

УДК 621.795.3; 667.6; 666.29; 678.026.3 617.3; 616-089.23; 616-001; 615.477.2; 616-089.28/.29 617.3; 616-089.23; 616-001; 615.477.2; 616-089.28/.29 621.795.3; 667.6; 666.29; 678.026.3

УКПП

№ держреєстрації 0119U100823

Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ (СумДУ)

40007, м. Суми, вул.Римського-Корсакова, 2 тел. (0542)33-53-39 факс (0542)33-40-58

e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

д-р фіз.-мат.наук, професор

\_\_\_\_\_ А.М. Черноус

**ЗВІТ**

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**БІОЛОГІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ ПЛАЗМОВОЇ  
ЕЛЕКТРООКСИДАЦІЇ ТА ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ДЕПОЗИЦІЇ ДЛЯ СТВОРЕННЯ  
ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ПОВЕРХНІ ІМПЛАНТІВ**

(проміжний)

Керівник НДР,  
д-р.мед.наук, професор

М.В. Погорєлов

2020

Рукопис закінчено 16 грудня 2020 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 23 грудня  
2020 р. № 6

**СПИСОК АВТОРІВ**

Керівник НДР, Заступник директора з наукової роботи МІ СумДУ д.мед.н., професор	(16.12.2020)	М.В. Погорелов (реферат; вступ; висновки)
Відповідальний виконавець Старш. наук. співроб. к.мед.н.	(16.12.2020)	В.В. Корнієнко (розділи 1, 2)
Старш. наук. співроб. к.м.н.	(16.12.2020)	О.М. Олешко (розділ 3)
Студент	(16.12.2020)	А.Ф. Юсупова (розділ 1)
Студент	(16.12.2020)	І. В. Любчак (розділ 1)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 72 с., 9 табл., 21 рис., 79 джерел  
ПЛАЗМОВА ЕЛЕКТРООКСИДАЦІЯ, МЕТАЛЕВІ ІМПЛАНТАТИ, ТЕРМІЧНЕ  
ОСАДЖЕННЯ, ГІДРОКСИАПАТИТНЕ ПОКРИТТЯ, ВИРОБЛЕННЯ  
КОЛАГЕНУ

*Об'єкт дослідження* – процеси остеоінтеграції металевих імплантатів.

*Предмет дослідження* – вивчення функціоналізованої біоактивної поверхні імплантатів, які отримані із застосуванням фосфору (Р), кальцію (Са) та етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) в електролітному розчині для плазмового електролітичного окислення (РЕО) на зразках титану і встановлення механізмів взаємодії поверхні з клітинами остеобластичного диферону.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні завдання:

- провести дослідження для встановлення складу розчину РЕО-електролітів, що містить Са і Р;
- отримати тверде, пористе, біоактивне покриття поверхонь на зразках титану, що сприятиме подальшому розумінню процесу РЕО і побудові комплексної моделі його механізмів;
- дослідити фізико-хімічних та структурних характеристик поверхні імплантатів;
- визначити рівні адгезії, проліферації та метаболізму клітин при культивуванні на імплантатах з функціоналізованою поверхнею;
- комплексне узагальнення результатів дослідження щодо можливості створення імплантатів з покращеними остеоінтеграційними властивостями.

В результаті виконання роботи отримані режими проведення та композиції розчинів, що містять Р та Са в поєднанні з хелатоутворюючим агентом ЕДТА в електролітному розчині для РЕО, що забезпечує оптимальні умови для отримання функціонального біоактивного покриття на зразках титану для виготовлення зубних/кісткових імплантатів.

## ЗМІСТ

	С.
Перелік скорочень, умовних позначок, одиниць і термінів .....	6
ВСТУП .....	7
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	8
2 ВПЛИВ КАЛЬЦІЮ ТА ФОСФОРУ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КЕРАМІЧНИХ ПОКРИТТІВ НА ТИТАНОВИХ ЗУБНИХ ІМПЛАНТАХ, ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ РЕО .....	10
2.1 Матеріали і методи .....	10
2.1.1 Матеріали .....	10
2.1.2 РЕО .....	10
2.1.3 Вимірювання гідрофільності .....	11
2.1.4 Випробування твердості та міцності .....	11
2.1.5 Скануюча електронна мікроскопія (SEM) .....	12
2.1.6 Вимірювання шорсткості поверхні .....	12
2.1.7 Дифракція рентгенівських променів (XRD) .....	12
2.1.8 Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS) .....	13
2.1.9 Аналіз електрохімічної корозійної стійкості .....	13
2.1.10 Інкубація в розчині Рінгера .....	15
2.1.11 Спектроскопія Raman .....	15
2.1.12 Аналіз біоактивності у модельованій рідині організму (SBF) ...	15
2.1.13 Аналіз цитотоксичності .....	16
2.1.14 Дослідження адгезії бактерій .....	17
2.1.15 Статистичний аналіз .....	18
2.2 Результати.....	18
2.2.1 Напруга проти струму як функція часу.....	18
2.2.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM).....	19
2.2.3 3D-реконструкція та аналіз EDX.....	21
2.2.4 Аналіз поперечних зрізів.....	22

2.2.5	Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS) .....	23
2.2.6	Спектроскопія Raman .....	25
2.2.7	Дифракція рентгенівських променів (XRD).....	27
2.2.8	Шорсткість і гідрофільність поверхонь РЕО.....	27
2.2.9	Випробування твердості та міцності .....	28
2.2.10	Стійкість до електрохімічної корозії.....	29
2.2.11	Довгостроковий аналіз корозійної стійкості (у розчині Рінгера).33	
2.2.12	Аналіз біоактивності у модельованій рідині організму (SBF).....	34
2.2.13	Аналіз цитотоксичності .....	37
2.2.14	Дослідження адгезії бактерій.....	38
2.3	Обговорення.....	40
3 ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ТА ОСАДЖЕННЯ КОЛАГЕНУ НА ГІДРОКСИАПАТИТНИХ ПОКРИТТЯХ, СТВОРЕНИХ НА ПОПЕРЕДНЬО ОБРОБЛЕНИХ СУБСТРАТАХ.....		46
3.1	Матеріали та методи.....	46
3.1.1	Синтез гідроксиapatиту.....	46
3.1.2	Нанесення гідроксиapatитних покриттів.....	46
3.1.3	Характеристика матеріалів.....	48
3.1.4	Вимірювання контактного кута.....	49
3.1.5	Вимірювання шорсткості поверхні.....	50
3.1.6	Експерименти на культурі клітин.....	50
3.1.7	Аналіз продукції колагену.....	51
3.2	Результати.....	52
3.2.1	Характеристика матеріалів.....	52
3.2.2	Вимірювання змочування та шорсткості поверхні.....	57
3.2.3	Експерименти на культурі клітин.....	58
3.2.4	Аналіз продукції колагену.....	61
3.3	Обговорення.....	62
ВИСНОВКИ.....		64
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....		65

## ПЕРЕІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

Ti – титан

PEO – плазмове електролітичне окислення

Ca – кальцій

P – фосфор

EDTA – етилендіамінтетраоцтовою кислотою

HA – гідроксиапатиту

ZrO<sub>2</sub> – діоксид цирконію

SiC – карбїду кремнію

SEM – скануюча електронна мікроскопія

XRD – дифракція рентгенівських променів

XPS – рентгенівська фотоелектронна спектроскопія

EIS – електрохімічна імпедансна спектроскопія

PDP – потенціодинамічна поляризація

EEC – електричні еквівалентні схеми

ICP-AES – індуктивно зв'язана плазмова атомно-емісійна спектрометрія

SBF – simulated body fluid

FBS – фетальна бичача сироватка

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

CPE – елементи постійної фази

ТНП – термічно нанесених покриттів

РСА – рентгеноструктурний аналіз

КК – крайовий кут

β-ТКФ – β-трикальцій фосфата

## ВСТУП

З моменту створення декілька десятиліть тому процедури заміщення втрати зубів штучними зубними імплантатами, титан (Ti) все ще залишається матеріалом вибору для їх виготовлення. Ti виявився інертним, неімуногенним та біосумісним. Технології створення зубних імплантів дозволили стати їм звичним, високонадійним та передбачуваним варіантом лікування. Проте, як і раніше, існує потреба у подальших вдосконаленнях, особливо для конкретних груп пацієнтів. Нещодавно плазмове електролітичне окислення (PEO) стало перспективною технікою модифікації металевих поверхонь шляхом нанесення оксидно-керамічних покриттів з відповідними фізичними, хімічними та біологічними характеристиками. На сьогоднішній день, незважаючи на загальне розуміння процесів, що лежать в основі PEO, не існує комплексної моделі механізмів PEO.

## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Штучні кісткові/зубні імплантати стали корисним та надійним стандартним варіантом лікування втрати зубів, а також відновлення дефектів кісток [1-3]. Більшість імплантатів сьогодні виготовляються з використанням титану та його сплавів. Інші матеріали, включаючи неметалеві керамічні імплантати, з використанням цирконія (діоксид цирконію,  $ZrO_2$ ), також є перспективними. Проте на цей час не вистачає даних, що підтверджують успішність їх використання [4, 5]. Титан - це інертний, біосумісний, легкий і механічно стійкий метал, високостійкий до корозії в агресивних середовищах, включаючи умови, що переважають в організмі людини. Він має дуже високе відношення ваги до сили і, як правило, не є імуногенним [6]. Основними факторами, що визначають стабільність імплантату, є 1) рівень остеоінтеграції, тобто здатність встановлювати прямі тверді контакти кісткових клітин з поверхнею імплантатів [7] та 2) здатність поверхні імплантанта протистояти бактеріальній колонізації та утворенню біоплівки [8]. Іншим важливим фактором є підтримка контакту кістки з імплантатом протягом довгого часу після операції без інтенсивної втрати кісткової тканини [9]. Деякі захворювання, такі як гіпертонія та діабет, негативно впливають на успіх імплантації зубів [10]. Успішне тривале використання імплантатів за таких складних умов вимагає ретельних підходів до модифікації їх поверхонь [11]. Піскоструминна обробка, кислотне травлення, гідрофільні текстури поверхні, анодування та інші підходи використовувались для поліпшення топографії поверхні та збільшення термінів імплантації титанових імплантатів [12].

Плазмове електролітичне окислення (PEO) стало методом вибору для нанесення твердих, міцних та функціональних покриттів на металеві поверхні [13, 14]. Процес PEO є подібним до анодування, з різницею у використанні напруги, достатньо високої, щоб пробити діелектричний бар'єр оксидного шару та розпочати динамічний процес для формування відносно товстих, твердих і пористих поверхневих оксидних шарів. Основними факторами, що визначають



успіх РЕО, є напруга, щільність струму та вміст електроліту. Для успішної остеоінтеграції поверхневі шари повинні бути нетоксичними, неімуногенними, стійкими до корозії та біосумісними. Крім того, для поверхні імплантату важливо мати оптимальну кількість гідроксиapatиту, головного мінерального компоненту кісткової тканини [15]. На сьогодні не існує всебічного розуміння процесу РЕО на різних субстратах за різних умов, і не побудована вичерпна математична модель його механізму, яка могла б пояснити перетворення електричної енергії в хімічну в процесі РЕО [16]. Різні компоненти електроліту можуть впливати на утворення оксидних шарів і осадження бажаних компонентів. Електроліти, що містять кальцій і фосфор, використовувались для обробки зразків металів РЕО [17] та для включення таких елементів, а саме Ca і P, в біоактивні покриття [18].

Сплав Ti-6Al-4V є широко використовуваним імплантаційним матеріалом завдяки його біосумісності та відмінним механічним властивостям [19]. Однак виділення іонів металів у фізіологічне середовище та відсутність остеокондуктивності все ще є великою проблемою [20]. Отже поверхня імпланта повинна бути оброблена для підвищення стійкості до корозії та біоактивності, утворенням кальцій фосфатних покриттів [21]. Гідроксиapatит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  є основним мінеральним компонентом кісткової тканини [22], і клінічні дослідження довели, що імпланти кульшового суглоба з ГА покриттям показують надзвичайно високі показники остеоінтеграції (понад 95% за десять років спостереження) [23, 24]. ГА зубні імпланти показали рівень остеоінтеграції від 79 до 96% за вісім років спостереження [25]. Для отримання гідроксиapatиту слід застосовувати різні види методик покриття: золь-гель [26], магнетронне розпилення [27], осадження імпульсним лазером [28], електрофоретичне осадження [29], електрохімічне осадження [30], плазмове напилення [31, 32]. Деякі з цих методів створюють покриття зі слабкою адгезією до металічної основи, тріщинами, деградацією при довгостроковій імплантації, а також потребують великих температур для синтезу, тривалого часу обробки та мають високу вартість [33].

## **2 ВПЛИВ КАЛЬЦІЮ ТА ФОСФОРУ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КЕРАМІЧНИХ ПОКРИТТІВ НА ТИТАНОВИХ ЗУБНИХ ІМПЛАНТАХ, ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ РЕО**

### **2.1 Матеріали і методи**

#### **2.1.1 Матеріали**

Комерційно доступний чистий титан (клас 4; IWET, Kleosin, Польща) був використаний для приготування експериментальних зразків розміром 4 мм в довжину та 10 мм у діаметрі. Перед процесом РЕО зразки піддавали піскоструминній обробці з використанням карбіду кремнію (SiC), розміром 400, 600 та 800 зернистості. Потім зразки знежирювали в ізопропанолі в ультразвуковій ванні протягом 3 хвилин. Етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), гідроксид кальцію ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), калію дигідрофосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) та формиат кальцію ( $\text{Ca}(\text{HCOO})_2$ ) були отримані з Chemia-Łódź, Лодзь, Польща.

