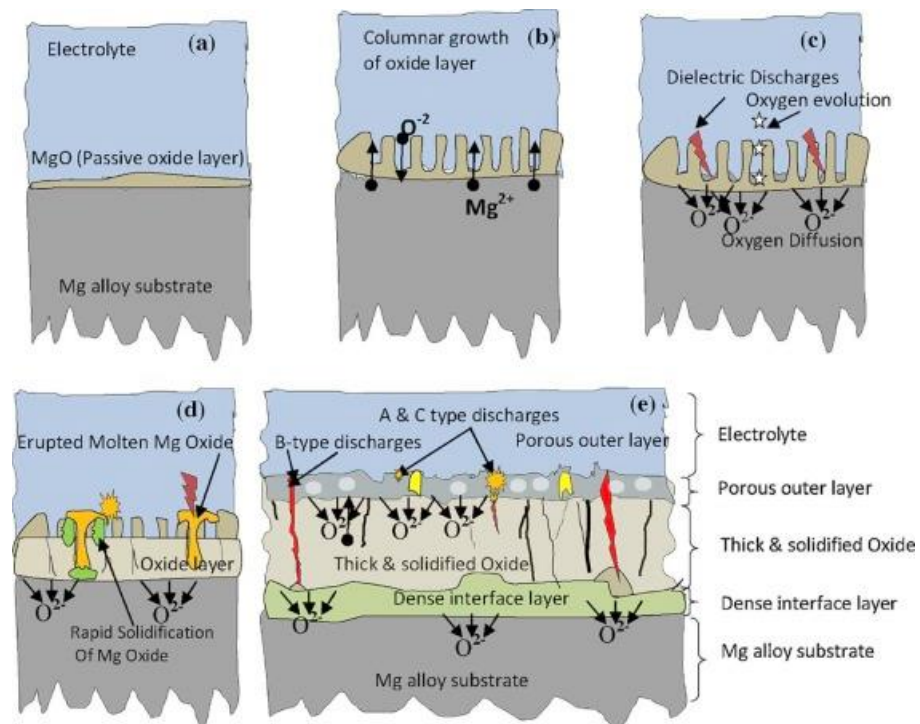


Рисунок 1.3 – Схема процесу плазмової електрооксидзації R.O. Hussein et al. / *Electrochimica Acta 112 (2013) 111–119*

ПЕО це модифікована анодизація, при якій мікророзряди виникають на поверхні Mg у супроводі з виділенням водню і створюючи поверхневу плівку. Згодом висока напруга викликає пробій діелектрика і покриття стає товщим.. Модифікація таких параметрів (рис 1.4) як напруга, щільність струму, склад розчину електроліту і час занурення визначають морфологію, товщину, склад та фізіохімічні властивості поверхневого покриття. Разом ці характеристики безпосередньо впливають на загальну корозійну стійкість

матеріалу. Хімічний склад електроліту і режими чинять значний вплив на керамічні покриття. Модифікація напруги, щільності струму, складу розчину електроліту та часу розряду допомагає досягти різного типу морфології, товщини, складу, фізіохімічних властивостей. Морфологія та мікроструктура покриттів залежить також від добавок, які змінюють провідність розчинених речовин. Це впливає на утворення анодного поверхневого шару [22].

Загалом анодизація Магнію вимагає базового електролітичного розчину, який містить силікати [23], фосфати [24] або алюмінати. Найчастіше використовують базові розчини метасилікату натрію або гідроксид калію [25].

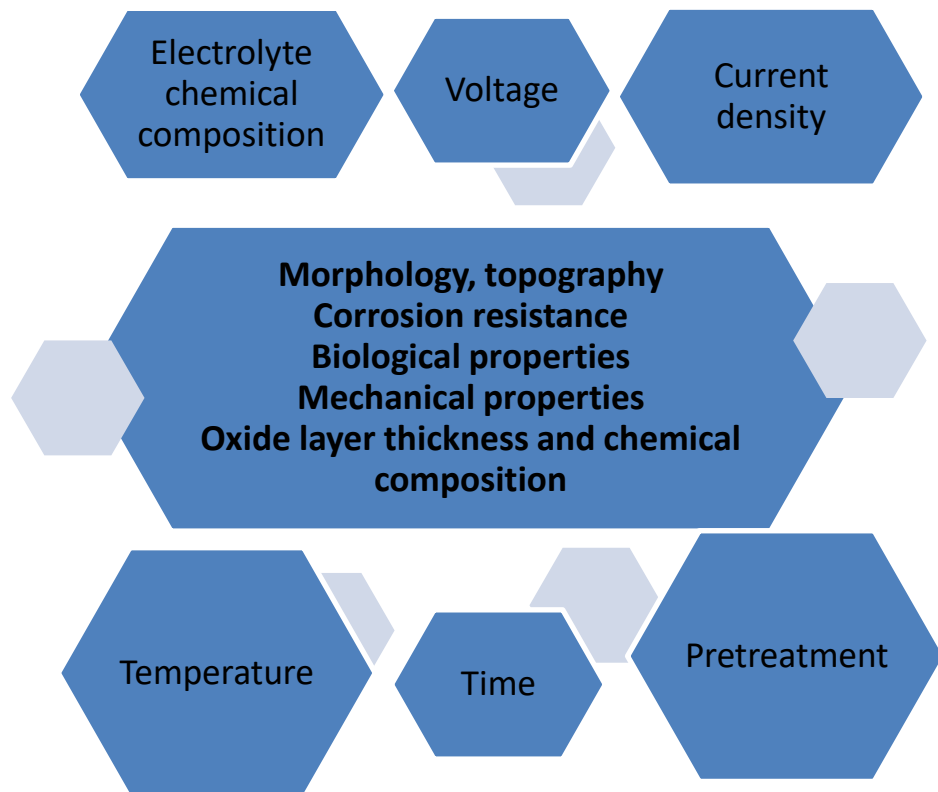


Рисунок 1.4 – Залежність властивостей поверхні після ПЕО від параметрів процесу.

Поліпшення стану корозійної стійкості можна досягти за допомогою інших добавок такі як борати, сульфат, гліцерин, цитрат натрію, амоній, фосфат, етиленгліколь, серед іншого розчинник допомагає генерувати нові фази на поверхні покриття [26, 27]

Окрім доказів поліпшення корозійності та зносостійкості такий керамічний шар забезпечує біосумісність та біоактивність [28] стандартного сплаву. Електроліти, що містять фосфор та / або кальцій, мають позитивні характеристики для процесів осеоінтеграції [29].

Іншою причиною неповної осеоінтеграції є мікробна інфекція головним фактором, що викликає відторгнення імплантатів. Мікробні популяції адгезуються до твердих субстратів формуючи біоплівки [30]. Серед основних стратегій розвитку є напрямок модифікації поверхні для поліпшення осеоінтеграції імплантатів та зменшення бактеріальної інфекції. Розробка багатофункціональних стратегій, що сприяють осеоінтеграції, пом'якшуючи колонізацію бактерій, очевидно важлива, оскільки обидва ефекти необхідні для забезпечення оптимальної, довготривалої функціональності медичних імплантатів. Однак механізми адгезії еукаріотичних та прокаріотичних клітин схожі, і це критично враховує багатофункціональний поверхневий розвиток.

Zn, Ag і Cu - добре відомі іони з сильним антибактеріальним ефектом, які використовуються з давніх часів, і застосування наноструктурних технологій може значно посилити ці ефекти. Срібло широко використовується для виготовлення покриття завдяки своїм чудовим антимікробним властивостям та стійкості до широкого спектру мікробів, включаючи грампозитивні та грамнегативні бактерії [31]. Було проведено кілька досліджень щодо застосування наночастинок срібла (AgNPs) в ПЕО. Hengel та ін. [32] забезпечив покриття ПЕО AgNP на пористих імплантатах і виявив вдвічі більшу зону гальмування, ніж у необробленого контролю, при цьому ніяких ознак цитотоксичності в мезенхімальних стовбурових клітинах людини не спостерігалось. Було встановлено, що антибактеріальні покриття з високими концентраціями Ag виявляють цитотоксичність та інгібують осеоінтеграцію.