#### **2.1.2 РЕО**

Зразки Ti піддавали РЕО з використанням високовольтного джерела живлення KIKUSIU PWR800H (Японія), який керувався за допомогою ПК із програмним забезпеченням Wavy. Першим етапом дослідження було реєстрація кривих  $(U, i) = f(t)$ , у розчинах різних композицій, як показано в таблиці 1. Реєстрацію проводили при трьох різних фіксованих заданих щільностях струму: 50, 100 та 150  $\text{mA cm}^{-2}$ . Обробка РЕО була здійснена за допомогою гальваностатичного анодування постійного струму до граничної напруги. Після того, як технологічна напруга досягла граничної напруги, обробку проводили в потенціостатичному режимі. Зразок Ti служив анодом, а титанова сітка - катодом. Кожного разу тривалість процесу становила 5 хвилин. Розчин електроліту (200 мл) під час процесу витримували при 15 °C і постійно перемішували за допомогою магнітної мішалки. Після процесу анодування зразки промивали в проточній воді DEMI (18  $\text{M}\Omega\text{-cm}$ , Simplicity Water

Purification Systems, Milipore SAS, Molsheim, France), сушили на повітрі та упаковували.

Підготовлені вище тестові зразки використовувались для подальших експериментів і були позначені наступним чином: Ti-X-Y-Z, де: X = номер розчину; Y = анодна напруга; і Z = щільність струму. Наприклад, зразок Ti-1-450-150 був анодований в електролітному розчині №1, з кінцевою напругою 450 В і щільністю струму 150 мА см<sup>-2</sup>.

Таблиця 2.1 – Перелік електролітних компонентів (Моль л<sup>-1</sup>)

Електроліт	ЕДТА	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	Са(ОН) <sub>2</sub>	Са(НСОО) <sub>2</sub>	рН
1	0.017	0.006	0.023		3.73
2	0.034	0.012	0.046		3.82
3	0.017	0.006		0.013	3.18
4	0.034	0.012		0.026	3.24

### 2.1.3 Вимірювання гідрофільності

Кут контакту між зразком і краплею води вказує на рівень гідрофільності поверхні. Біосумісні поверхні мають бути гідрофільними. Кут контакту нижче 90° означає, що поверхня гідрофільна (змочувана). Кут контакту вимірювали, як описано [34], використовуючи системи вимірювання оптичного контактного кута та аналіз контуру ОСА 15 ЕС (Data Physics, Філдерштадт, Німеччина) та дистильовану воду.

### 2.1.4 Випробування твердості та міцності

Адгезію оксидного шару, нанесеного на поверхню підкладки Ti під час РЕО, та його механічну стійкість оцінювали використовуючи відкриту платформу, оснащену CSM Micro-Combi-Tester, як описано [35, 36]. Випробування полягало у створенні тріщини за допомогою проникаючого пристрою, алмазного конуса Rockwell, поступово збільшуючи силу навантаження. Критична сила, яка є мірою адгезії, є найменшою силою, яка спричиняє втрату адгезії покриття до основи. Для оцінки значення критичної сили використовували силу тертя та коефіцієнт тертя, а також мікроскопічні

спостереження, зроблені за допомогою оптичного мікроскопа, який є невід'ємною частиною платформи. Випробування проводились із збільшенням сили навантаження від  $0,03 \div 25$  N та наступними робочими параметрами: швидкість завантаження  $10$  Н хв<sup>-2</sup>, швидкість ходу столу  $1,0$  мм хв<sup>-2</sup>, довжина подряпини  $2,5$  мм.

### **2.1.5 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)**

Використовували тривимірні візуалізацію та енергетично-дисперсійний рентгенівський аналіз (EDX). Для попередньої оцінки морфології поверхні використовували скануючу електронну мікроскопію (Hitachi S-3400N, Токіо, Японія, прискорювальна напруга  $15$  кВ). 3D-реконструкція та SEM-дослідження вибраних зразків проводились за допомогою скануючого електронного мікроскопа Phenom ProX (прискорювальна напруга  $15$  кВ). Хімічний склад поверхневого шару аналізували за допомогою енергетично-дисперсійної рентгенівської спектроскопії (EDX, PhenomProX). Поперечний переріз використовували для оцінки товщини шару покриття РЕО, утвореного на підкладці зразків Ti, як описано [21]. Розмір пір розраховували за допомогою програмного забезпечення Image J [37].

### **2.1.6 Вимірювання шорсткості поверхні**

Шорсткість поверхонь досліджуваного матеріалу, підготовлених методом РЕО, визначали за допомогою профілометра SurfTest SJ-301 (Мітутіойо, Японія).

### **2.1.7 Дифракція рентгенівських променів (XRD)**

Всі експерименти проводились із використанням дифрактометра X'Pert Philips PW 3040/60, що працював при  $30$  мА та  $40$  кВ, оснащеного вертикальним кутоміром та Ейлеровою люлькою. Картина дифракції рентгенівських променів була зареєстрована в області  $2\theta$ :  $10$ - $140$  ° з використанням випромінювання  $\text{CuK}\alpha_{1,2}$  ( $\lambda_{\text{CuK}\alpha 1} = 1.54056$  Å і  $\lambda_{\text{CuK}\alpha 2} = 1.54443$  Å) для кута  $\alpha$  -  $0,25$  градусів.

Використовувалися малі кути падіння ( $\alpha$ ) для падаючого рентгенівського променя, таким чином він використовується для вивчення поверхневих шарів, оскільки проникнення пучка обмежене. Відстані вираховувались в нанометрах. Кут падіння  $\alpha$  фіксований, так що ступінь проникнення рентгенівськими променями у зразок залишається постійною протягом усього вимірювання. При низьких  $\alpha$ -кутах падіння рентгенівські промені проникають лише у найповерхневіші шари зразка.

### **2.1.8 Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS)**

XPS-аналіз дозволяє охарактеризувати хімічний склад та хімічний стан підготовлених зразків. Для цього використовували спектрометр PHI 5000 VersaProbe (ULVAC-PHI). Спектри XPS збуджувались, використовуючи в якості джерела монохроматичне випромінювання  $Al_K$  ( $h = 1486.6$  eV, 25 W). Спектри обстеження та високої роздільної здатності збирали за допомогою напівсферичного аналізатора при постійних енергіях проходу 117,4 та 23,5 eV відповідно. Фон коригували за допомогою інтелектуальної моделі для отримання інтенсивності сигналу XPS. Для процедури деконволюції використовували асиметричну функцію Гауса/Лоренца за постійного співвідношення  $G/L = 0,35$ . Визначені положення піків були скореговані щодо придатного вуглецю  $C_{1s}$  при 284,8 eV. Для обробки даних було використано програмне забезпечення для хімічного аналізу поверхні Advantage (ThermoFisher Scientific, версія 5.9911).

### **2.1.9 Аналіз електрохімічної корозійної стійкості**

Здатність поверхонь РЕО протистояти корозії досліджували за допомогою електрохімічних методів. Для цього зразки монтували на плоску корозійну камеру (250 мл, Bio-logic, Франція) з корозійним середовищем (розчин Рінгера зі складом:  $8,6$  г  $dm^{-3}$  NaCl,  $0,3$  г  $dm^{-3}$  KCl та  $0,48$  г  $dm^{-3}$   $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ; Fresenius Kabi, Польща) при  $37$  °C через ущільнювальне кільце з відкритою поверхнею  $0,283$

см<sup>2</sup>. Розчин Рінгера витримували в інкубаторі при  $37,0 \pm 0,5$  °C перед тестуванням, щоб уникнути осадження бульбашок газу при нагріванні в їдкій комірці до температури вимірювання. Триелектродну конфігурацію використовували з електродом порівняння (насичений каломельний електрод - SCE з капіляром Haber-Luggin) та зустрічним електродом (платина). Експерименти проводились із використанням потенціостата-гальваностату PARSTAT 4000A (Ametek, Princeton Applied Research – Solartron, США – Великобританія). Експериментальна процедура та збір даних здійснювались за допомогою програмного забезпечення VersaStudio версії 2.60.6. Процедура вимірювання включала наступні етапи:

- 1) стабілізація потенціалу розімкнутого контуру (ЕОС) протягом 1 год;
- 2) електрохімічна імпедансна спектроскопія (EIS) при середньоквадратичній амплітуді 10 мВ, в діапазоні частот  $39\ 810 \div 0,01$  Гц і 5 балів на декаду (експеримент тривав  $35 \div 45$  хв);

- 3) два експерименти з потенціодинамічної поляризації (PDP) після короткого періоду стабілізації (5 хв), які включають поляризацію короткого діапазону при  $\pm 40$  мВ проти ЕОС, з метою отримання лінійного опору поляризації (LPR) зразка, при швидкості сканування  $1\ \text{мВ хв}^{-1}$  та поляризацію на великій відстані при  $\pm 250$  мВ, щоб отримати інформацію про наявність областей Тафеля та щільності струму пасивації, зі швидкістю сканування  $10\ \text{мВ хв}^{-1}$ .

Далі EIS були додатково проаналізовані за допомогою складного програмного забезпечення для встановлення найменших квадратів з нелінійною регресією (ZSimpWin, вер. 3.60, Ametek, США) з використанням відповідних електричних еквівалентних схем (ЕЕС) як математичних моделей досліджуваних електрохімічних інтерфейсів.

### 2.1.10 Інкубація в розчині Рінгера

Анодовані зразки занурювали в розчини Рінгера на термін до 12 тижнів. Вміст фосфору і титану в розчинах Рінгера після тесту визначали за допомогою індуктивно зв'язаної плазмової атомно-емісійної спектроскопії (ICP-AES) через кожні 2 тижні від моменту занурення зразка. Був використаний спектрометр Varian 710-ES, оснащений небулайзером OneNeb. Параметри були такими: ВЧ потужність 1,0 кВт, витрата плазми 15 л хв<sup>-1</sup>, допоміжний потік 1,5 л хв<sup>-1</sup>, тиск небулайзера 210 кПа, швидкість насоса 15 об/хв, лінії викидів P:  $\lambda = 213,618$ , Ti:  $\lambda = 328,068$  і  $338,289$  нм. Калібрувальна крива була підготовлена на основі стандартних розчинів фосфору та титану в концентрації 1 мг мл<sup>-1</sup> та 10 мг мл<sup>-1</sup> у розчині Рінгера, що постачаються фірмою Merck Millipore, Німеччина.

### 2.1.11 Спектроскопія Raman

Дослідження було виконано на мікроскопі inVia Renishaw Raman, обладнаному - детектором із використанням зеленого (514 нм) лазерного збудження. Сканування проводили на великому діапазоні (100–350000 см<sup>-1</sup>). Всі вимірювання проводили в геометрії зворотного розсіювання, використовуючи об'єктив 50× мікроскопа з числовим значенням діафрагми 0,75, забезпечуючи площі розсіювання приблизно 1 мкм<sup>2</sup>. Одноточкові спектри реєстрували з роздільною здатністю 4 см<sup>-1</sup> та часом накопичення 30 с.

### 2.1.12 Аналіз біоактивності у модельованій рідині організму (SBF)

Потенційну біоактивність зразків аналізували за стандартною процедурою в імітованій рідині тіла. Анодовані зразки занурювали в SBF, приготований, як описано [38]. Один зразок занурювали в 25 мл розчину SBF, який замінювали кожні 3 дні протягом 4 тижнів. Зразки струшували при 60 об / хв при 37 ° С. Морфологію зразків аналізували через 1, 2, 3 та 4 тижні занурення за допомогою

скануючого електронного мікроскопа (Hitachi, TM-3000, прискорювальна напруга = 15 кВ, стан BSE). Для зразкового зразка був проведений аналіз EDX (PhenomProX; прискорювальна напруга = 15 кВ).

### **2.1.13 Аналізи цитотоксичності зразків та життєздатності клітин**

Зразки стерилізували в автоклаві при 121 °С протягом 1 години і поміщали в 24-лункові планшети. Кожну лунку заповнювали 20% фетальною бичачою сироваткою (FBS; Invitrogen,) у Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, кат. № 11960) і залишали на ніч у клітинному інкубаторі. Ця процедура була виконана для імітації адгезії білка до поверхні імплантату після імплантації. На наступний день розчин FBS видалили і 2 мл DMEM доповнили 10% FBS, 2 мМоль L-глутаміну (Invitrogen, кат. № 25030), 0,1 мМоль 2-меркаптоетанолу (Sigma, кат. № M7522), 50 одиниць на мл<sup>-1</sup> пеніциліну та 50 г мл<sup>-1</sup> стрептоміцину (Invitrogen, кат. № 15070) у кожну лунку. Остеобласти щурів (отримані з колекції клітин Сумського державного університету) у кількості 10<sup>5</sup> клітин засівали на верхню поверхню кожного зразка та інкубували при 37 °С у зволоженому середовищі з 5% CO<sub>2</sub>. Поживне середовище змінювали кожні 3 дні протягом 7-денного періоду. Всі експерименти проводились у трьох повторах. Застосовували такі контролі: культура клітин з клітинами без зразка, контрольний зразок - немодифікований відшліфований зразок Ti.

Аналіз редукції резазурину використовували для оцінки життєздатності клітин та швидкості проліферації на 1, 3 та 7 день після клітинного засіву. Середовище видаляли з кожної лунки і двічі промивали PBS. 1 мл середовища з 15 мкг/мл резазурину додавали в кожну лунку та інкубували протягом 4 годин у клітинному інкубаторі. Потім з кожної лунки відбирали три аликвоти по 200 мкл середовища з резазурином, і вимірювали абсорбцію при 570 та 595 нм довжині хвилі у спектрофотометрі (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific). Життєздатність клітин, виражена у відсотках різниці між клітинами зі зразком PEO та контрольними клітинами, розраховували за формулою для



вимірювання цитотоксичності або проліферації за допомогою AlamarBlue методу спектрофотометрії (BioRad):  $((O2 \times A1) - (O1 \times A2)) / ((O2 \times P1) - (O1 \times P2)) \times 100$ , де O1 - молярний коефіцієнт екстинкції (E) окисленого резазурину при 570 нм (80586), O2 - E окисленого резазурину при 595 нм (117216), A1 - поглинання дослідних лунок при 570 нм, A2 - поглинання дослідних лунок при 595 нм, P1 - поглинання позитивної контрольної лунки (клітини плюс резазурин при відсутності досліджуваного зразка) при 570 нм, P2 - поглинання позитивної контрольної лунки при 595 нм.

Для отримання інформації про адгезію та розподіл клітин на 7-й день над поверхнею імплантату зразки фіксували 2,5% глутаровим альдегідом і піддавали осмієвому покриттю протягом 1 год, потім тричі промивали 0,1М какодилатним буфером. Потім зразки зневоднювали у зростаючих концентраціях етанолу (70-100%), напилювали золото і досліджували методом SEM (JEOL JSM 5410).

#### **2.1.14 Дослідження адгезії бактерій**

Суспензію культури золотистого стафілокока (B 918), отриману з Національної колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології та вірусології НАНУ, Київ, Україна), готували у концентрації  $10^8$  у поживному середовищі за шкалою McFarland за допомогою денситометра DEN-1B ( Biosan SIA, Латвія) і кінцеву концентрацію мікроорганізмів доводили до  $10^5$  КУО/мл. Необроблені зразки з покриттям Ti (контроль) та PEO оброблені зразки поміщали в стерильні 24-лункові планшети з полістиролу та заливали 2,0 мл суспензії бактерій. Після інкубації при 37 °C протягом 2, 4, 6 та 24 годин зразки тричі промивали стерильним розчином хлориду натрію, щоб видалити всі бактеріальні клітини, не прикріплені до поверхні досліджуваних зразків. Згодом зразки поміщали окремо в пробірку, з 1,0 мл стерильного сольового розчину, і піддавали ультразвуковій обробці (B3500S-MT, Branson Ultrasonics Co., Шанхай, Китай) протягом 1 хвилини для відкріплення бактерій з поверхонь зразків. Потім 10 мкл

отриманої суспензії висівали на поживний агар для підрахунку загальної кількості бактерій після інкубації при 37 °С протягом 24 годин.

### 2.1.15 Статистичний аналіз

Для аналізу даних використовували односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA). Всі тести проводились у трьох повторах для кожного терміну дослідження. Дані були виражені як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення. Статистичне значення було позначено зірочками, де \* означає  $p \leq 0,05$ , \*\* -  $p \leq 0,01$  та \*\*\* -  $p \leq 0,001$ .

## 2.2 Результати

### 2.2.1 Напруга проти струму як функція часу

Аналіз кривих  $(U, i) = f(t)$  показує, що РЕО-процес  $Ti$  у ваннах, що містять комбінацію комплексоутворювача (ЕДТА) та гідроксиду кальцію, не дав бажаних результатів (дані не наведені). Криві вказують на нестабільний процес, і встановлена кінцева напруга не була досягнута протягом 5 хвилин. Збільшення часу процесу також не дало задовільних результатів, оскільки напруга була дуже низькою. Результати були однаковими, незалежно від використовуваної солі кальцію (гідроксиду кальцію або формиату кальцію) як джерела іонів кальцію (дані не наведені). Як і в попередньому випадку, записані криві були "зубчастими", і напруга не піднімалася до встановленого рівня. Однак додавання  $KH_2PO_4$  як джерела Р у розчин призвело до того, що процес РЕО на зразках  $Ti$  продовжувався. Кожна з кривих для ванн 1-2 і 3-4 виглядала однаково, незалежно від використовуваної щільності струму. На початку процесу напруга лінійно зростала в залежності від щільності струму. Чим вища щільність струму, тим швидше цей процес тривав. Потім, після досягнення напруги пробою оксидної плівки (процес у режимі РЕО), швидкість наростання напруги зменшувалася і втрачала свій лінійний характер. Напруга пробою оксидної плівки залежала

головним чином від хімічного складу використовуваного розчину. На записаних кривих  $(U, i) = f(t)$  є точки перетину, при яких змінюється швидкість зростання напруги. Наявність цих точок зумовлена зміною механізму утворення оксидного шару на  $Ti$ , а також зміною його фізико-хімічних властивостей (товщини, складу). У цей момент процес почав виявляти електричні розряди (іскри) на поверхні  $Ti$ .

Залежно від хімічного складу ванни та щільності струму отримували різні кінцеві напруги. Швидкість досягнення кінцевої напруги залежала від використовуваної щільності струму. Слід зазначити, що напруга близько 500 В була отримана лише з використанням щільності струму  $150 \text{ mA cm}^{-2}$ . Напруга була підібрана таким чином, щоб вона знаходилася в середині заданого діапазону, в якому процес протікав відповідно до одного механізму окислення. В результаті, на основі аналізу кривих  $(U, i) = f(t)$ , для подальших досліджень були обрані конкретні параметри напруги та щільності струму для РЕО на зразках  $Ti$ .

### 2.2.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)

На рисунку 2.1 представлені репрезентативні SEM-зразки титану, піддані РЕО у вибраних розчинах. Вибір параметрів окиснення проводився на основі раніше зареєстрованих кривих  $(U, i) = f(t)$ . Зображення аналізували щодо якості отриманих поверхонь, а також можливого використання в якості цільових покриттів на зубних імплантатах. Такі покриття повинні мати пористу структуру без тріщин.

Електроліт 1: незалежно від використовуваних параметрів, на поверхні титану утворилася відносно тонка оксидна плівка. Про це свідчать подряпини, помітні майже на всіх поверхнях, які є залишками подрібнення зразків. Тільки при 450 і 500 В ( $j = 150 \text{ mA cm}^{-2}$ ) чітко спостерігається утворення пор. Тому зразки  $Ti-1-450-150$  та  $Ti-1-500-150$  були відібрані для подальших досліджень.

Електроліт 2: при напрузі нижче 400 В морфологія поверхні подібна незалежно від використовуваної щільності струму. Покриття РЕО тонке, з невеликою кількістю пор та пікоструминних подряпин. Збільшення напруги до 400 В призвело до утворення більш товстої оксидної плівки та зникнення дрібних подряпин. Видно морфологію пористої поверхні отриманих оксидних плівок, типову для процесу РЕО. В результаті для подальших аналізів були відібрані такі зразки: Ti-2-400-100, Ti-2-400-150, Ti-2-450-100 і Ti-2-500-150. Через подібність структур окисленого зразка при 450 В та двох щільностей струму 100 та 150 мА см<sup>-2</sup> було обрано нижчу щільність струму. Як правило, при меншій щільності струму утворюються більш м'які оксидні плівки, що може призвести до зменшення внутрішнього напруження в оксидному шарі, зменшуючи ймовірність утворення тріщин.

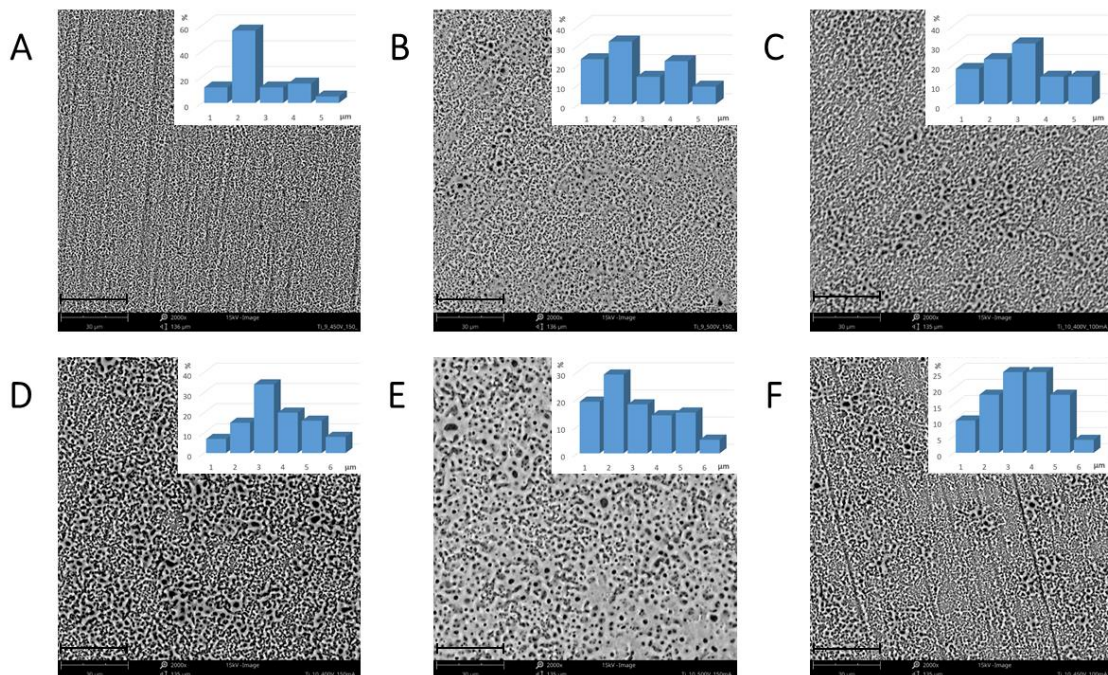


Рисунок 2.1 – Репрезентативні зображення SEM вибраних поверхонь РЕО. Вставки показують розподіл розміру пор у відповідних поверхнях РЕО.

А) зразок Ti-1-450-150; В) зразок Ti-1-500-150; С) зразок Ti-2-400-100; D) зразок Ti-2-400-150; Е) зразок Ti-2-450-100; F) зразок Ti-2-500-150. Збільшення x2000, шкала 30 мкм.

Електроліт 3: незалежно від застосовуваних параметрів обробки зразків, кожна поверхня виглядала дуже схожою. Вироблені покриття здебільшого відображали поверхню титанової підкладки. При більш високих напругах видно покриття з дрібними порами.

Електроліт 4: чітко пористі покриття були отримані лише при використанні щільності струму  $150 \text{ mA cm}^{-2}$  та напруги вище 350 В. Однак отримані покриття нічим не відрізнялися від попередньо вибраних.

Вставки показують розподіл розміру пор у відповідних зразках. Загальною тенденцією було помітне збільшення розміру пор із збільшенням вольт-амперних характеристик. Зразок Ti-1-450-150 має найменші пори, більшість з яких мають розмір близько 2 мкм. З іншого боку, зразок Ti-2-500-150 демонструє класичний розподіл у формі дзвона, де більшість пор мають розмір 3-4 мкм. Розмір пір та їх морфологія відіграють важливу роль у визначенні біологічних властивостей імплантатів та їх поверхонь. Повідомлялося, що біоактивні поверхневі покриття, які мають мікропористу структуру із розміром пор 3-4 мкм у середньому діаметрі, такий самий, як у зразку 2-500-150, проявляють високу остеогенну та ангіогенну активність [39].

У сукупності ці результати дозволяють припустити, що параметри РЕО, що використовуються для отримання поверхневого шару на зразку Ti-2-400-150, забезпечують оптимальні умови для формування покриттів Ti, придатних для виготовлення зубних (кісткових) імплантатів.

### **2.2.3 3D-реконструкція та аналіз EDX**

Шар РЕО на зразку Ti-1-450-150 був збагачений P і Ca (рис. 2.2), компонентами електроліту (піки з низькою інтенсивністю, видимі в спектрі EDX). У зразку Ti-1-500-150 поверхня є більш розвиненою і пористою на основі Ti-1-450-150, а шар оксиду в більшій мірі збагачений компонентами ванни P і Ca. Піки для кисню та титану, компонентів оксидної плівки, також видно в обох зразках.

Шар оксиду на зразку Ti-2-400-100 був значно збагачений компонентами розчину P і Ca. Визначається висока інтенсивність піку фосфору. Збільшення густини струму від 100 до 150 mA cm<sup>-2</sup> явно збільшило вміст кальцію та фосфору в оксидній плівці (зразок Ti-2-400-150). Збільшення напруги до 450 В при щільності 100 mA cm<sup>-2</sup> не призвело до подальшого збільшення вмісту Ca і P в оксидній плівці. Збільшення напруги до 500 В і водночас щільність струму до 150 mA cm<sup>-2</sup> спричинили дуже значний розвиток поверхні титану, а також значне збагачення оксидного шару компонентами ванни. Таким чином, у зразку Ti-2-500-150 шар оксиду був сильно збагачений компонентами ванни P і Ca. У всіх досліджених зразках спектр EDX також показував піки кисню та титану, компонентів оксидної плівки. У сукупності ці результати вказують на те, що протокол РЕО, що використовується для генерування шару оксидного покриття на зразку Ti-2-500-150, може бути використаний для отримання покриттів, високо збагачених Ca і P, складовими гідроксиапатиту; що в свою чергу свідчить про те, що його можна використовувати для отримання покриттів з найбільшою схильністю до остеоінтеграції.

#### **2.2.4 Аналіз поперечних зрізів**

На основі аналізу поперечних зрізів оксидних шарів, отриманих на титані, та їх відображення EDX було встановлено, що незалежно від використовуваних параметрів процесу отримані покриття добре прилипають до основного матеріалу (рис. 2.2). Ми помітили, що відшарування шару іноді спостерігалось лише як артефакт під час підготовки зразків. Товщина покриттів не перевищувала 8 мкм. Найцікавіші результати стосуються картографування оксидних шарів. Цей метод дозволяє визначити розташування вибраних елементів в оксидному шарі. У кожному випадку елементи, що містяться в електролітному розчині (Ca і P), були включені у всю структуру оксидного шару.

## 2.2.5 Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS)

XPS - це дуже чутлива методика дослідження, яка дозволяє точно визначати концентрацію хімічних елементів на поверхні, а також призначати хімічні стани цих елементів. Дослідження XPS показали, що після обробки РЕО поверхня Ті утворює шар, який складається із суміші оксидів та фосфатів. Зразкові спектри зразків Ti-1-450-150 і Ti-2-500-150 після процедури деконволюції, включаючи значення для P2p, Ca2p, C1s, K2p, Ti2p, O1s і N1s, наведені на рисунку 2.3.