Плазмова електрооксидация Mg сплаву в розчині на основі Ca-P з AgNP може створити мезопористий шар оксиду, який підтримує адгезію та

проліферацію клітин остеобластів. Крім того, отримана поверхня з вбудованим Ag може запобігти адгезії бактерій, що може бути ефективним підходом для профілактики інфекційних ускладнень після імплантації.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали

Сплави ZrNb (Zr – 2,5 мас. % Nb) та титано-цирконієвої системи (Zr₆₀Nb₂₁Ti₁₉) були отримані з R&D Osteoplant (Дембіца, Польща). Для всіх типів металів та досліджень були підготовлені циліндричні зразки діаметром та висотою 6 мм. Усі хімічні речовини були придбані у Sigma-Aldrich та використовувались як отримані: нітрат срібла (AgNO₃, 98%), полі (N-вінілпіролідон) (PVP, Mw = 40 000, K-25), моногідрат фосфіату натрію (SPM, NaH₂PO₂·H₂O, 95%), етиленгліколь (EG, C₂H₆O₂, 90%), ізопропанол (C₃H₈O, 90%) та гіпофосфіт кальцію (Ca (H₂PO₂)₂), дигідрат ацетату цинку (Zn (CH₃CO₂)₂(H₂O)₂, 99%).

Грампозитивні бактерії (*S. aureus*, штам В 918), отримані з Національної колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного, Україна), були використані для оцінки властивостей клейкої поверхні зразків. Необхідні носії для бактеріальної культури були закуплені з HiMedia (Індія), Alamar blue - від Invitrogen (США). Носії та реагенти для дослідження клітинної культури були придбані у компанії Gibco®, США. Людський остеобласт (НО) був отриманий з колекції Сумського державного університету.

2.2.1 Синтез наночастинок Ag

Спочатку 10 мл EG нагрівали до 160 °С протягом 30 хв, 5 мл 0,1 М розчину PVP/EG додавали до нагрітого розчину EG. Після цього до реакційної колби по краплях додавали 5 мл 0,2 М розчину AgNO₃/EG, далі суміш перемішували протягом 1 години за допомогою магнітного змішувача. Після закінчення реакції додавали 10 мл ізопропанолу для припинення

реакції. Зразок промивали повторним центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 10 хв з повторною дисперсією в ізопропанолі. Синтез AgNP описаний в наукових публікаціях [33].

2.2.2 Синтез наночастинок ZnO

Нанокристали ZnO синтезувались шляхом алкоголізу та конденсації, відомо як поліольний процес, $Zn(CH_3CO_2)_2 \cdot (H_2O)_2$ (2,2 г) в EG (10 мл) змішують та нагрівають при 160 °С. Після нагрівання розчину в колбі з круглим дном, з обов'язковим наступним рідинним охолодженням протягом 4 годин на магнітному змішувачі, відбувається осадження нанокристалів ZnO. Нанокристали відновлювали центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 5 хв і двічі промивали ізопропанолом. Методика отримання наночастинок ZnO описана в працях закордонних авторів [33].

2.3 Плазмова електролітична оксидація

Зразки як ZrNb, так і Zr60Nb21Ti19 попередньо промивали проточною дистильованою водою з наступним знежиренням та очисткою 2-пропанолом на ультразвуковому змішувачі протягом 5 хв. Попередньо оброблені проточною деонізованою водою, зразки піддавали анодизації в електролітичній ванні, яка містила 250 мл електроліту наступного хімічного складу, для:

1. ZrNb:

- $Ca(H_2PO_2)_2$ (0,5 моль/л) та наночастинок срібла (264 мг/л).

2. Zr60Nb21Ti19:

- $Ca(H_2PO_2)_2$ (0,5 моль/л);

- $Ca(H_2PO_2)_2$ (0,1 моль/л) та ZnO Np (40 000 мг/л).

Модифікацію поверхні здійснювали шляхом плазмової електрооксидації за умов дії постійного електричного струму. Сила струму становила 100 мА/см², напруга варіювалась в залежності від типу сплаву та складу

електроліту. Так для ZrNb зразків максимальні показники досягали 450 Вольт. Зразки з титано-цирконієвої системи піддавались ПЕО при 300, 400 та 450В, а за умов збагачання електроліту наночастинками оксиду цинку – 350 Вольт відповідно. Площа поверхні модифікованої поверхні становить 0,89 см². Анодовані зразки промивали дистильованою водою, а потім в деіонізованій суміші дистельована вода/2-пропанол протягом 5 хв.

Плазмову електрооксидацию проводили на магнітному змішувачі в колбі з плоским дном та системою рідинного охолодження, за рахунок чого температура електроліту була постійною та контролювалася на рівні +15 °С. експозиція процесу становила 5 хвилин. Анодом виступала титанова сітка, що була занурена в електроліт по внутрішній поверхні колби, зразок був зафіксований на кінці аноду. Джерелом постійного струму був пристрій PWR 800Н, Кікусуї, Японія.

2.4 Аналіз SEM та EDX

Дослідження SEM були використані для оцінки морфології та хімічного складу зразків після ПЕО-процесу та тестів біоактивності в розчині SBF. Перед спостереженнями SEM всі зразки після проведення ПЕО та SBF покривали тонким шаром золота. Для оцінки зразків після процесу ПЕО було використано скануючий електронний мікроскоп Phenom Pro X із системою EDX. Для аналізу результатів після тесту в SBF використовували скануючий електронний мікроскоп Hitachi 3000. Наночастинки срібла та оксиду цинку визначали за системою JEOL SEM.

2.5 XPS-аналіз

Хімічний склад та хімічний стан зразка характеризували рентгенівською фотоелектронною спектроскопією (XPS). Для цього було використано спектрометр PHI 5000 VersaProbe (ULVAC-PHI). Спектри XPS були отримані з використанням монохроматичного випромінювання Al_{Kα} (hν = 1486.6 eV, 25 W) Спектри обстеження та високої роздільної здатності збирали за допомогою напівсферичного аналізатора при постійних енергіях

пропускання відповідно 117,4 та 23,5 eV. Фон коригувався за допомогою моделі Ширлі для отримання інтенсивності сигналу XPS. Для процедури деконволюції використовували асиметричну функцію Гаусса/Лоренція при сталому співвідношенні $G/L = 0,35$. Визначені пікові позиції були виправлені у відношенні позицій авантідних вуглецевих C1 при 284,8 eV. Для обробки даних було використано програмне забезпечення Advantage Surface Chemical Analysis (вер. 5.9904).

2.6 Визначення контактного кута

Експерименти з вимірюванням контактного кута (КК) проводилися за допомогою відео-оптичного вимірювального приладу вимірювання кута (Data Physics, San Jose, CA city, state, USA) та програмного забезпечення SCA 20 для ОСА та РСА. Дані КК були записані для дистельованої води щонайменше в трьох паралельних позиціях кожного зразка.

2.7. Оцінка біоактивності зразків

2.7.1 In vitro оцінка вивільнення іонів для ZnNb

Анодовані зразки поміщали окремо в пробірки Falcon, кожен з 20 мл розчину Рінгера. Зразки струшували в центрифугі при 60 об/хв та інкубували при 37 °C (інкубатор POL-ЕКО, Польща) протягом 6 тижнів. Після кожного 2-тижневого періоду вміст ніобію, фосфору, цирконію, кальцію та срібла, що виділяються в розчині Рінгера, визначали за допомогою індуктивно пов'язаної плазмової атомно-емісійної спектроскопії (ICP-AES). Використовували спектрометр Varian 710-ES, оснащений небулайзером OneNeb. Параметри були такими: потужність ВЧ 1,0 кВт, плазмовий потік 15 л хв⁻¹, допоміжний потік 1,5 л хв⁻¹, тиск небулайзера 210 кПа, швидкість насоса 15 об / хв, емісійні лінії Nb: $\lambda = 295,088$ і $294,154$ нм, P: $\lambda = 213.618$, Zr: $\lambda = 343.823$ і 327.307 нм, Ca: $\lambda = 317.933$ і 422.673 нм, і Ag: $\lambda = 328.068$ і 338.289 нм. Застосовано метод калібрувальної кривої. Калібрувальні криві готували за допомогою матриці (розчин Рінгера) у тій же концентрації, що і у зразках. Були використані одноелементні стандартні розчини 1 мг/мл⁻¹ та 10

мг/мл⁻¹ (цирконій), що постачаються Merck Millipore (Німеччина). Деіонізовану воду готували за допомогою системи Millipore Elix 10. Отримані результати - це середнє значення концентрацій, отриманих для всіх використаних аналітичних ліній зі стандартним відхиленням, що не перевищує 1,5%.

2.7.2 SBF тест для Zr60Nb21Ti19

Дослідження біоактивності проводили в протеїні simulated body fluid (SBF) з концентрацією іонів, що імітували концентрацію плазми крові людини. SBF готували шляхом розчинення реагенту NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂PO₄·3H₂O, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂ та Na₂SO₄ у дистильованій воді, яку доводили до рН 7,40, використовуючи гідроксиметил амінометан та 1М HCl при 37 °С. розчин має такий іонний склад: 142,0 ммоль/л Na⁺, 5,0 ммоль/л K⁺, 1,5 ммоль/л Mg²⁺, 2,5 ммоль/л Ca²⁺, 147,8 ммоль/л Cl⁻, 4,2 ммоль/л HCO₃⁻, 1,0 ммоль/л HPO₄²⁻, 0,5 ммоль/л SO₄²⁻.

Після процесу ПЕО зразки занурювали в СБФ протягом загальної кількості 4 тижнів із щоденною заміною розчину. Через кожні 7 днів зразки виймали з розчину, потім промивали дистильованою водою та сушили. Зневоднені зразки були покриті золотом (Cressington Sputter Coater 108 авто) та проаналізовані за допомогою скануючого електронного мікроскопа (Hitachi S-3400N).

2.8 Культура клітин

Первинну культуру клітин остеобластів людини культивували в модифікованій суміші середовищ/живильних речовин Дульбекко F-12 (DMEM/F-12) з використанням L-глутаміном, що містить 100 одиниць/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В, 10 % фетальної сировини великої рогатої худоби та 1,0 нг/мл bFGF. Клітини культивували при 37 °С у зволоженому інкубаторі з 5 % CO₂ протягом 24 годин, поки не був отриманий суцільний шар з більш 80 % злиття.

Остеобласти висівали на кожен зразок та лунки з позитивним контролем при щільності клітин (2×10^4 клітин на лунку). Клітинну життєздатність аналізували колориметричним синім аналізом Alamar blue, в якому резазурин - синій барвник, активується до резорурфіну рожевого кольору лише життєздатними мітохондріями. Розчин Alamar blue додавали в кількості, що дорівнює 10 % об'єму в кожен лунку. Як негативний контроль розчин Alamar Blue додавали в середовище без клітин. Позитивним контролем були лунки з клітинами без експериментальних зразків. Інкубували протягом 4 годин при 37 °C за умови повної відсутності світла. Середовище переносили на іншу 96-лункову планшетку та вимірювали поглинання за допомогою зчитувача Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) при довжині хвиль 570 нм і 600 нм. Кількісний показник для клітин визначали через різні проміжки часу: 1, 3 та 7 днів. Всі експерименти повторювали 3 рази. Розрахунок відсотка зменшення Alamar blue проводили як рівняння відповідно до протоколу виробника.

2.9 Тест на бактеріальну адгезію

Адгезивні властивості експериментальних зразків оцінювали за допомогою грампозитивної бактерії (*Staphylococcus aureus*, штам В 918). Штам бактерій, вирощений на поживному агарі при 37 °C протягом 24 год, суспендували в фізіологічному розчині (0,9 % NaCl) і повторно суспендували до кінцевої щільності 1×10^8 колонієутворюючих одиниць (CFU) мл^{-1} ($8 \log$ CFU) у поживному бульйоні з використанням стандартів McFarland.

Диски інкубували горизонтально з 2,0 мл бактеріальної суспензії в статичних умовах у 24-лунковій планшетці при 37 °C протягом 2, 4, 6 та 24 годин. Потім зразки видаляли стерильними щипцями і тричі промивали в 2,0 мл стерильного фізіологічного розчину, щоб видалити незрілі бактерії. Далі диски поміщали у стерильні пробірки з 1,0 мл стерильного фізіологічного розчину, використовуючи ультразвукову ванну (B3500S-MT, Bransone Ultrasonics Co., Шанхай, Китай) протягом 1 хвилини для видалення

прилиплих бактерій з поверхонь зразків. Дотримуючись цього кроку, ми проводили визначення кількості колоній у кожній точці інкубації, використовуючи методику з багатолунковою планшеткою, культивуючи на твердому носії 10 мкл фізіологічного розчину протягом 24 год. Лунки, що містять диски і випробувані зразки в середовищі росту без бактеріальних інокулятів, використовували в якості контролю. Всі експерименти повторювались по три рази.

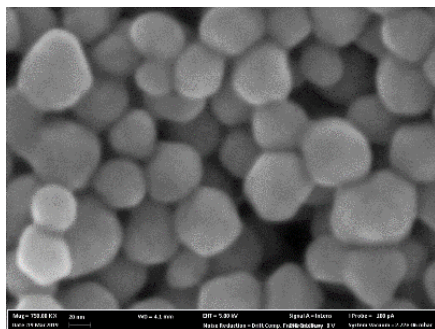
2.10 Статистичні методи

Статистичну обробку цифрових даних проводили за допомогою програми SPSS statistica 21.0. Нормальність розподілу перевіряли за допомогою одновибіркового критерію Колмогорова – Смирнова. Порівнювали середні величини, використовуючи t-критерій для незалежних вибірок. Достовірною вважали різницю при $t \leq 0,05$.

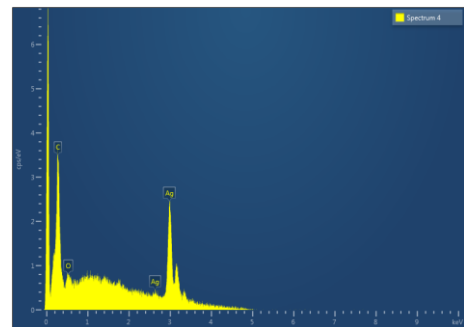
3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Плазмова електрооксидация зразків ZrNb з AgNP

Наночастинками срібла, використаних експерименті, мають круглу форму з середнім розміром $27 \pm 4,3$ нм (рис. 3.1а). Аналіз EDX припустив наявність чистого срібла без наявності додаткових елементів (рис. 3.1 б).



(а)

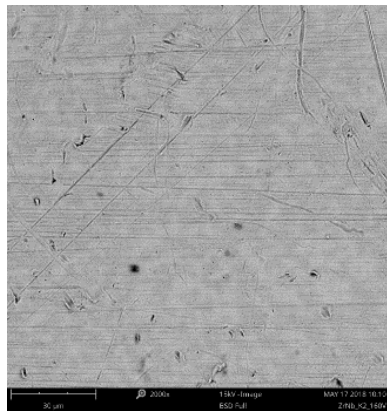


(б)

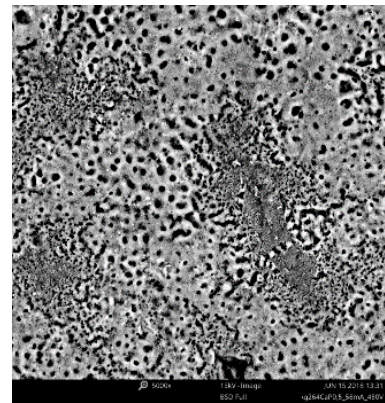
Рисунок 3.1 – SEM-зображення (а) та спектри EDX (б) AgNP

Поверхня сплаву зразків ZrNb, що модифікувалися за допомогою процесу ПЕО, була досить гладкою, після шліфування залишилися деякі шорсткі ділянки (рис. 3.2 а). Після процесу ПЕО в електроліті, що містить наночастинки срібла, на сплаві ZrNb (рис. 3.2 б) можна спостерігати мезопористий шар з розмірами пор від 200 нм до 70 мкм. Поверхня не є однорідною, з плямами оксидного шару, з великими порами та острівцями субмікро- та нанопор. У середині великих пор ми можемо спостерігати нанопористі структури, які можуть служити додатковими ділянками для адгезії клітин. Є докази того, що мезопористі структури можуть забезпечити

ефективну остеointegraцію клітин та діяти як бар'єр для бактеріальної адгезії. [34]. На поверхні сплаву ZrNb після процесу ПЕО видно частинки срібла (світлі плями; рис. 3.2 б). Аналіз EDX (рис. 3.3 а) підтвердив наявність Ca, P та O в оксидному шарі на поверхні зразків ZrNb. Пікові показники срібла також добре видно в спектрах EDX.