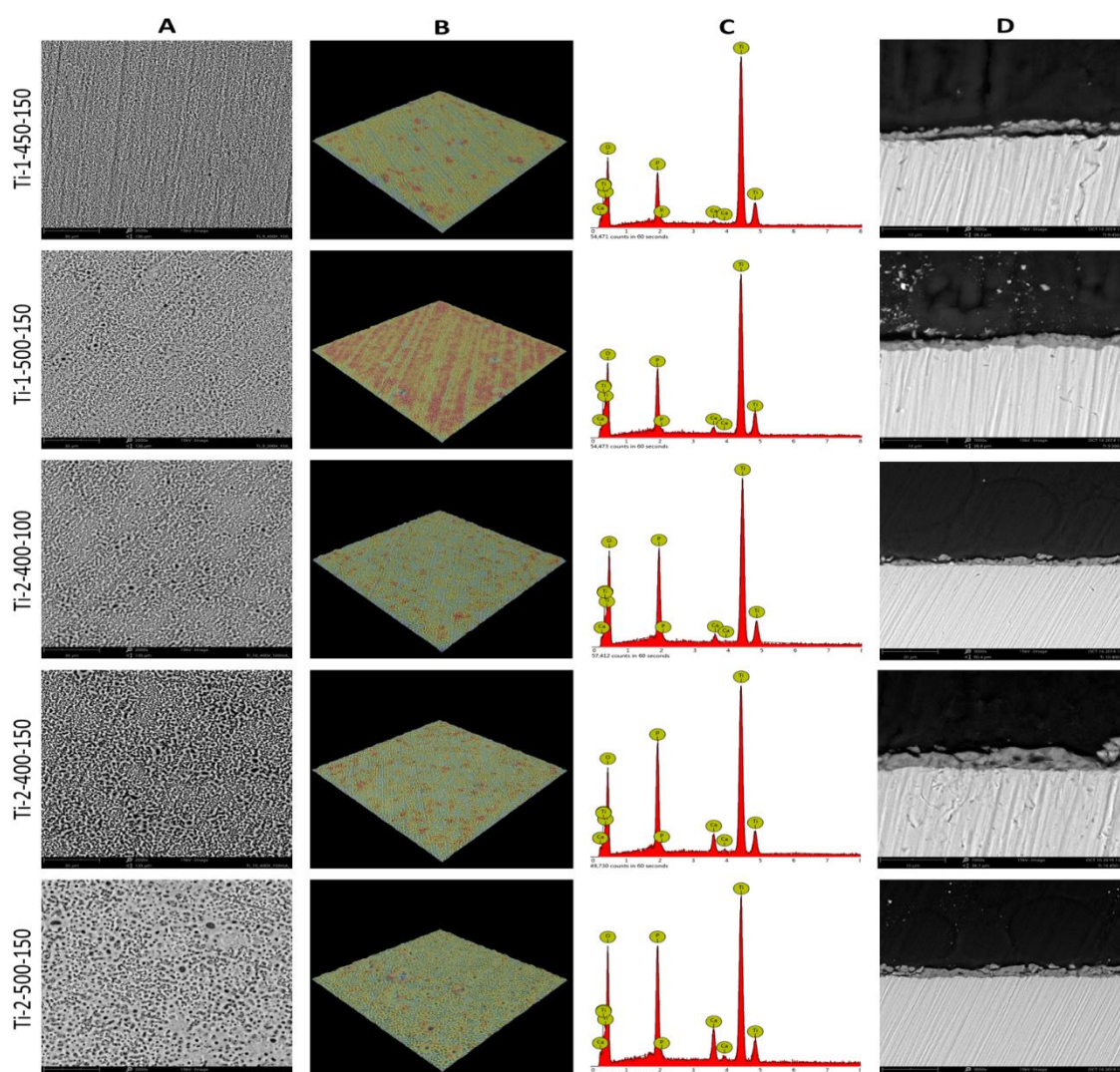


Рисунок 2.2 – А) SEM-зображення зразків Ті, оброблених РЕО, шкала 30 мкм; В) 3D-реконструкції; С) EDX-спектри поверхонь РЕО; D) SEM зображення поперечних зрізів шарів РЕО, шкала 10 мкм

Чотири хімічні стани кисню розділяли в спектрах O1s, записаних для обох зразків. Перший при 531,3 eV або 531,4 eV віднесений до кисню у функціональних групах фосфату кальцію ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), другий стан при BE 530,2 і 530,4 eV може бути віднесений Ti в решітці  $\text{TiO}_2$ , третій а четвертий стан віднесений зв'язкам C = O і CO, другий стан при BE 530,2 і 530,4 eV може бути віднесений Ti в решітці  $\text{TiO}_2$  [40, 41]. XPS-спектри P2p з високою роздільною здатністю показують основний пік при 133,3 і 133,4 eV, що відповідає хімічним станам фосфату кальцію і компонент при більш високих енергіях зв'язку, що, ймовірно, віднесений фосфату водню (134,4 eV,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) [42]. Спектри Ca2p підтверджують наявність фосфату кальцію в шарі, де характерні піки  $\text{Ca}2p_{3/2}$  були виявлені при 347,5 та 347,6 eV. Для зразка Ti-2-500-150 XPS також виявили присутність калію, який асоціювався з групами  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\text{K}2p_{3/2}$  - 292,9 eV) [43]. Репрезентативні піки  $\text{Ti}2p_{3/2}$  при енергії зв'язку 458,8 та 459,1 eV характерні для Ti у структурі  $\text{TiO}_2$  і можуть бути ідентифіковані як  $\text{Ti}^{4+}$ . Хімічні види азоту також були виявлені в спектрах XPS. Два аналогічні хімічні стани азоту були розділені після деконволюції спектрів N1s для досліджуваних зразків. Сигнали при 399,9 і 401,1 eV призначалися аміногрупам (C-NH<sub>2</sub>), тоді як другі при 401,9 eV - амідним групам (C-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Ці висновки також можна побачити в спектрах C1s, де було виділено три стани вуглецю: 284,8 eV (CC), 286,4 - 286,5 eV (CO; CN), 288,8 - 288,9 eV (O = C-OH, NC = O).

Як результат, у всіх випробуваних зразках були виявлені лише елементи, пов'язані з процесом РЕО, що вказує на чистоту використовуваного матеріалу. Домішок не виявлено. Єдиним чужорідним елементом був кремній, який був результатом перенесення в процесі подрібнення зразків. Як і очікувалось, найвища концентрація кисню була зафіксована на поверхні зразків. Його вміст становив 40-60% (табл. 2.2). Кисень в основному містився у формі оксиду титану, але також у фосфатній формі та у сполуках з вуглецем. Кисневі та вуглецеві сполуки отримували головним чином із використовуваного комплексоутворювача (ЕДТА). Вміст фосфору становив 8-14%. P містився лише у фосфатній формі ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), як у фосфаті кальцію та калію. Цей елемент



отримують з електролітної ванни. Ще один важливий елемент, кальцій, був присутній у кожному з досліджуваних зразків. Його вміст становив 0,5-9%. Кальцій знаходився лише у формі фосфату кальцію. Ця сполука утворилася під час анодного окислення титану. Він походить від комплексу Ca-ЕДТА. Калій, інший компонент ванни, дуже погано входить в оксидний шар. Його вміст коливався на рівні 0-0,2%, головним чином у фосфатній формі. Титан із вмістом 10-15% містився переважно у оксидній формі. Важливо, що азот також був виявлений в оксидному шарі. Він походить від комплексу Ca-ЕДТА. Вміст азоту був відносно низьким, не більше 2%, і він був присутнім у формі аміногруп, пов'язаних з вуглецем. Незважаючи на низький вміст, азот може суттєво сприяти поєднанню хімічних факторів, що сприяють біосумісності. У сукупності ці результати дозволяють припустити, що умови РЕО, використовувані для отримання зразка Ti-2-500-150, були достатніми для отримання біологічно активних поверхневих шарів, які сприяють остеоінтеграції.

Таблиця 2.2 – Кількісна оцінка XPS-аналізу поверхонь РЕО

Елемент	Si	P	C	K	Ca	N	Ti	O	Ca/P відношення
Ti-1-450-150	0.8	7.8	39.9	0	1.4	1.4	9.9	38.9	0.18
Ti-2-400-100	0.3	13.1	13.8	0.1	2.6	2.2	12.1	55.8	0.20
Ti-2-500-150	0.6	13.7	15.8	0.2	3.6	2.2	9.9	54	0.26

### 2.2.6 Спектроскопія Raman

Аналіз спектрів Raman дозволяє нам констатувати, чи є на досліджуваних поверхнях добре кристалізований  $\text{TiO}_2$  у формі анатазу (вузькі сигнали при 144; 390; 512; 633  $\text{cm}^{-1}$ ). Для деяких зразків реєстрували широкі сигнали фосфорних груп (260; 800; 1006 та 3132  $\text{cm}^{-1}$ ) (фосфат кальцію), що свідчить про високу аморфність. На рис. 2.3 показані спектри зразків з різним вмістом фосфатів. Аналіз показав, що поверхні всіх досліджених зразків містять кристалізований  $\text{TiO}_2$  у формі анатазу. Крім того, в деяких зразках виявлено, що широкі сигнали фосфорних груп (фосфат кальцію) є високоаморфними. У різних зразках був різний вміст фосфатів. Вміст фосфатних груп по відношенню до діоксиду титану

оцінювали шляхом визначення співвідношення  $I_{1006}/I_{144}$  (табл. 2.3). Як правило, значення були нижчими для зразків РЕО, отриманих з електролітом 1, і вищими для електроліту 2. Найнижчий вміст фосфатів був зафіксований для зразка Ti-1-500-450, а найвищий для Ti-2-500-150. Ніяких додаткових сигналів від ЕДТА не зареєстровано. Ці результати дозволяють припустити, що протокол РЕО з електролітом 2, напругою 500 В і щільністю струму  $150 \text{ мАсм}^{-2}$  може бути оптимальним для отримання поверхневих шарів з високим вмістом фосфатів, а отже, з високою схильністю до остеоінтеграції.

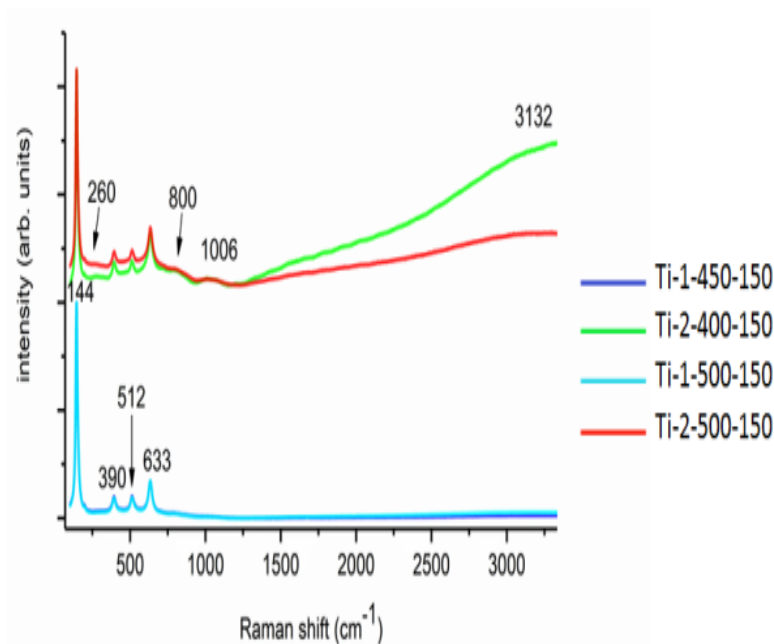


Рисунок 2.3 – Зразки спектрів Raman з різним вмістом фосфатів.

Порівняння вмісту фосфатів проводили на основі інтенсивності фосфатних вібрацій  $1006 \text{ см}^{-1}$  до  $\text{TiO}_2$   $144 \text{ см}^{-1}$  для вибраних поверхонь РЕО.

Таблиця 2.3 – Порівняння вмісту фосфату на основі інтенсивності фосфатних коливань  $1006 \text{ см}^{-1}$  до  $\text{TiO}_2$   $144 \text{ см}^{-1}$

Зразок	$I_{1006}/I_{144}$
Ti-1-450-150	0.00371
Ti-1-500-150	0.00302
Ti-2-400-100	0.01482
Ti-2-400-150	0.01237
Ti-2-450-100	0.00561
Ti-2-500-150	0.01497

### 2.2.7 Дифракція рентгенівських променів (XRD)

Дифракційні картини ( $\alpha = 0,25$ ) зразків показують, що шари мають полікристалічний характер. Крім того, для частин зразків (Ti-2-400-100, Ti-2-400-150) видно аморфне "hallo" (рис. 2.4). Якісний фазовий аналіз зразків показує, що шар складається з TiO<sub>2</sub> [анатаза, с. I41 / amd] (ICDD PDF 01-084-1286) і Ti [альфа-титан, с.г. P63 / mmc] (ICDD PDF 01-089-5009) фази. У разі Ti-10-500-150 зразок TiO<sub>2</sub> [Рутил, с.г. P42 / mm] (ICDD PDF 04-007-5403) також спостерігається фаза.

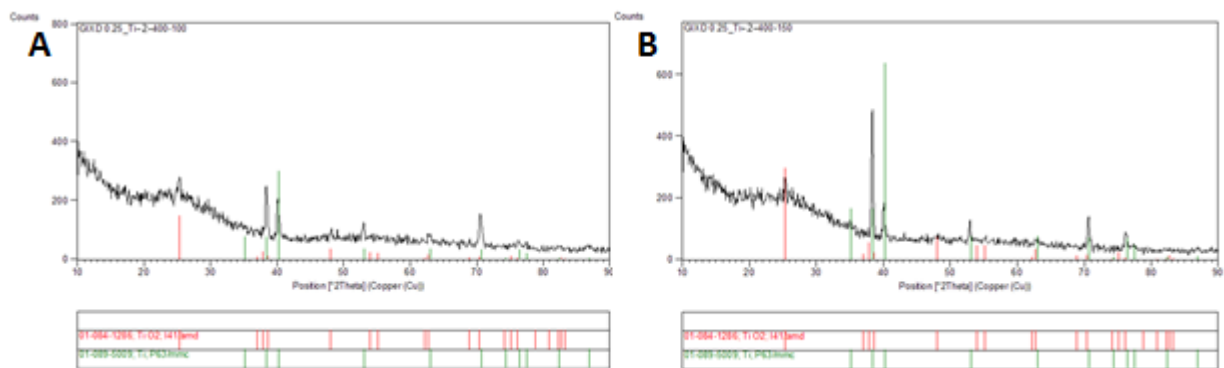


Рисунок 2.4 – Діаграми XRD, що показують А) дані для зразка РЕО Ti-2-400-100; В) дані для зразка РЕО Ti-2-400-150

### 2.2.8 Шорсткість і гідрофільність поверхонь РЕО

Було виявлено, що шорсткість поверхонь РЕО, як правило, вища для електроліту 2 порівняно з електролітом 1, і була найвищою для зразка Ti-2-500-150 (рис. 2.5). Більша шорсткість може сприяти прикріпленню та розмноженню остеогенних клітин [44]. Це показує, що протокол РЕО, використаний для генерації зразка Ti-2-500-150, був найбільш оптимальним для формування біоактивних та біосумісних поверхонь на імплантатах Ti зі значною схильністю до остеоінтеграції.