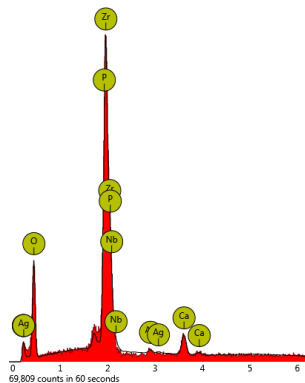


(a)

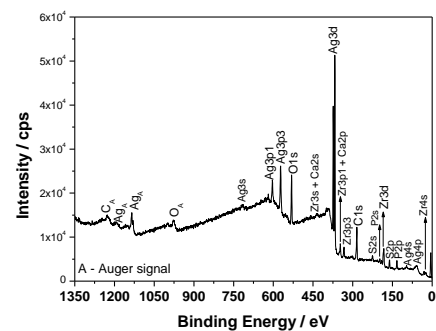


(б)

Рисунок 3.2 – SEM-зображення поверхні сплаву ZrNb до (а) та після (б) процесу ПЕО



(a)



(б)

Рисунок 3.3 – Спектри EDX (а) та XPS (б) поверхні сплаву ZrNb після ПЕО-процесу

Для оцінки хімічного складу поверхні отриманих покриттів проводили XPS-дослідження. Вимірені енергії зв'язку основних електронів дають велику кількість інформації про властивості атомів у твердих тілах. На малюнку 7б показаний спектр обстеження XPS для поверхні сплаву ZrNb

після ПЕО в електроліті, що містить наночастинки Ag. Ідентифіковані характерні сигнали XPS для конкретних елементів, які присвоюються Ag3d, Ag3p, Ag3s, Ag4s, Ag4p, Zr3d, Zr3p, Zr4s, O1s, C1s, P2p, P2s, S2p, S2s, Ca2p, піки показників Ca2s та Ag MNN, O KLL та C KVV Auger. Nb не виявлено в аналізованому шарі, де основними компонентами є сполуки срібла: оксид срібла (367,6 eV) та сульфід (368,5 eV). Спектр високої роздільної здатності піку Ag3d після деконволюції представлений на рисунку 3.4 а, зі спіно-орбітними відділеннями $\Delta = 6,0$ eV. Подальший аналіз XPS показав наявність піків, розташованих при 182,8 eV та 185,2 eV, що відповідають Zr3d5/2 та Zr3d3/2 відповідно в ZrO₂. Сигнали фосфору P_{2p} віднесли до фосфатних груп з енергією зв'язку 133,4 eV. У цьому випадку записаний сигнал для Ca_{2p} збігається з піком Zr3p1/2. Ретельний аналіз діапазону енергії зв'язку від ~ 330 до ~ 355 eV призвів до визначення Ca, як показано на рисунку 3.4 б.

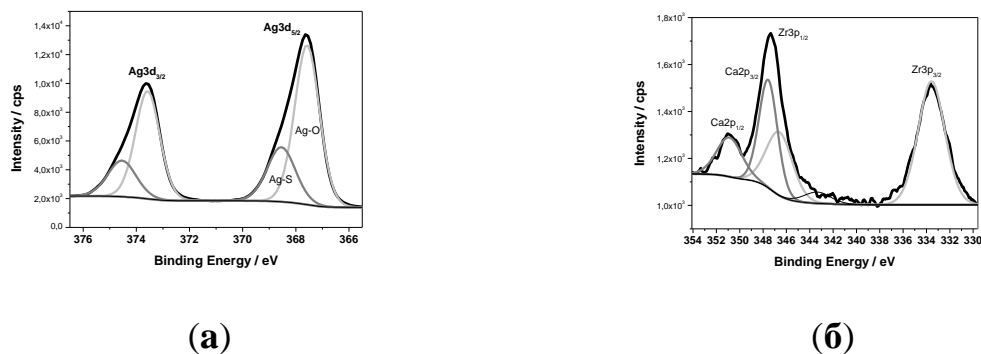


Рисунок 3.4 – Спектр XPS високої роздільної здатності піків Ag3d (а), Ca2p та Zr3p (б)

Вимірний діапазон деконволюціонували на чотири піки: 333,6, 346,6, 347,6 та 350,9 eV відповідно. Перший і другий піки були пов'язані з Zr3p, спіно-орбітними відділеннями $\Delta = 13,0$ eV. Третій та четвертий пікові сигнали були віднесені до фосфатних сполук кальцію ($\Delta = 3,55$ eV). Дані XPS підтвердили, що ПЕО в електроліті, що містить наночастинки Ag, утворювало покриття, котре складається із суміші оксиду цирконію та фосфатів кальцію, збагачених сполуками срібла, а саме оксидом та сульфідом.

На рисунку 3.5 представлена концентрація відібраних іонів, що виділяються з покриттів у розчин Рінгера через 2, 4 та 6 тижнів. Покриття, утворене на сплавi ZrNb, виділяло вибрані іони, такі як кальцій, фосфор і срібло, в рідину (розчин Рінгера). Були виявлені іони на основі субстрату, такі як ніобій та цирконій, однак їх концентрація була нижче $0,01 \text{ мг/л}^{-1}$. Також необхідно відмітити, що спотстерігаються зміни в концентрації іонів кальцію, особливо після шести тижнів занурення модифікованого зразка. Концентрація кальцію значно збільшилась до цього часу до $93,30 \text{ мг/л}^{-1}$. Протягом 2-4 тижнів занурення зразка в розчині Рінгера, концентрація кальцію залишалася такою ж, як і концентрація фосфору та іонів срібла. Дослідження показали, що модифіковані зразки біологічноактивні в розчині Рінгера; однак концентрації іонів фосфору та срібла суттєво не змінювались протягом 6 тижнів занурення.

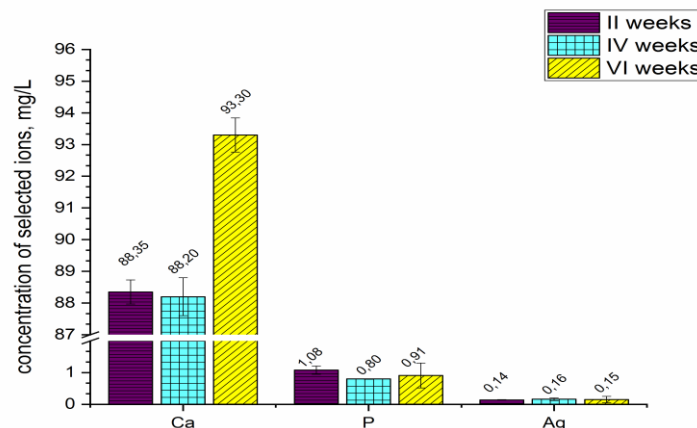


Рисунок 3.5 – Концентрація іонів, що виділяються із анодованого сплаву ZrNb в розчин Рінгера. Концентрації Zr та Nb були нижче $0,01 \text{ мг/л}^{-1}$

Бактеріологічне дослідження підтвердило адгезію та проліферацію *S. aureus* під час 24-годинного експерименту. Через 2 години поверхня, модифікована ПЕО, мала на 30 % менше адгезованих бактерій, ніж у контрольних (лише полірування) зразків, з невеликим зниженням рівня мікроорганізмів протягом 4 годин (рис. 3.6 а). Не модифікована поверхня виявляла значну бактеріальну проліферацію в усі терміни часу, досягаючи 8 Log 10 CFU через 24 години. Наявність AgNP на поверхні зразків

перешкоджає росту бактерій. Так кінцеве число *S. aureus* не перевищувало 6 log CFU через 24 години. Відомо, що AgNP можуть вивільняти іони Ag^+ , які порушують цілісність бактеріальної стінки шляхом реакції з клітинною мембраною [35]. Постійне вивільнення іонів срібла може захистити поверхню імплантату від бактеріального зараження після імплантації.

В адгезії остеобластів не було суттєвої різниці між модифікованою (з наночастинками Ag) та контрольною (відполірованою) поверхнею через 1 день після початку культивування клітин (рис. 3.6 б). Значна проліферація клітин ($p \geq 0.01$) спостерігалася на обох поверхнях через 3 дні, без достовірної різниці між групами. Через сім днів після висіву, кількість клітин на модифікованій поверхні з наночастинками срібла залишалась на тому ж рівні, що й через 3 доби культивування. В той час як на контрольній поверхні ми спостерігали значно знижений рівень активованого резазурину.