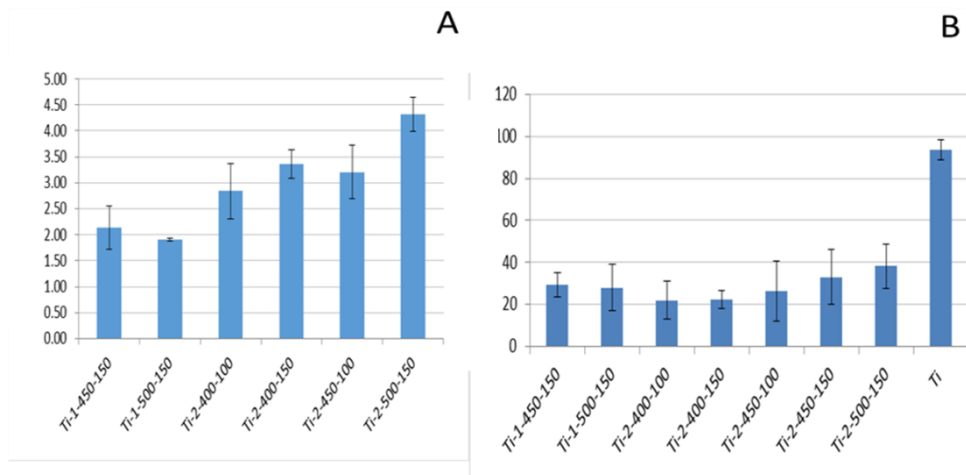


Рисунок 2.5 – Шорсткість вибраних поверхонь, А) (зображена у довільних одиницях) та кут контакту, В) (вимірюється краплею води)

Вимірювання кута контакту показало, що оброблені РЕО поверхні зразків Ті набули значно більшої гідрофільності порівняно з еталонними зразками Ті без будь-якої поверхні РЕО (рис. 2.5). Це свідчить про те, що поверхні, що генеруються РЕО, можна розглядати як більш біологічно активні в порівнянні з необробленим титаном.

### 2.2.9 Випробування твердості та міцності

Тест є методом для оцінки міжфазного зчеплення шару покриття з основним матеріалом основи. Критичне навантаження  $L_c$  - це нормальна сила, прикладена до проникаючого пристрою, що спричиняє міжфазний збій, що корелює з міцністю зчеплення. Неперервна пластична перфорація шару була виявлена в кожному досліджуваному зразку (рис. 2.6 А). Значення критичного навантаження  $L_{c1}$  відповідає наступам руйнування клею, коли починається розтріскування; тоді як  $L_{c2}$  відповідає початку спалаху (розпаду) адгезивного шару. Виявлено різні значення критичної сили  $L_{c1}$  та  $L_{c2}$  залежно від параметрів РЕО (рис. 2.6 В). Було встановлено, що зразок Ті-2-400-100 мав найсильнішу адгезію зі значенням критичної сили  $L_{c2} = 9,01$ . У кожному дослідженому зразку не було виявлено акустичного випромінювання, що вказує на те, що керамічні

покриття не були крихкими. Більше того, для різних зразків спостерігалися різні значення критичної сили через їх різну товщину і, вирогідно, різну пористість. Це також можна інтерпретувати як інформацію про внутрішню структуру різних шарів, які можуть мати більш пористі ділянки всередині, таким чином інтендер швидше проникає в шар, що, в свою чергу, пов'язано з крихкістю шарів. В цілому, РЕО є перспективною методикою отримання поверхневих шарів із передбачуваними характеристиками, проте необхідні подальші дослідження, щоб дослідити, як можна будувати шари РЕО з бажаною міцністю зчеплення та внутрішніми підструктурами.

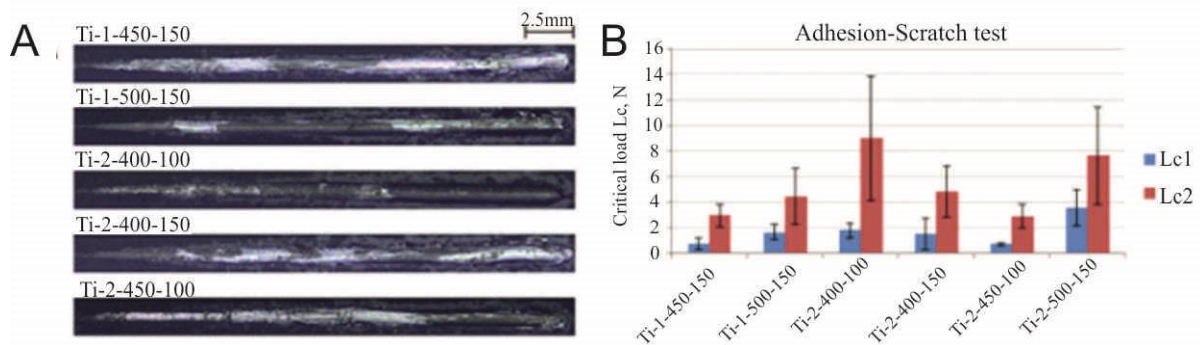


Рисунок 2.6 – Адгезія оксидного шару до підкладки Ті, продемонстрована за допомогою випробування твердості та міцності. А) репрезентативні фотографії подряпин на поверхні оксидних шарів; В) кількісна оцінка результатів

### 2.2.10 Стійкість до електрохімічної корозії

Для оцінки корозійної поведінки зразків титану, обробленого РЕО, де необроблений титан служив контролем, використовували електрохімічний аналіз корозії. Результати представлені на рисунку 7. На діаграмах відображаються за величиною (рис. 2.7 А) та зсувом фаз (рис. 2.7 В) дані імпедансу. Результати показують, що спектр для контрольного зразка (необробленого Ті) характеризується єдиною постійною часу. З іншого боку, спектри обробленого РЕО Ті мали принаймні двічі константи (рис. 2.7 В). Крім того, спектри, виміряні для цих зразків, мали загальний імпеданс вищий, ніж у

контрольного зразка, у всьому досліджуваному діапазоні частот (рис. 2.7 А). Це говорить про те, що покриття покращили корозійну стійкість основи в розчині Рінгера. Більш того, покриття, отримане в розчині 2 має більш антикорозійний характер, ніж те, що було отримане у розчині 1. Ємності апроксимували за допомогою елементів постійної фази (CPE).

Для аналізу підгонки контрольного зразка Ті було обрано типову схему  $R_s(Q_{\text{bar}}R_{\text{bar}})$ .  $R_s$  означає опір між капілярним наконечником електрода порівняння (RE) та поверхнею зразка (робочий електрод - WE).  $R_{\text{bar}}$  - це міжфазний опір, пов'язаний з наявністю бар'єрного пасивного оксидного шару на підкладці.

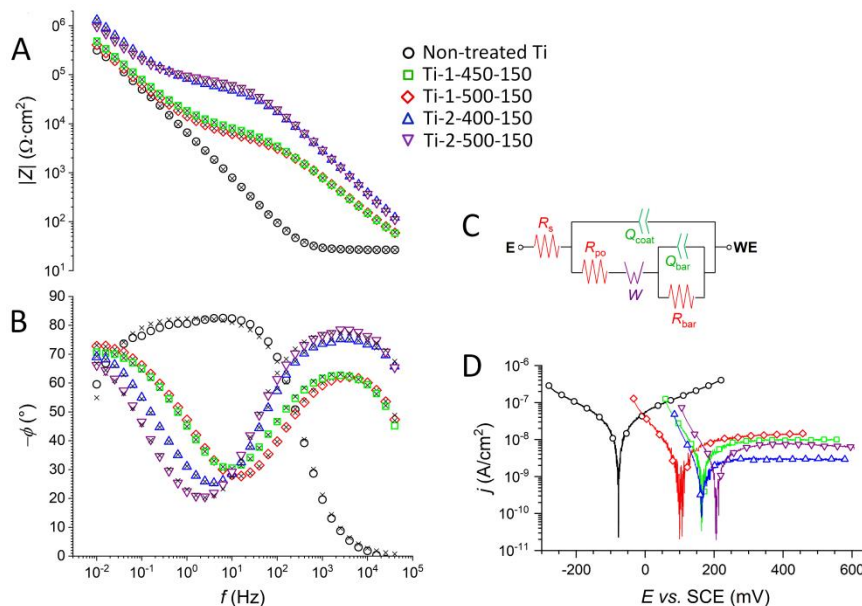


Рисунок 2.7 – Діаграми Bode, що показують А) величину імпедансу ( $|Z|$ ); В) зв'язок негативного фазового кута ( $-\phi$ ) з частотою для необробленого зразка титану та зразків, оброблених РЕО.  $\times$  означають бали, розраховані від підгонки експериментальних даних до моделі  $R_s(Q_{\text{bar}}R_{\text{bar}})$  для необробленого титану, та ЕЕС, зображеного на С) для зразків, оброблених РЕО; D) криві PDP, записані для необроблених зразків титану та після обробки РЕО.

Швидкість корозії підстилаючого Ті зменшується, оскільки цей опір стає більшим.  $Q_{\text{bar}}$  апроксимує ємнісні ефекти, що відповідають пасивному оксидному шару. Реакція імпедансу зразків титану, оброблених РЕО, змодельована з використанням ЕЕС, показаного на рис. 2.7С. Оскільки оксидні

покриття з РЕО мали двошарову природу, слід було враховувати опори, що відповідають характеристиці імпедансу зовнішнього пористого ( $R_{po}$ ) та внутрішнього бар'єрного ( $R_{bar}$ ) шарів. Роль  $Q_{coat}$  полягала в моделюванні ємності всього покриття (пористий + бар'єрний шари), тоді як  $Q_{bar}$  відноситься до ємнісної поведінки внутрішнього бар'єрного шару. Щоб належним чином підігнати експериментальні результати до еквівалентної схеми, потрібно було включити ще один. Причиною цього була неможливість оцінки значення  $R_{bar}$  в процесі встановлення. Його значення завжди наближалось до нескінченності, а стандартна похибка, пов'язана з припасуванням, набагато перевищувала 100%. Тому вирішили включити в аналіз елемент напівнескінченної дифузійної схеми імпедансу Warburg (W). Той факт, що такий елемент повинен бути включений в схему, свідчить про те, що процес корозії був обмежений дифузією корозійного середовища через пористу архітектуру покриття [45, 46].

Таблиця 2.4 – Параметри, отримані від підгонки даних до моделі  $R_s$  ( $Q_{bar}R_{bar}$ ) у випадку необробленого зразка Ti, та ЕЕС, показаних на рис. 2.7С для зразків титану, оброблених РЕО

Зразок	необроблен ий Ti	Ti-1-450- 150	Ti-1-500- 150	Ti-2-400- 150	Ti-2-500- 150
$R_s$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	26.6	22.3	23.9	25.1	24.5
$Q_{coat}$ ( $s^n \text{ M}\Omega^{-1} \text{ cm}^{-2}$ )	–	1.43	1.56	0.186	0.159
$n_{coat}$ (–)	–	0.77	0.77	0.87	0.89
$R_{po}$ ( $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ )	–	5.01	7.74	47.5	66.0
$\delta$ ( $\text{k}\Omega \text{ s}^{1/2}$ )	–	13.0	16.0	71.4	63.8
$Q_{bar}$ ( $s^n \text{ M}\Omega^{-1} \text{ cm}^{-2}$ )	24.0	34.5	25.6	14.9	24.5
$n_{bar}$ (–)	0.93	0.91	0.90	0.97	1.00
$R_{bar}$ ( $\text{M}\Omega \text{ cm}^2$ )	1.73	9.37	6.39	11.3	6.69
$\chi^2$ (–)	$< 8.46 \cdot 10^{-4}$	$< 2.08 \cdot 10^{-4}$	$< 2.66 \cdot 10^{-4}$	$< 1.04 \cdot 10^{-4}$	$< 1.26 \cdot 10^{-3}$

Можна зазначити, що  $n$  параметрів в ланцюгах коливаються в межах від 0,77 до 1,00, що характерно для ємнісних елементів корозійних систем. Можна відзначити, що зразки Ti-1-450-150 та Ti-1-500-150 мали дуже схожі корозійні властивості, причому останні були менш стійкими. Більше того, опір пористої частини покриття був вищим для зразка РЕО-ed при 500 В, що свідчить про те,

що або його товщина була більшою, ніж у зразка, обробленого до 450 В, або його пористість була меншою. Ця знахідка відповідає вищому значенню коефіцієнта Варбурга, визначеному для зразка Ti-1-500-150. Як видно з рис. 2.7, параметри придатності (табл. 2.5) зразків, оброблених у розчині 2 показують, що їх корозійна стійкість перевищувала оброблені РЕО зразки Ti, отримані у розчині 1. Значення  $R_{po}$  для цієї серії зразків були на порядок вищими, ніж для Ti-1-450-150 та Ti-1-500-150. У цьому дослідженні найкращі результати були отримані для зразка Ti-2-400-150. Однак стійкість до корозії інших зразків Ti була незначною мірою гіршою.