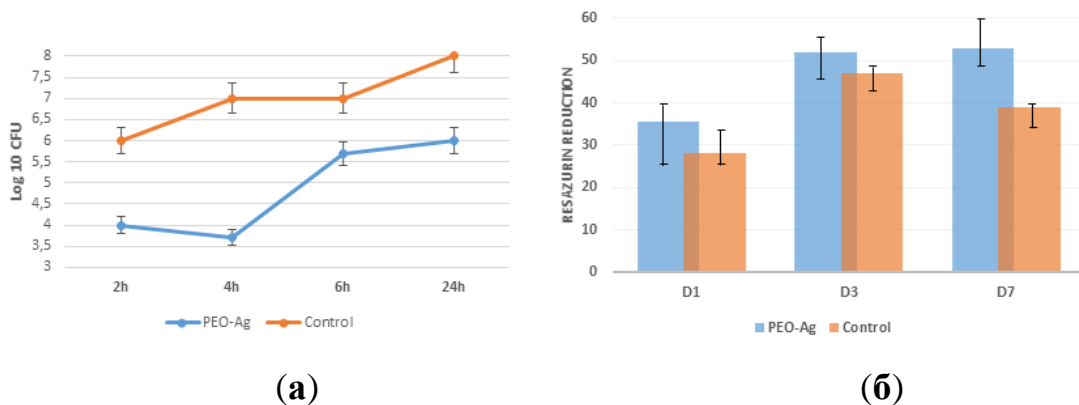


Рисунок 3.6 – Адгезія бактерій протягом 24 год (а), а також адгезія та проліферація остеобластів на 7-му добу (б) на поверхні з ПЕО порівняно з контрольними зразками

Отже, отримані дані доводять, що порівняно з контролем, мезопориста поверхня зразків ZrNb, модифікованих шляхом плазмової електрооксидзації за умов збагачення електроліту наночастинками срібла, забезпечує кращі умови для адгезії та проліферації клітин і може бути використана як основа для посиленої остеоінтеграції.

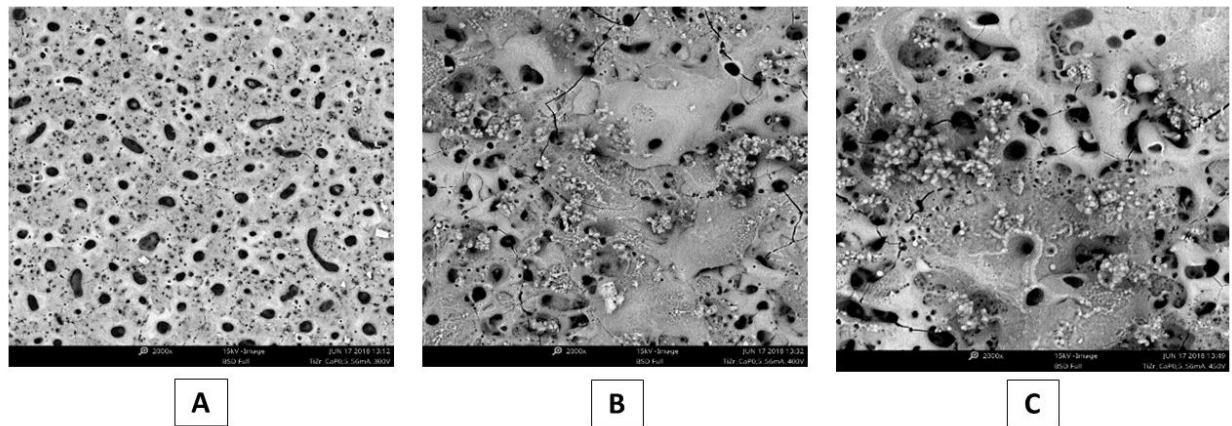
3.2 Плазмова електрооксидация (ПЕО) зразків TiZr

3.2.1. SEM з EDX

Використання ПЕО для модифікації поверхні зразків TiZr призводить до утворення твердого оксидного шару зі структурою, що залежить від напруги електричного струму.

Режим TiZr-300 вольт забезпечує формування круглих, випадковим чином розподілених пор діаметром від 1 до 5 мкм. Численні тріщини починаються від великих пор і поширюються на дрібні, що може бути фактором низької стійкості оксидного шару до фізіологічних розчинів. Підвищення напруги призводить до утворення мезопористих структур з великими плоскими впадинами (діаметром 30-70 мкм) та пористими взаємопов'язаними між собою пагорбами між ними. Розмір пор варіюється від 5 до 30 мкм, що є найбільш оптимальним для адгезії клітин. Великі пори з плоским дном мають менші пори по всій площі, при чому кристали Ca-P покривають більшість із них. Взаємопов'язані тріщини, виявлені на керамічній поверхні після режиму TiZr-400, та їх кількість і розмір значно зменшилися зі збільшенням напруги до 450 вольт.

SEM був обладнаний інтегрованим енергетично-дисперсійним рентгенівським спектрометром (EDX), який був використаний для отримання елементарного складу плівок. Таблиця розподілу елементів (рис. 3.7) демонструє відносні зміни концентрації елементів на поверхні оксидного шару. На модифікованій поверхні було виявлено начтупні елементи: кисень, титан та цирконій з невеликою кількістю Cl. Ми не включали кисень у розрахунок через занадто малу атомну масу цього елемента для кількісного визначення його за допомогою EDX.



Atomic percentage			
	300V	400V	450V
Ca	47,96±5.2	49,29±2.1	47,93±12.5
P	40,63±9.9	43,66±8.8	42,03±5.9
Ti	5,13±1.4	3,84±1.3	4,02±1.1
Zr	4,62±2.1	3,21±0.6	3,84±1.5
Cl	0,90±0.3		2,18±0.6
I	0,75±0.4		

Ca/P atomic ratios of PEO coating			
Ca/P	300V	400V	450V
	1,18	1,13	1,14

Рисунок 3.7 – Зображення SEM та EDX зразків TiZr після ПЕО в розчині 0,5 М Ca (H₂PO₂)₂ із режимом напруги 300 В (А), 400 В (В) і 450 В (С). EDX атомного співвідношення керамічного шару та часток Ca та P

За даними, кальцій включається в структуру поверхні набагато простіше, ніж фосфор. Різниця кількості інкорпорації фосфору та кальцію не мала значної різниці при збільшенні напруги. Крім того, в результаті появи оксидного шару, було виявлено менше цирконію та титану. При цьому необхідно зазначити, що елементарний склад поверхні тісно пов'язаний з рівнем напруги електричного струму. Склад електролітів був обраний для досягнення атомних співвідношень Ca/P 1,67 як атомного співвідношення стехіометричної НАР концентрації. При цьому на поверхні модифікованого сплаву за допомогою EDX не виявлено складової Nb.

3.2.2. SBF тест

Експеримент з simulated body fluid (SBF) використовується як біоміметичний тест на рівень мінералізації поверхонь. Розчин SBF містить іони в аналогічних концентраціях, що й у плазмі крові. Також всі умови експерименту наближені до біологічних з точки зору температури, тиску та рівня рН. Апатит, що утворюється на поверхні субстрату, за хімічним

складом і властивостями матеріалу (кристалічність і швидкість розчинення) нагадує мінерал кісток.

Покриття з ПЕО можуть виділяти іони, такі як кальцій. Ці вивільнені іонів сприяють зародженню та подальшій мінералізації поверхні, утворюючи таким чином апатит, що за складом подібний до людських кісток.

Утворення мінералів регулюється поверхневими характеристиками матеріалів та параметрами експерименту, такими як склад SBF, міцність іонних зв'язків, рівень рН, температура та експозиція.

Апатитний шар формуються на всій поверхні зразків. Це може залежати від подібного елементарного складу покриттів. При чому площа апатиту залежить від тривалості занурення. Результати скануючої електронної мікроскопії модифікованих зразків в залежності від тривалості експерименту (рис. 3.8).