Таблиця 2.5 – Дані про корозію, отримані з поляризаційних експериментів, проведених на короткому діапазоні (LPR) і на великому діапазоні (PDP)

Зразок	необроблен ий Ti	Ti-1-450- 150	Ti-1-500- 150	Ti-2-400- 150	Ti-2-500- 150
$E_{OC}$ (mV vs. SCE)	-39.7	238.8	276.9	313.1	319.3
$E_{cor,LPR}$ (mV vs. SCE)	-30.3	214.6	288.3	308.0	321.1
$E_{cor,PDP}$ (mV vs. SCE)	-77.4	104.4	162.8	184.4	198.0
$R_p$ ( $M\Omega\ cm^2$ )	6.91	23.4	26.8	61.9	26.1
$i_{pas}$ ( $nA\ cm^{-2}$ )	407	14.2	9.17	3.91	6.91

Після завершення вимірювань зразки пройшли поляризаційні експерименти. Результати сканувань на великих відстанях представлені на рисунку 2.7D, тоді як параметри корозії, вилучені з експериментів постійного струму, можна знайти в таблиці 2.4. Можна зазначити, що анодна гілка ділянки Тафеля, що відповідає голої поверхні Ti, свідчить про те, що відбувається окислення металу. В таких умовах окислення призводить до пасивації металу [47]. Однак характерне плато, на якому можна було б оцінити щільність струму пасивації ( $i_{pas}$ ), не було досягнуто в діапазоні потенціалів, вибраному в цьому дослідженні. Тому в цій роботі  $i_{pas}$  було обрано як щільність струму, виміряну на кінцевому потенціалі сканування (при +250 мВ проти EOC). Тим не менше, у випадку всіх зразків, оброблених РЕО, плато пасивації було досягнуто майже відразу після проходження через потенціал корозії (рис. 2.7D). Дотримуючись



даних на рисунку 2.7D та таблиці 2.4, можна зробити висновок, що найкращим показником зразка Ti був Ti-2-400-150 (найвищий  $R_p$  і найнижчий  $i_{pas}$ ). Однак стійкість до корозії інших зразків, оброблених PEO, все ще була набагато вищою, ніж у зразка оголеного Ti. Крім того,  $E_{cor}$  цих зразків був зміщений у бік більш позитивних значень щодо контрольних. Загалом, це показує, що корозійна стійкість Ti була покращена за допомогою обробки PEO, незалежно від обраних умов процесу, з найкращими результатами, отриманими для зразка Ti-2-400-150.

### 2.2.11 Довгостроковий аналіз корозійної стійкості (у розчині Рінгера)

Корозію досліджували при тривалому впливі в розчині Рінгера протягом 12 тижнів при 37 °C при постійному перемішуванні. Вихід Ti, Ca та P у рідину вимірювали за допомогою ICP-OES. На малюнку 8 показана динаміка вивільнення Ti і P в розчин Рінгера під час впливу протягом 12 тижнів. Вимірювання вивільнення Ca не показало незмінних даних у порівнянні з контрольними значеннями розчину Рінгера (не показано). Результати показали, що необроблена поверхня Ti не виділяла виявлених кількостей іонів Ti (нижче 0,01 мг L<sup>-1</sup>) протягом усього експерименту. Однак оброблені зразки справді показали появу іонів Ti в корозійному розчині. Примітно, що зразок Ti-2-400-150 виділив найбільшу кількість іонів Ti. З усіх досліджених зразків результати показують, що покриття у зразку Ti-2-450-150 найменш схильні до корозії серед оброблених зразків, і тому можуть бути обрані початковою точкою для подальшого розвитку виробництва імплантатів. Це відповідає даним про морфологію поверхні, виявлених SEM, що показують міцний оксидний шар без тріщин.

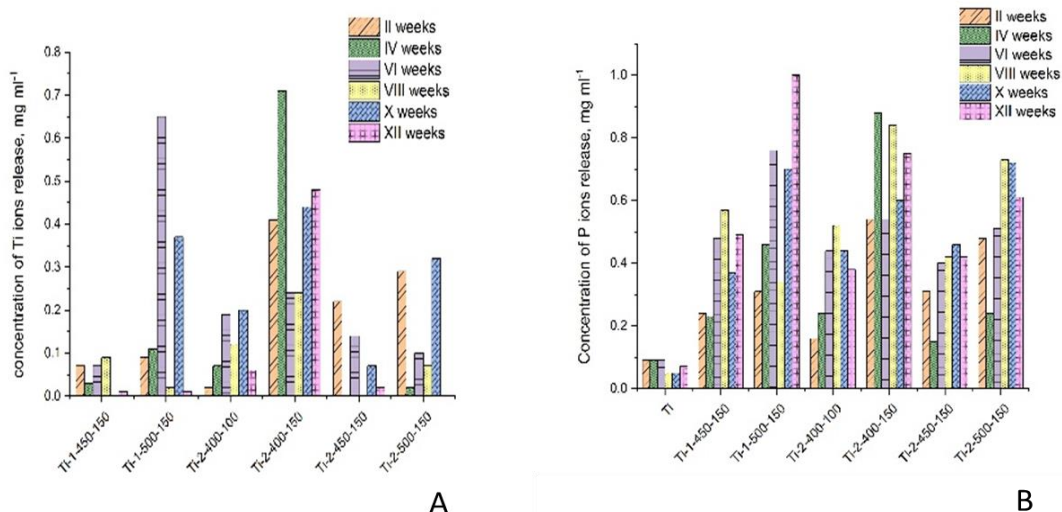


Рисунок 2.8 – Вивільнення специфічних елементів після тривалої інкубації в розчині Рінгера протягом 12 тижнів. Аналітичний аналіз ICP-OES проводили кожні 2 тижні. А) виділення іонів Ti; В) виділення іонів P. Дані показали статистичну значимість при  $p < 0,05$ .

## 2.2.12 Аналіз біоактивності у модельованій рідині організму (SBF)

Аналіз імітованої рідини тіла був використаний для відтворення впливу рідин організму на поверхневі шари тестових зразків, генерованих PEO, щодо кристалізації апатитів. Зразки піддавали дії розчину SBF протягом 4 тижнів, а морфологію поверхні спостерігали через кожен тиждень (рис. 2.9). Ми спостерігали такі явища: Ti: як очікувалося, протягом 4 тижнів впливу розчину SBF на поверхні титану не було виявлено збільшення кількості апатиту. Ti-1-450-150 і Ti-1-500-150: після повернення другого тижня впливу на поверхнях зразків було виявлено мінімальні осади, які з часом не збільшувались. Ми дійшли висновку, що ці поверхні стійкі до процесу кристалізації апатитів. Ti-2-400-100: поверхня зразка була повністю покрита шаром апатитів через два тижні впливу. Шар був досить товстим, через кілька тижнів він відшарувався від поверхні зразків. Це свідчить про те, що ця поверхня сприяє кристалізації апатитів.

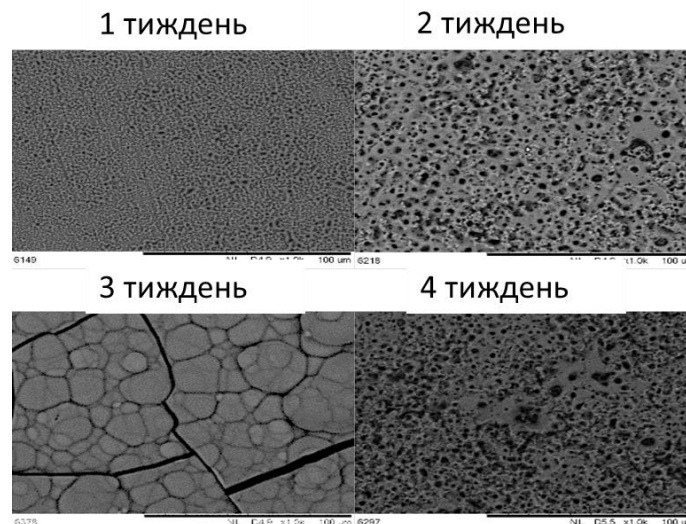


Рисунок 2.9 – Репрезентативні SEM-зображення поверхні зразка Ti-2-400-150 після тесту на біоактивність у розчині SBF, шкала 100 мкм

Ti-2-400-150: прозорий кристалічний шар був виявлений на поверхні після двох тижнів впливу. Наприкінці третього тижня вся поверхня була покрита товстим шаром апатиту, який почав тріскатися. Врешті-решт цей шар відокремився і відпав від зразка наступного тижня. Ми дійшли висновку, що ця поверхня має великий потенціал для сприяння кристалізації апатитів. Ti-2-500-150: на поверхні зразка було виявлено незначну кількість осадів, які не збільшувались при інкубації. Очевидно, що ця поверхня не сприяє процесу кристалізації апатитів.

Загалом, ці результати показують, що розчин електролітного розчину 2 активно сприяє кристалізації апатитів після обробки PEO імплантів Ti. Крім того, зразок Ti-2-400-150, вирогідно, має поверхневі властивості, щоб викликати високий ступінь біоактивності. Однак швидкість кристалізації слід ретельно контролювати, оскільки занадто товсті шари апатиту мають обмежену механічну стійкість і схильні до відшарування.

Було проведено рентгенографічний аналіз та аналіз EDX на окислених поверхнях титану після інкубації в імітованому фізіологічному розчині. Фазовий склад оцінювали за допомогою XRD-аналізу, за допомогою лампи Cu та нікелевого фільтра. Зразки Ti-2-400-100 та Ti-2-450-150 були обрані, оскільки попередньо спостерігалось утворення шару апатиту на їх поверхнях після

занурення в імітовану рідину тіла. Зображення в додатку Рисунок 2.10 показує дифрактограми, записані для зразків Ti-2-400-100 (II тиждень) і Ti-2-450-150 (III тиждень), для яких проводиться аналіз фазового складу покриття в 2Theta. Виконано діапазон кутів  $20^{\circ}$ - $40^{\circ}$ . Для зазначених зразків не було зафіксовано характерних дифракційних відбиттів, які чітко вказували б на наявність фази, що містить гідроксиапатит. В інтервалі кутів  $25^{\circ}$ - $27^{\circ}$  2 Тета та  $31^{\circ}$ - $34^{\circ}$  2 Тета вказує на наявність аморфної фази, що може свідчити про наявність оксиду титану, а також про утворення аморфної фази, що містить фосфати кальцію в результаті поверхневе занурення в розчин SBF. Крім того, в досліджуваному діапазоні не було зафіксовано жодних сигналів, характерних для оксиду титану в поліморфній формі анатазу або рутилу. Отже можна зробити висновок, що зареєстрована аморфна площа зареєстрована для сформованої частини апатиту. Були записані характерні дифракційні рефлексії, що відповідають титаномісткій фазі. На присутність фосфату кальцію вказує морфологія поверхні, на якій підтверджено утворення апатитового шару за допомогою методу EDX (рис.2.10.). На спектрах добре видно піки від Ca, P та O (O не позначено). Атомне співвідношення кальцію та фосфору (Ca/P) становить близько 1,68. Це значення дуже характерне для гідроксиапатиту. У сукупності ці результати дозволяють припустити, що поверхні PEO, що утворюються з електролітом 2, можуть мати схильність до утворення гідроксиапатитів у фізіологічних умовах в організмі.

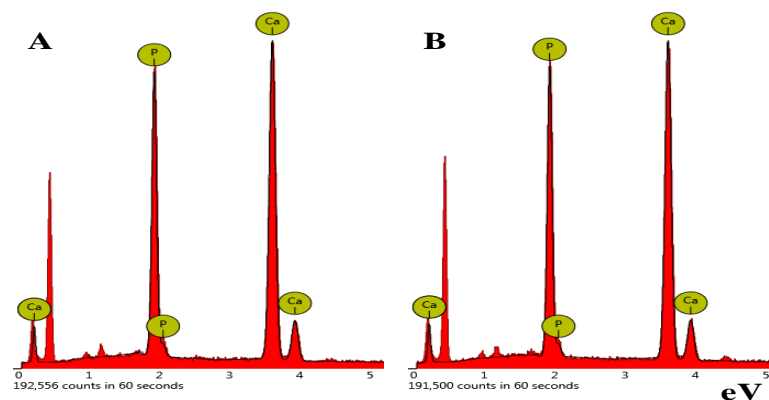


Рисунок 2.10 – Спектри EDX зразків Ti-2-400-100 (A) та Ti-2-450-150 (B) після тесту на біоактивність у розчині SBF

### 2.2.13 Аналіз цитотоксичності зразків та життєздатності клітин

Аналіз зниження рівня резазурину на 1 день показує насамперед рівень цитотоксичності зразка та прикріплення клітин, оскільки проліферація ще не є інтенсивною протягом цього короткого періоду часу. Як видно з рисунку 2.11, всі досліджувані поверхні РЕО були сприятливими для життєздатності клітин і не виявляли жодних ознак цитотоксичності. Клітинне прикріплення було кращим у всіх досліджених зразках РЕО порівняно з контролем (полірована поверхня Ti без будь-якого шару РЕО). Серед різних тестових зразків зразки Ti-1-450-150, Ti-2-400-100 та Ti-2-500-150 продемонстрували значну перевагу над іншими у прикріпленні клітин наприкінці інкубації одного дня. Не спостерігалось суттєвої різниці між усіма зразками, випробуваними на 3 день. Деякі зразки демонстрували сповільнене зростання через 7 днів інкубації. Можливо, що в цей момент часу умови не були сприятливими через розростання клітин. Ми дійшли висновку, що умови РЕО, що використовуються для формування шару Ti-2-500-150, можна вважати придатними для подальших випробувань з метою отримання поверхонь імплантатів з високою схильністю до остеоінтеграції.

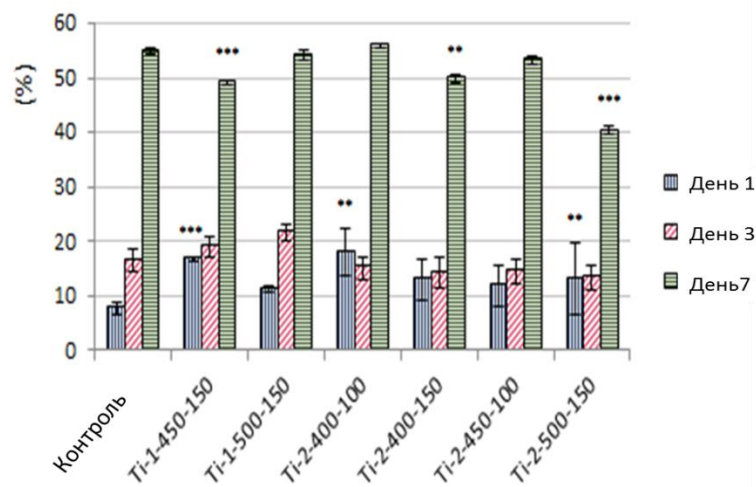


Рисунок 2.11 – Аналіз цитотоксичності/життєздатності клітин.

Статистичну значимість оцінювали у порівнянні з контролем кожного моменту часу (значення  $p$  після двобічного дворівневого тесту на рівну дисперсію).

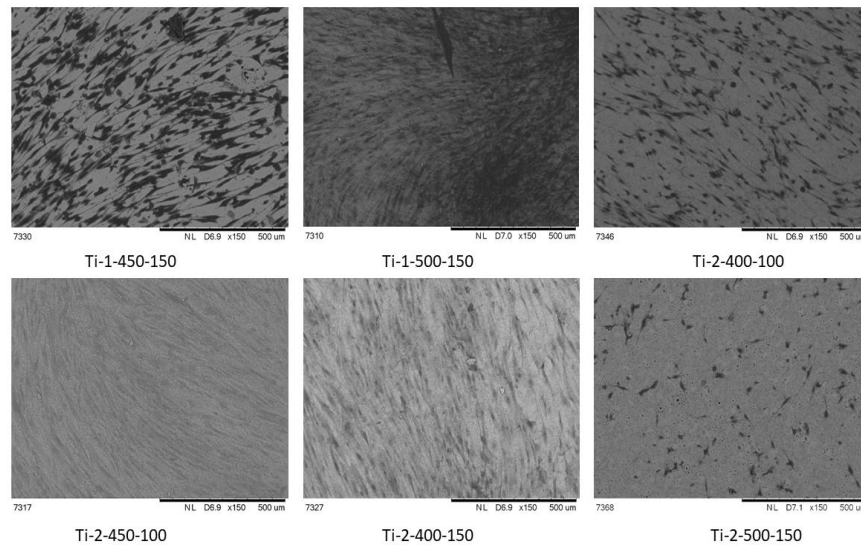


Рисунок 2.12 – Скануюча електронна мікроскопія розподілу остеобластів по експериментальних поверхнях на 7-й день після висіву клітин, шкала 500 МКМ

Скануюча електронна мікроскопія демонструє рівномірний розподіл клітин остеобластів на поверхнях зразка (рис. 2.12). Клітини вирівняні та рівномірно розподілені по всіх зразках Ti-1, а також по Ti-2-440-100 та Ti-2-400-150. І Ti-2-400-100, і Ti-2-500-150 мають випадковий розподіл клітин з меншим числом клітин. Незважаючи на відмінності в розподілі клітин, на обох зразках клітини набули звичайної витягнутої форми та численних контактів. Низька щільність клітин на зразку Ti-2-500-150 на 7 день корелює з даними аналізу відновлення резазурину і може пояснюватися властивостями поверхневої адгезії після засівання остеобластів.

#### 2.2.14 Дослідження адгезії бактерій

Тривалість імплантації зубного імплантату залежить від його здатності протистояти адгезії бактерій на його поверхні з наступною колонізацією та утворенням біоплівки. Метою експерименту з адгезією бактерій було визначити здатність поверхонь, що генеруються РЕО, протистояти прилипанню бактеріальних клітин. Адгезію бактерій із використанням золотистого

стафілокока визначали через 2, 4, 6 та 24 год впливу мікроорганізму на досліджувані зразки. Після 2 год інкубації було виявлено, що лише Ti-2-400-150 містить значно менше бактерій, що прилипають до поверхні, порівняно з необробленим зразком Ti (рис. 2.13). При дослідженні через 4 та 6 годин не було виявлено суттєвих відмінностей щодо адгезії бактерій до поверхні між усіма досліджуваними зразками та контролем. Однак через 24 години інкубаційного періоду зразки Ti-1-500-150 та Ti-2-400-100 виявили значно менше бактерій, що прилипали до їх поверхні, порівняно з контролем. Підводячи підсумок, ці результати дозволяють припустити, що в експериментальних умовах поверхневий шар, що генерується РЕО, на Ti-2-400-150 був ефективним протистояти прикріпленню бактерій протягом короткого періоду, тоді як Ti-2-400-100 і Ti-1-500-150 були ефективними для протистояння бактеріальній адгезії протягом тривалого часу.

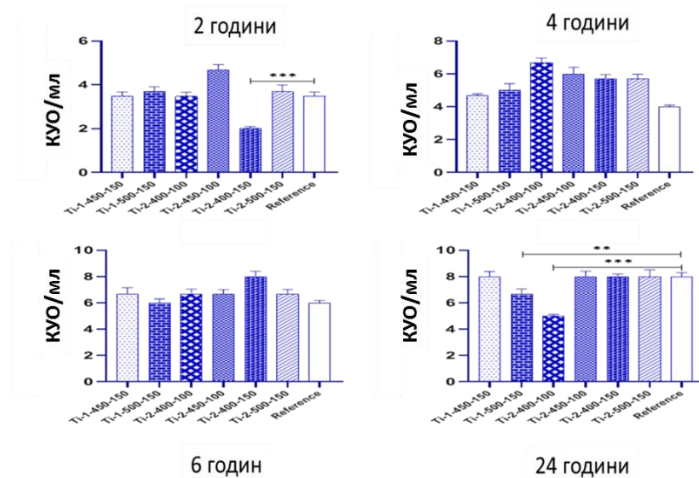


Рисунок 2.13 – Адгезія бактерій. Кількість бактерій прилипало до поверхонь зразків у різні моменти часу інкубації. Дані відображаються як засоби зі значеннями SD. Зірочками позначені значення  $p$ , де \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  (односторонній тест ANOVA)

### 2.3 Обговорення

Нашою метою було знайти простий склад РЕО-електроліту, який може утворити бажаний шар покриття на поверхні імплантатів Ті. Оброблені методом кислотного травлення поверхні Ті не мають шорсткості, придатної для підтримки проліферації клітин [48]. Біоактивні покриття були успішно синтезовані РЕО в електролітах як з основними, так і з кислими значеннями рН [49]. Наявність певних специфічних хімічних груп може призвести до підвищеної схильності до зв'язування певних білків та утворення міцних зв'язків з остеогенними клітинами [50]. Здатність поверхневого покриття підтримувати біологічні функції, наприклад остеоіндукції та остеointegraції, визначається подібністю його структури та хімічного складу до біологічних тканин. Основним мінеральним компонентом кістки є гідроксиапатит, який складається з фосфату  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ . Тому, маючи схильність до остеointegraції, поверхневі шари імплантату повинні підтримувати фосфатні групи  $\text{Ca}$ , що може полегшити зв'язок з кістковою тканиною. Таким чином, ми висунули гіпотезу про те, що фосфат можна додавати до електроліту, використовуючи фосфат калію,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Крім того, електрохімічні параметри (напруга/струм) під час РЕО без  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  не досягали очікуваної стабільної поведінки. Що стосується джерела іонів кальцію для утворення комплексу фосфату кальцію, ми дослідили два варіанти: неорганічне та органічне джерело кальцію, а саме гідроксид кальцію,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  та формиат кальцію  $\text{Ca}(\text{HCOO})_2$ . Виходячи з наших попередніх спостережень та результатів інших, ми постулювали, що іони кальцію бажано подавати у вигляді великого органічного комплексу. Таким чином, ми забезпечили електролітний розчин етилендіамін тетраоцтовою кислотою, хелатоутворюючим агентом, який зв'язує різні іони металів, і раніше було показано, що він включає оксиди металів у покриття РЕО завдяки утворенню негативно заряджених частинок. Крім того, наявність комплексів метал-ЕДТА призвело до зменшення відкритої пористості в шарі покриття. Також було висловлено припущення, що використання комплексів ЕДТА та металу-ЕДТА в якості електролітних добавок може бути



корисним для зменшення дефектів, що утворюються в шарі покриття РЕО, без використання складної форми струму та тривалого часу покриття. Це відповідало запропонованій моделі механізмів осадження фосфатів кальцію в процесі РЕО [51]. Важливим параметром для остеоінтеграції є співвідношення Са/Р у поверхні покриття. Таким чином, ріст ендотеліальних клітин був вищим на покриві з найвищим співвідношенням Са/Р [52]. Крім того, найбільш оптимальні умови росту для остеобластів мали місце при співвідношенні Са/Р близько 1,7 в об'ємних матеріалах Са-Р [53, 54]. Хоча наші РЕО-покриття мають співвідношення Са/Р не вище 0,26, судячи з аналізу XPS, вони проте продемонстрували значну здатність до осадження апатитів під впливом імітованих фізіологічних умов в організмі, що підтверджується зображеннями SEM після інкубації в SBF і підтверджено за допомогою аналізу EDX. Важливо, що аналіз SBF з Ti, що не має покриття, не показав жодного збільшення осаду апатиту після тривалого 4-тижневого впливу в розчині SBF. Навпаки, поверхні РЕО спричиняли стійкі осади апатитів, що часто призводило до самостійного відшарування (розшарування) апатитів, що відбувалося між 3 та 4 тижнями експозиції. Це свідчить про те, що здатність шарів, що генеруються РЕО, викликати випадання апатиту потрібно ретельно збалансувати для досягнення бажаного покриття, оскільки занадто товстий шар апатитів може порушити механічну стійкість біоактивних поверхонь. Механізм осадження апатитів - це багатоступеневий процес, заснований на специфічній адсорбції іонів Са на негативно зарядженій поверхні та безперервній адсорбції фосфатних іонів на адсорбованому Са. Тут можна зауважити, що результати тестів SBF не завжди були однозначними і іноді мало узгоджувалися з результатами біологічних аналізів, наприклад неактивна поверхня у розчині SBF може виявляти високу активність у біологічних (клітинних) дослідженнях і навпаки. Ці розбіжності вимагають подальших досліджень. Однак загалом наші результати свідчать про те, що покриття з РЕО підвищують схильність імплантатів до остеоінтеграції завдяки підвищеному вмісту Са/Р.

Поверхнево-кістковий інтерфейс імплантату є основою взаємодії між матеріалом і кістковою тканиною [55], а розмір та морфологія пір імплантатів відіграють важливу роль у їх біосумісності. Біоміметичні покриття виявляють свої остеointegraційні властивості значною мірою завдяки оптимальному розподілу розмірів пор [56]. Ми показали, що РЕО можна розглядати як метод вибору для отримання мікропористих біоміметичних покриттів завдяки його здатності утворювати пори оптимального розміру. Повідомлялося, що надтонкі (100 нм) пори можуть брати участь у посиленні клітинних реакцій [57]. Загалом, остеointegraційна здатність імплантатів залежить від багатьох факторів, включаючи координацію, ковалентний зв'язок, електростатичні взаємодії, водневий зв'язок тощо та здатності, наприклад для підтримки специфічного поглинання білка та утворення філоподій навколишніми клітинами та їх міцного прикріплення до поверхонь [45]. Все ще залишається незрозумілим, які особливості поверхні ефективніше регулюють функції клітин [58]. Однак ми припускаємо, що оптимальні результати для довготривалої стабільності імплантатів, швидше за все, будуть досягнуті за допомогою поєднання обох мікропористих покриттів з макропористою структурою імплантатів, що може бути досягнуто, наприклад виробництво добавок або порошкова металургія [59] з подальшою обробкою РЕО.

Біосумісність покриттів також залежить від їх гідрофільності. Покриття РЕО, отримані з усіма випробуваними електролітами у розчині, показали переважну змочуваність на основі аналізу кута контакту з водою. Було виявлено, що всі досліджувані зразки мають кут контакту  $40^\circ$  або менше, що припускає, що поверхня сильно гідрофільна проти контрольної, необробленої Ti, що має значення  $> 90$  градусів. Це чітко показує, що процес РЕО значно покращує біосумісність поверхневих покриттів.

Іншим важливим параметром для потенційної остеointegraції є морфологія і розмір пор. Таким чином, пори розміром менше 120 мкм вважаються значно меншими, ніж ті, що необхідні для проникнення остеобластів [60]. Тому подальші зусилля слід інвестувати у створення біоактивних поверхонь із

відповідною пористістю для оптимальних можливостей остеоінтеграції. Крім того, зубні/кісткові імплантати повинні витримувати високі механічні навантаження, і тому вони повинні мати відносно високу міцність на стиск [61-64]. Ми досліджували як механічну стійкість, так і міцність на зчеплення шарів РЕО за допомогою випробування твердості та міцності, і виявили, що процес РЕО забезпечує виготовлення біоактивних поверхонь з необхідними механічними характеристиками.

Хімічна характеристика зразка за допомогою аналізу EDX показала, що покриття РЕО були значно збагачені компонентами розчину P і Ca, основними складовими гідроксиапатиту, що відповідає результатам аналізів SEM, XRD та Raman. Крім того, EDX картографування поперечних перерізів поверхневого шару показало, що як P, так і Ca рівномірно розподілені в шарі покриття. Це також припустило, що РЕО можна використовувати для отримання покриттів з високою схильністю до остеоінтеграції.

Аналіз XPS підтверджує наш висновок, що РЕО з обраними компонентами електроліту є відносно "чистим" процесом, що дає досить передбачувані результати. Таким чином, було виявлено, що P існує лише у фосфатній формі (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), тоді як Ca міститься лише у формі фосфату кальцію. Калій, навпаки, був лише незначно включений в оксидні шари. Цікаво, що азот також знаходився на поверхнях РЕО. Джерелом N була ЕДТА, що ще більше підкреслювало потенційну перевагу присутності цього компонента в електроліті партії. Насправді азот можна розглядати як важливу передумову для підвищення біосумісності та здатності утворювати щільні сполучення з живими тканинами. Цей процес не завжди є простим і ще не до кінця зрозумілим. Так, наприклад, спостереження за ефектом місцево застосовуваного інсуліноподібного фактора росту-I на остеоінтеграцію було без позитивних реакцій через 2 тижні як у остеопоротичних, так і у здорових кроликів [65].