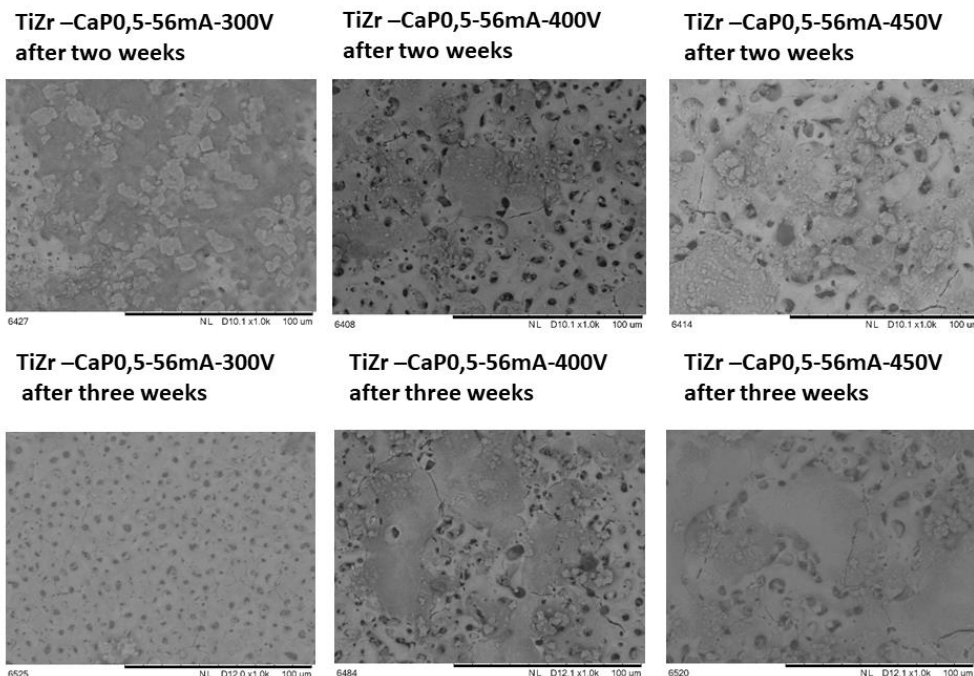


Рисунок 3.8 – SEM зображення зразків TiZr після 2 та 3 тижнів тесту на SBF

3.2.3 Культура клітин

Поверхні зразків модифікованих за різних параметрів напруги електричного струму показали біосумісність, а також здатність до адгезії та проліферації остеобластів. Немає суттєвих відмінностей у прикріпленні клітин у 1-й день між зразками TiZr-300 та TiZr-400, проте остеобласти набагато краще фіксуються до поверхні TiZr-450 ($p \leq 0,05$). У період з 1 по 3 день культивування, спостерігається значна проліферація клітин до 60 % на зразках TiZr-300 та 78 % - TiZr-450 відповідно. Клітинна проліферація сповільнюється з 3 та 7 день спостереження на зразках TiZr-300 та TiZr-400, що може свідчити про проблемність тривалої проліферації остеобластів. В іншому випадку на поверхні TiZr-450 клітини активно проліферують до 99 % ($p \leq 0,01$) за числовими даними резаурину. Слід зазначити, що адгезія остеобластів на поверхні зразків TiZr-400 та TiZr-450 значно вища порівняно з контролем TCP як на 3, так і на 7 день спостереження (рис. 3.9).

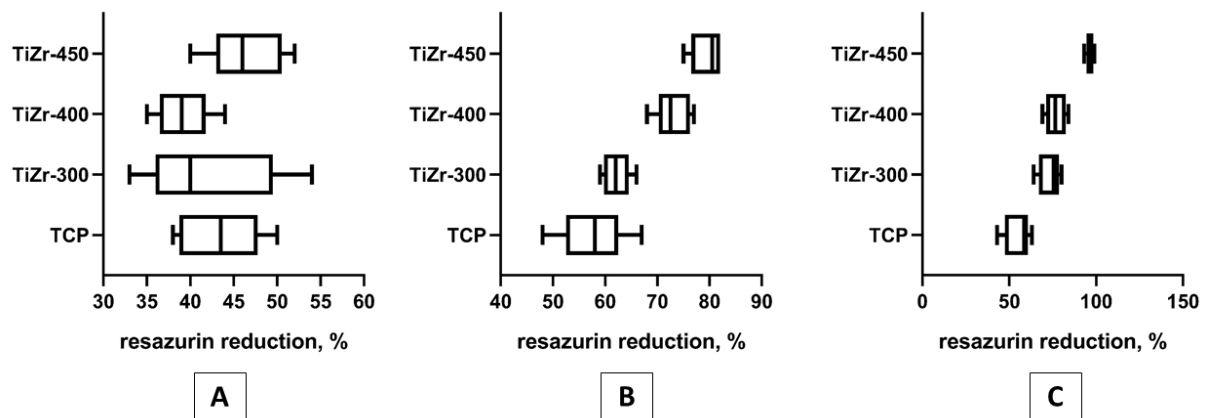


Рисунок 3.9 – Показники адгезії остеобластів експериментальних та контрольних TCP зразків на 1 (A), 3 (B) та 7 день (C)

3.2.4. Тест на адгезію бактерій

Відповідно до бактеріологічного дослідження після 2-годинної інкубації на поверхні модифікованих TiZr зразків при показниках напруги електричного струму в 450 вольт числові показники адгезії мікроорганізмів значно менші, в порівнянні з іншими режимами напруги – 300 і 400 вольт відповідно. Залежність адгезії *S. Aureus* від режиму плазмової електрооксидзації наведені на рисунку 3.10.

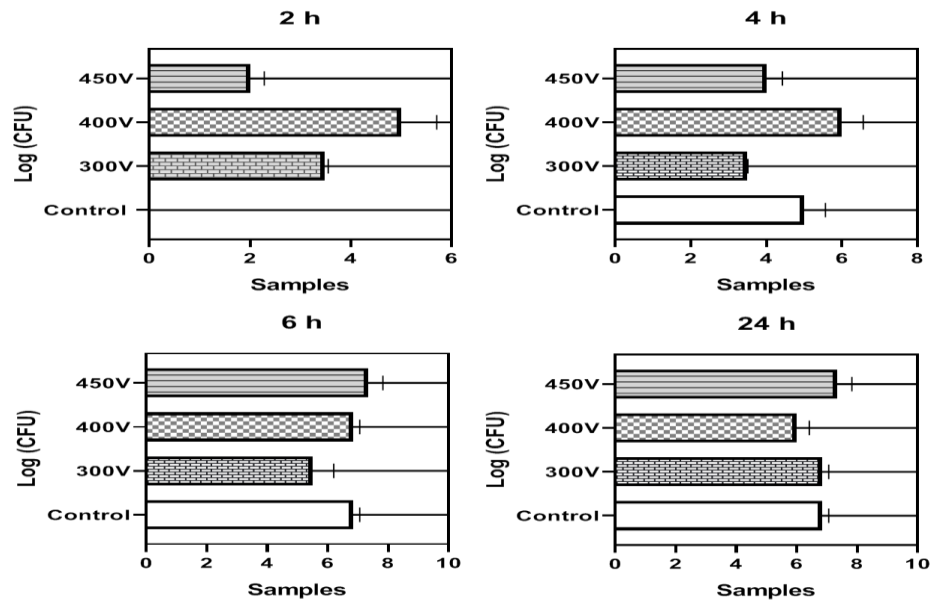


Рисунок 3.10 – Кількість приєднаних бактерій на поверхнях зразків TiZr протягом 24 год інкубації

Таким чином, кількість прилипаючих бактерій на поверхні TiZr зразків при показниках напруги струму в 450 вольт, було в 2 рази менше через 2 години і на 30 % менше через 4 години в порівнянні з показниками отриманими за умов режиму анодизації в 400 вольт відповідно. Але через 6 та 24 години імплантати модифіковані при 450 В втрачають набуті антиадгезивні властивості, а кількість бактерій на їх поверхні перевищує 7 log CFU.

Зразки оброблені ПЕО при 300 вольтах зберігають стабільну швидкість адгезії через 2 та 4 години. При цьому демонструють мінімальний рівень кількості бактерій в 5 log₁₀ CFU, але тривала протягом інкубація 24 годин призводить до інтенсивного приєднання бактерій аж до 7,6 log₁₀ CFU.

Необхідно відмітити збалансованість показників на поверхні зразків TiZr – 400 вольт, адже вони були майже однаковими протягом усього експерименту (від 5 log₁₀ CFU до 6,6 log₁₀ CFU).

Тривале спільне культивування протягом 24 годин призводить до втрати антиадгезивних властивостей, адже всі імплантати демонструють майже однакові показники адгезії мікроорганізмів, що коливаються від 6 до 7,6 log₁₀ CFU.

3.3 Плазмова електрооксидация зразків TiZr з наночастинками оксиду цинку

3.3.1. SEM, EDX and CA

Після плазмової електрооксидациї на поверхні TiZr зразків з'являються канавки неправильної форми та круглі пори (рис. 3.11 В). Поздовжній розмір канавок варіюється від $23\pm 4,3$ до $105\pm 15,7$ мкм. Розмір пор коливається від $1,3\pm 0,5$ до $11,4\pm 3,8$ мікрметрів відповідно. Також можна всередині великих канавок можна побачити мікропори, які повністю покривають їх дно і бічні стінки. Таким чином, модифікація поверхні зразків шляхом ПЕО у складному розчині з ZnONPs забезпечує утворення мезопористих структур, що можуть сприяти адгезії клітин.

EDX дослідження підтверджує утворення оксидного шару, що містить як сплавні елементи Ti і Zr, так і іони з розчину ПЕО (рис. 3.11 С). Масова концентрація Ca, P і Zn відповідає 9,92, 17,2 і 24,88 мас. % відповідно. Висока концентрація Zn може бути токсичною для клітин та потребує додаткових досліджень в експерименті з культурою клітин.

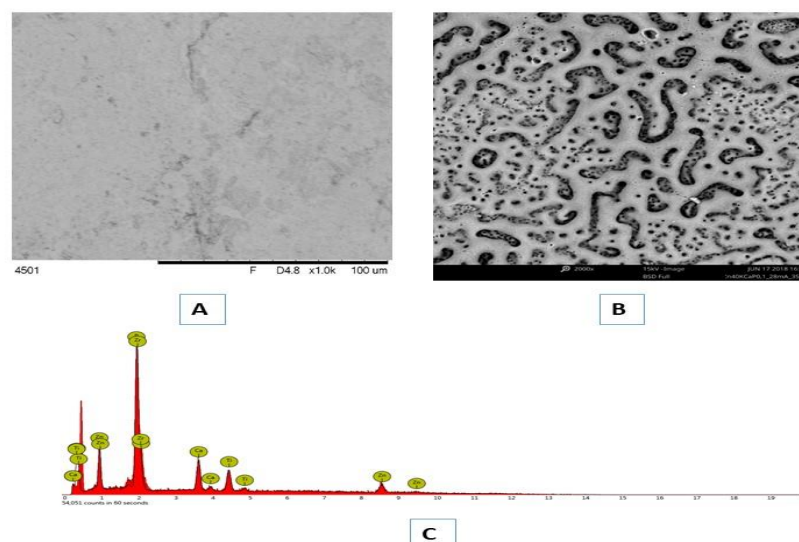


Рисунок 3.11 – SEM зразків TiZr до (А) та після (В) ПЕО з ZnONPs зі спектрами ЕДР модифікованої поверхні (С).

Контактний кут модифікованої поверхні зразків з TiZr після ПЕО становив $58,2\pm 17,6$, що суттєво нижче в порівнянні з контрольними

показниками ($78,9 \pm 6,9$). Дані показники свідчать про достатню гідрофільність поверхні та повинні забезпечувати сприятливе середовище для адсорбції білка в перші хвилини після імплантації.

3.3.2 Оцінка біоактивності

Тест занурення в SBF показав осадження кальцій-фосфату з другого тижня експерименту (рис. 3.12 А). Через три тижні після початку експерименту вся поверхня модифікованих зразків покрита Са-Р (рис. 3.12 В). Через 4 тижні можна побачити початок появи тріщин, що ймовірно, відбувається в результаті перевантаження Са-Р оксидного шару на модифікованій поверхні TiZr зразків (рис. 3.12 С). Адсорбція Са і Р виявила високу біосумісність щойно отриманої поверхні. Крім того, висока спорідненість до Са та Р повинна бути перевагою після імплантації та може сприяти утворенню апатиту на поверхні імплантата.

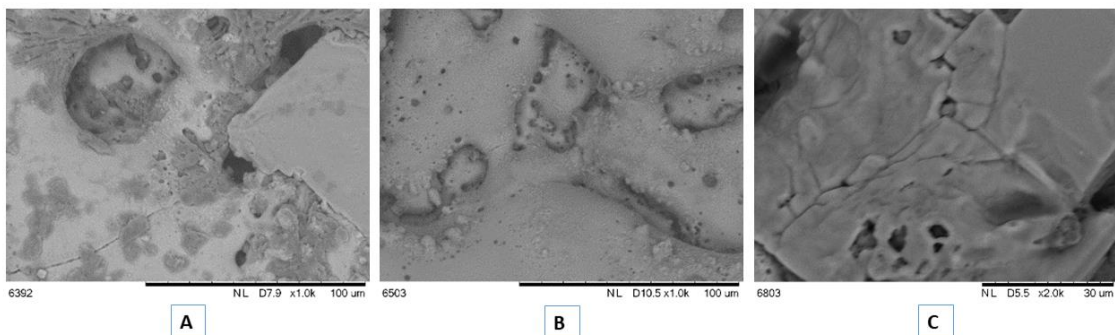


Рисунок 3.12 – СЕМ-зображення модифікованої поверхні TiZr після 2 (А), 3 (В) та 4 (С) тижнів занурення в розчин SBF

3.3.3 Культура клітин

На 1 день після посіву адгезія клітин (остеобластів людини) на поверхні TiZr зразків модифікованих ПЕО, була значно нижчою ($p \leq 0,01$) порівняно з контрольними показниками ($40,6 \pm 7,4$ % проти $54,3 \pm 3,2$ %). Але наступний етап культивування показав достатній прогрес проліферації клітин на 3 та 7 добу, порівняно з контрольними зразками, де на 3 день відмічається зменшення кількості клітин. В останній термін кількість остеобластів на

модифікованій поверхні, була значно вищою (рис. 3.13 А). На 7-й день спостереження не зважаючи на високу концентрацію Zn після плазмової електрооксидації, на поверхні не виявлено клітинної токсичності, а навпаки присутні ознаки стимуляції проліферації остеобластів.

3.3.4 Мікробіологічне дослідження

Бактеріологічне дослідження підтвердило адгезію та проліферацію *S. aureus* під час 24-годинного експерименту (рис. 3.13 В). Через 2 години інкубації поверхня модифікована ПЕО мала однакову концентрацію бактерій порівняно з контрольною (полірований ZrNb імплантат). Але через 4 години експерименту рівень мікроорганізмів на експериментальних зразках залишився стабільним. У той час як концентрація бактерій на поверхні контрольних імплантатах показала значну проліферацію протягом усього часу до 8 Log₁₀ CFU за 24 години. Отже, наявність наночастинок оксиду цинку негативно впливає на процес адгезії *S. aureus* та може стримувати розмноження бактеріальних клітин на поверхні імплантату.

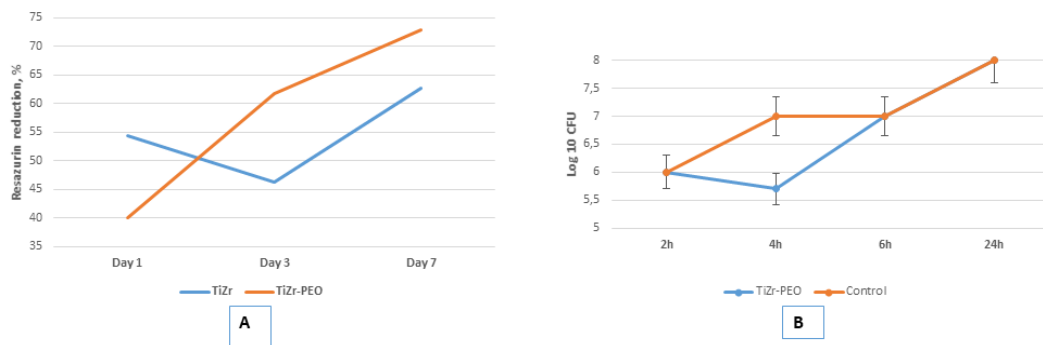


Рисунок 3.13 – Зниження резазурину протягом 7 днів культивування клітин остеобластів людини (А) та адгезії клітинних клітин бактерій протягом 24 годин спільного культивування (В)

ВИСНОВКИ

Модифікація металевих імплантатів на базі сплавів ZrNb (Zr – 2,5 мас. % Nb) та титано-цирконієвих систем (Zr60Nb21Ti19) в розчинах на основі кальцій гіпофосфату забезпечує створення оксидного шару, з мезопористою морфологією поверхні. При цьому спостерігаються неоднорідні, хаотично розташовані включення: пори, кратери та овальні впадини з плоским дном, розмір яких в більшості комбінацій залежить від параметрів сили та напруги електричного струму, що в свою чергу дає можливість контролю в процесі створення нових експериментальних імплантатів. Майже в усіх випадках морфологія поверхні модифікованих зразків відмічається наявністю тріщин новоствореного оксидного шару, що може свідчити про не високу стійкість до біологічноактивних розчинів. Великі пори з плоским дном мають менші пори по всій площі, розмір яких варіюється від 5 до 30 мкм, при чому кристали кальцію гіпофосфату покривають більшість із них, що є найбільш оптимальним для адгезії клітин остеобластів.

Всі типи експериментальних поверхонь за рахунок новоствореної мезопористою структури, в порівнянні з контрольними зразками характеризуються як більш сприятливі для адгезії та проліферації клітин

(остеобластів людини). При цьому, необхідно зазначити, що збагачення електролітів наночастинками срібла та оксиду цинку, дозволяє отримати модифіковану поверхню, що не є цитотоксичною та не перешкоджає подальшій проліферації клітин остеобластів. Нова поверхня повинна бути перспективною для виготовлення медичних імплантатів.

Ряд бактеріологічних досліджень показав позитивну динаміку відносно адгезії грампозитивних бактерій (*S. aureus*, штам В 918) на модифікованих поверхнях в порівнянні з контрольними зразками. При цьому, необхідно зауважити, що поява наночастин оксиду цинку на поверхні оксидного шару новостворених зразків, модифікованих за допомогою плазмової електрооксидзації, призводить до ще нижчих показників бактеріальної контамінації. Крім того, отримана поверхня з наночастинками срібла запобігає адгезії бактерій у перші 6 годин після занурення в суспензію збудника, що може бути ефективним підходом для запобігання інфекційних ускладнень після імплантації.

Отже, модифікація поверхні металевих зразків за допомогою плазмової електрооксидзації з урахуванням можливості використання наночастин срібла та оксиду цинку, відкриває перспективний напрямок біомедичних досліджень, з метою створення універсальних покриттів для медичного застосування.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Radha R. and Sreekanth D. Insight of magnesium alloys and composites for orthopedic implant applications – a review. *Journal of Magnesium and Alloys*. 2017, vol. 5, no. 3, 286–312. DOI: 10.1016/j.jma.2017.08.003
2. Xue-Nan Gu, Yu-Feng Zheng. A review on magnesium alloys as biodegradable materials. *Frontiers of Materials Science in China*. 2010, vol. 4, issue 2, 111–115. DOI: 10.1007/s11706-010-0024-1
3. White, L.; Koo, Y.; Neralla, S.; Sankar, J.; Yun, Y. Enhanced mechanical properties and increased corrosion resistance of a biodegradable magnesium alloy by plasma electrolytic oxidation (PEO). *Mater. Sci. Eng. B Solid. State. Mater. Adv. Technol.* 2016, 208, 39-46.
4. Colombo, A.P.V.; Tanner, A.C.R. The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective. *J. Dent. Res.* 2019, 98 (4), 373-385.
5. Zhang, P.; Zhang, Z.; Li, W. Antibacterial Coating Incorporating Silver Nanoparticles by Microarc Oxidation and Ion Implantation. *J. Nanomater.* 2012, 2013, Article ID 542878.
6. Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomaterialia*. 2010;(6):1680-92.
7. Agarwal S, Curtin J, Duffy B, Jaiswal S. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Materials Science and Engineering*. 2016;68(1):948–9639. doi: 10.1016/j.msec.2016.06.020
8. Fagali NS, Grilloa CA, Puntarulo S, Fernández Lorenzo de Mele MA: Cytotoxicity of corrosion products of degradable Fe-based stents: Relevance of pH and insoluble products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128, 480–488 (2015)
9. Moravej M, Mantovani D: Biodegradable metals for cardiovascular stent

application: interests and new opportunities. *Int J Mol Sci.* 12(7), 4250-4270 (2011)

10. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM: Coronary stents: A materials perspective. *Biomaterials* 28, 1689–1710 (2007)

11. Peuster M, Wohlsein P, Brugmann M, Ehlerding M, Seidler K, Fink C, Brauer H, Fischer A, Hausdorf G: A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6–18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart* 86, 563–569 (2001)

12. Purnama A, Hermawan H, Couet J, Mantovani D: Assessing the biocompatibility of degradable metallic materials: state-of-the-art and focus on the potential of genetic regulation. *Acta Biomater* 6, 1800–1807 (2010)

13. Kubásek J, Vojtěch D, Jablonská E, Pospíšilová I, Lipov J, Ruml T: Structure, mechanical characteristics and in vitro degradation, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of novel biodegradable Zn-Mg alloys. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 58, 24-35 (2016)

14. Murni NS, Dambatta MS, Yeap SK, Froemming GR, Hermawan H: Cytotoxicity evaluation of biodegradable Zn-3Mg alloy toward normal human osteoblast cells. *Materials Science and Engineering: C* 49, 560-566 (2015)

15. Sanchez AH, Luthringer BJ, Feyerabend F, Willumeit R: Mg and Mg alloys: How comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review. *Acta Biomater* 13, 16– 31 (2015)

16. Liu C, Xin Y, Tang G, Chu PK: Influence of heat treatment on degradation behavior of bio-degradable die-cast AZ63 magnesium alloy in simulated body fluid. *Mater Sci Eng A* 456, 350–357 (2007),

17. Wang Y, Liu G, Fan Z: A new heat treatment procedure for rheo-diecast AZ91D magnesium alloy. *Scripta Mater* 54, 903–908 (2006)

18. Zeng R, Zhang J, Huang W, Dietzel W, Kainer KU, Blawert C, et al.: Review of studies on corrosion of magnesium alloys. *T Nonferr Metal Soc* 16 (2), 763–771 (2006)

19. Youwen Y, Ping W, Qiyuan W, Hong W, Yong L, Youwen D, Yuanzhuo Z and Cijun S. The enhancement of Mg corrosion resistance by alloying Mn and laser-melting. *Materials*. 2016;9(216):1-10
20. Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3557-63
21. Long Li, Ming Zhang, Ye Li, Jie Zhao, Ling Qin and Yuxiao Lai. Corrosion and biocompatibility improvement of magnesium-based alloys as bone implant materials: a review. *Regenerative Biomaterials*. 2017, vol. 4, issue 2, 129–137. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx004>
22. Dong H. Surface engineering of light alloys: aluminiummagnesium and titanium alloys. Elsevier, 2010.
23. Hai-Lan W, Ying-Liang C, Ling-Ling L, et al. The anodization of ZK60 magnesium alloy in alkaline solution containing silicate and the corrosion properties of the anodized films. 2007; 253: 9387–9394
24. Liu Y, Yang F, Zhang Z, et al. Plasma electrolytic oxidation of AZ91D magnesium alloy in biosafety electrolyte for the surgical implant purpose. *Russ J Electrochem* 2013; 49: 987–993
25. Stojadinovi_c S, Vasili_c R, Petkovi_c M, et al. Characterization of the plasma electrolytic oxidation of titanium in sodium metasilicate. *Appl Surf Sci* 2013; 265: 226–233
26. Zhang RF, Zhang SF, Shen YL, et al. Applied surface science influence of sodium borate concentration on properties of anodic coatings obtained by micro arc oxidation on magnesium alloys. *Appl Surf Sci* 2012; 258: 6602–6610
27. Sreekanth D, Rameshbabu N and Venkateswarlu K. Effect of various additives on morphology and corrosion behavior of ceramic coatings developed on AZ31 magnesium alloy by plasma electrolytic oxidation. *Ceram Int* 2012; 38: 4607–4615.]
28. S. Durdu, M. Usta, A.S. Berkem, Bioactive coatings on Ti6Al4V alloy formed by plasma electrolytic oxidation, *Surf. Coat. Technol.* 301 (2016) 85-93.

29. Pereira BL et al. Niobium treated by Plasma Electrolytic Oxidation with calcium and phosphorus electrolytes. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018; 77:347-352

30. Colombo, A.P.V.; Tanner, A.C.R. The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective. *J. Dent. Res.* 2019, 98 (4), 373-385.

31. Zhang, P.; Zhang, Z.; Li, W. Antibacterial Coating Incorporating Silver Nanoparticles by Microarc Oxidation and Ion Implantation. *J. Nanomater.* 2012, 2013, Article ID 542878.

32. van Hengel, I.A.J.; Riool, M.; Fratila-Apachitei, L.E.; Witte-Bouma, J.; Farrell, E.; Zadpoor, A.A.; Zaat, S.A.J.; Apachitei, I. Selective laser melting porous metallic implants with immobilized silver nanoparticles kill and prevent biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials.* 2017, 140, 1-15.

33. Hye, J.H.; Taekyung, Y.; Woo-Sik, K.; Sang, H.I. Highly reproducible polyol synthesis for silver nanocubes. *Journal of Crystal Growth.* 2017, 469, 48-53.

34. Mohandas, A.; Krishnan, A.G.; Biswas, R.; Menon, D.; Nair, M.B. Antibacterial and cytocompatible nanotextured Ti surface incorporating silver via single step hydrothermal processing. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017, 75, 115-124.

35. Hye, J.H.; Taekyung, Y.; Woo-Sik, K.; Sang, H.I. Highly reproducible polyol synthesis for silver nanocubes. *Journal of Crystal Growth.* 2017, 469, 48-53.