Шари РЕО виявили сприятливу шорсткість поверхонь імплантату. Відомо, що поєднання хорошої шорсткості поверхні та механічних властивостей титану може призвести до успішних імплантацій зубів. Однак біологічні ефекти

поверхонь титану не обов'язково пропорційні ступеню шорсткості в остеобластичних культурах або *in vivo* [66]. З іншого боку, шорсткість також може призвести до прикріплення бактерій. Шорсткість наших поверхонь РЕО, як правило, була високою і зростала із збільшенням напруги/струму. Іншим аспектом біосумісності є хімічна стійкість до корозії. Її оцінювали за допомогою електрохімічного аналізу корозії. РЕО з розчином електроліту 2 показав кращу корозійну стійкість порівняно з обробленими РЕО зразками Ti, отриманими в електроліті 1. Це свідчило про те, що стійкість до корозії поверхневих шарів РЕО може бути підвищена шляхом вибору оптимальних параметрів для обробки РЕО. Найвищий рівень стійкості був отриманий за зразком Ti-2-400-150. Довгостроковий аналіз корозійної стійкості також оцінювали шляхом тривалої (12 тижнів) інкубації в розчині Рінгера. Виділення Ti зразками, обробленими РЕО, в аналізі розчину Рінгера можна пояснити тим, що в умовах процесу РЕО під час взаємодії матеріалу зразка з компонентами електроліту та утворення активних хімічних радикалів при високих температури та тиску Ti перетворюється на керамічний матеріал. Він досить інертний, проте здатний повільно реагувати на агресивне середовище живих тканин. Невідповідність між електрохімічним аналізом корозії та корозією у розчині Рінгера частково можна пояснити природою установок аналізу.

Таким чином, загалом процес корозії у фізіологічних умовах в основному спричинений хлоридами. Для цього розчин Рінгера базується на хлоридах, які можуть імітувати агресивне середовище в організмі. Загалом зразок Ti-2-450-150 показав найвищу корозійну стійкість. Важливо те, що цей протокол РЕО також показав сприятливу морфологію поверхні без тріщин, виявлених SEM. У сукупності можна запропонувати протокол РЕО з електролітом 2 для подальшої розробки зубних імплантатів Ti.

Біосумісність поверхонь РЕО була додатково перевірена в аналізі культури клітин з остеобластами щурів. Всі поверхні, що генеруються РЕО, не виявляли жодної цитотоксичності. Тоді проліферація клітин залежала головним чином від їх здатності прикріплюватися до субстрату. Загалом, поверхні РЕО виявляли

сприятливе прикріплення до остеобластів. Це свідчить про те, що обробку РЕО можна використовувати для досягнення вищої схильності до остеоінтеграції поверхонь зубних імплантатів Ti і, отже, вищої стійкості імплантатів в довгостроковій перспективі. Однак це також залежить від здатності поверхонь імплантатів протистояти прикріпленню бактеріальних клітин та утворенню біоплівки. Аналіз адгезії бактерій показав, що дійсно можливо знайти баланс між здатністю біоактивних поверхонь підтримувати ріст еукаріотичних клітин, одночасно пригнічуючи прикріплення і ріст бактерій. Однак взаємодія між умовами підтримки прикріплення та розмноження клітин, одночасно заважаючи бактеріям прикріплюватися та утворювати біоплівки, залежить від делікатного балансу і все ще вимагає подальших досліджень.

## **Розділ 2 висвітлений у статті:**

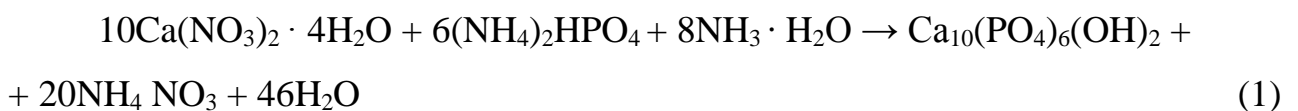
Kyrylenko, S. et al. Effects of the sources of calcium and phosphorus on the structural and functional properties of ceramic coatings on titanium dental implants produced by plasma electrolytic oxidation. *Materials Science and Engineering C*. 2021, 119:111607 (article in press).

### 3 ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ТА ОСАДЖЕННЯ КОЛАГЕНУ НА ГІДРОКСИПАТИТНИХ ПОКРИТТЯХ, СТВОРЕНИХ НА ПОПЕРЕДНЬО ОБРОБЛЕНИХ СУБСТРАТАХ

#### 3.1 Матеріали і методи

##### 3.1.1 Синтез гідроксиапатиту

Синтез стехіометричного гідроксиапатиту забезпечувався такою реакцією (1):



Окремо готували два різні розчини:

Розчин №1: 0,1 М розчину  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  готували шляхом розчинення відповідної кількості  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  у дистильованій воді. Розчин нагрівали при перемішуванні до 75 °С. після чого 25% розчин аміаку додавали по краплях до розчину нітрату кальцію для отримання базового рН (рН = 12).

Розчин №2: Приготували 0,06 М розчину  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Потім, для отримання гідроксиапатиту, по краплях додавали другий розчин до першого при перемішуванні та нагріванні до 80 °С впродовж двох годин. Через дві години рН знизили до 9. Верхній розчин видалили зціджуванням. Після цього, осад промивали три рази, поки не отримали рН $\approx$ 7. Після зціджування, розчин із суспензією ГА використали для термічної обробки осаджуванням на зразки.

##### 3.1.2 Нанесення гідроксиапатитних покриттів

В якості основи для термічної обробки використовували зразки Ti-6Al-4V (клас 4) розміром 4,2x3,48x7,98 мм. Зразки для термічно нанесених покриттів (ТНП) попередньо обробляли піскоструминною обробкою 1-2 рази з тиском у 4,5 та 6,5 бар, щоб отримати шорстку поверхню (табл. 3.1). Після піскоструминної

обробки застосовували два типи травлення: у 20% розчині щавлевої кислоти, у 20% NaOH або послідовно в обох. Наприкінці, всі зразки обробляли 20% розчином  $H_3PO_4$  протягом 1 хв. Для контрольної групи, ті самі зразки без попередньої піскострумінної обробки ретельно промивали дистильованою водою з подальшим промиванням етиловим спиртом (табл. 3.1, зразок 9).

Процес термічного осадження проводили за допомогою електрохімічного блоку з катодом та анодом із системою охолодження, наданою Nanoprime (Польща) та оснащеною імпульсним біполярним джерелом постійного струму Solvix Power Supply RS / RS-485 із програмним забезпеченням Solvix (Solvix GmbH, Швейцарія). Температуру електроліту підтримували нижче 25 °C за допомогою системи охолодження. Частота була однаковою для всіх експериментів - 100 кГц.

Таблиця 3.1. – Підготовка зразків

№ зразка	Попередня обробка поверхні	Параметри осадження		
		U, V Дано / Реальне	I, A Дано / Реальне	Час, с
1	Піскострумінна обробка, 6,5 бар, 2р, 20% NaOH 3 г, 20% $H_3PO_4$ 1 хв	350/180	6 / 6,13	60
2	Піскострумінна обробка, 6.5 бар, 1р, 20% NaOH 3 г., 20% $H_3PO_4$ 1 хв	350/173	6 / 6,13	30
3	Піскострумінна обробка, 6.5 бар, 1р, 20% щавелева кислота 2 г, 20% $H_3PO_4$ 1 хв	350/172	6 / 6.1	60
4	Піскострумінна обробка, 6,5 бар, 2р, 20% щавелева кислота 4 г, 20% $H_3PO_4$ 1 хв	350/180	6 / 6,12	30
5	Піскострумінна обробка, 4.5 бар, 2р, 20% щавелева кислота 4 г, 20% NaOH 1 г, 20% $H_3PO_4$ 1 хв	350/240	6 / 6.28	30
6	Піскострумінна обробка, 6.5 бар, 1р, 20 % щавелева кислота 3 г, 20% $H_3PO_4$ 1 хв	350/280	6 / 5.30	30
7	Піскострумінна обробка, 4,5 бар, 1р, 20% щавелева кислота 3 г, 20% $H_3PO_4$ 1 хв	350/283	6 / 5,90	30
8	Піскострумінна обробка, 4,5 бар, 1р, 20% щавелева кислота 4 г, 20% $H_3PO_4$ 1 хв	350 / 258	6 / 6,06	30
9	Без попередньої обробки	350/247	6 / 2.02	30

В якості катода використовувалася титанова камера, яка містить електроліт, а титанова основа, занурена в електроліт, використовувалася як анод. Ванна з електролітом під час процесу охолоджувалася водою для підтримки температури ванни близькою до кімнатної. Під час процесу розчин електроліту постійно перемішували за допомогою магнітної мішалки для забезпечення однорідної концентрації електроліту і розсіювання тепла, що виділяється. Після обробки зразки очищали дистильованою водою і сушили на повітрі при кімнатній температурі.

### 3.1.3 Характеристика матеріалів

Морфологічний аналіз отриманих композитів проводився за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEO-SEM Inspect S50-B) з енергодисперсійним спектрометром AZtecOne з детектором X-MaxN20 (Oxford Instruments plc.). Рентгеноструктурний аналіз (PCA) проводився на рентгенівському дифрактометрі DRON-3M (Bourestnik, [www.bourestnik.ru](http://www.bourestnik.ru)), підключеному до автоматизованої системи управління для контролю за експериментом і обробки даних. Використовували  $\text{CuK}\alpha$ -випромінювання (довжина хвилі 0,154 нм) з методом фокусування Бреґґа-Брентано. Струм і напруга рентгенівської трубки становили 20 мА і 40 кВ відповідно. Сканування виконували в режимі безперервної реєстрації с  $0,02^\circ$  шагом та швидкістю сканування  $1^\circ/\text{хв}$  в діапазоні  $2\theta$  від  $10^\circ$  до  $60^\circ$ . Всі експериментальні дані оброблялися за допомогою пакета програм DifWin-1 (Etalon-TC, [www.specord.ru](http://www.specord.ru)). Ідентифікацію фаз проводили з використанням карткового каталогу JCPDS (Об'єднаний комітет по порошковим дифракційним стандартам).

Структурні компоненти молекул ідентифікували методом інфрачервоною Фур'є спектроскопією з використанням приладу ThermoNicolet Nexus 470, придбаного у Thermo Fisher Scientific (Уолт, Массачусетс, США), оснащеного адаптером ATR. Вимірювання та аналіз спектрів проводилися за допомогою



програмного забезпечення, що постачається до приладу. Спектри реєструвалися в спектральному діапазоні  $550\text{-}4000\text{ см}^{-1}$  з номінальним дозволом  $4\text{ см}^{-1}$  і 32 скануванням для кожного вимірювання. Перед аналізом всі зразки були висушені.

### 3.1.4 Вимірювання контактного кута

Статичний кут змочування дає цінну інформацію про властивості поверхні. Крайовий кут змочування часто використовується для характеристики змочування поверхні. Статичний контактний кут дає цінну інформацію про гідрофобні властивості поверхні. Експерименти з вимірювання крайового кута (КК) проводили з використанням оптичного приладу на основі відео зйомки для вимірювання крайового кута змочування (OCA 15 EC, Series GM-10-473 V-5.0, Data Physics, Filderstadt, Німеччина). Краплі надчистої води об'ємом близько 0,5 мкл капали на тверду поверхню зразків через шприц при кімнатній температурі. КК розраховувався за допомогою системи освітлення та програмного забезпечення [67]. Було виміряно не менше п'яти різних положень кожної поверхні, і було записано середнє значення. Оптичний аналіз крапель, що звисають з дозуючої голки або поміщених на тверду поверхню, полегшує визначення різних поверхневих і міжфазних показників. Крайовий кут змочування, який крапля рідини встановлює на твердій поверхні, характеризує змочуваність твердого тіла даною рідиною.

Таким чином, змочування титанових стрижнів була визначена кількісно, методом лежачої краплі. Були отримані кути між лінією до краплі на трифазному кордоні тверде тіло/рідина/газ і горизонтальною базовою лінією твердої поверхні. КК ( $\theta$ ) характеризує гідрофільність поверхні при використанні води в якості змочувального агента [68]. Кути контакту з водою нижче  $90^\circ$  позначають поверхню як гідрофільну і вказують на те, що змочування поверхні є сприятливим, і рідина буде поширюватися по великій площі поверхні, в той час як поверхні із кутом контакту з водою більше  $90^\circ$  вважаються гідрофобними і

зазвичай означають, що змочування поверхні є несприятливим [69]. Дані КК були записані для води високого ступеню очистки як мінімум для трьох паралельних проб.

### **3.1.5 Вимірювання шорсткості поверхні**

Шорсткість поверхні - це кількісне значення геометричного контуру поверхні. Це було визначено методом тактильного щупа, в якому двомірний профіль вимірюється механічно шляхом сканування кінчика кантильвера по поверхні [70]. Характеристики шорсткості були отримані більш 10 мм з використанням вимірювача шорсткості поверхні (Surftest SJ-301, Mitutoyo, Kawasaki, Kanagawa, Japan). У відповідності зі стандартами EN ISO 4287: 1999 [71] і DIN 4768 [72] були досліджені наступні параметри шорсткості: середнє арифметичне суми значень профілю шорсткості ( $R_a$ ), середня висота від піку до западини ( $R_z$ ).

### **3.1.6 Експерименти на культурі клітин**

Клітини (тип клітин U2OS) вирощували на матрасах з площею поверхні 75 см<sup>2</sup> за стандартних умов культивування на вологому повітрі, що містить 5% CO<sub>2</sub>, при температурі 37 °С з оновленням середовища кожні 2-3 дні [73]. Використовували модифіковану Дульбекко суміш середовища/поживна суміш F-12 (DMEM / F-12) з L-глутаміном, що містить 100 одиниць на мл<sup>-1</sup> пеніциліну, 100 мкг/мл<sup>-1</sup> стрептоміцину, 2,5 мкг/мл<sup>-1</sup> амфотерицина В і 10% фетальну бичачу сироватку. Перед посівом клітин всі зразки стерилізували в автоклаві; кожен зразок поміщали в окрему лунку 24-луночного планшета для культивування клітин і занурювали в DMEM на ніч. На наступний день середовище видаляли, і клітини U2OS висували на кожен зразок і в лунки з необробленими зразками (в якості негативного контролю) при щільності 10<sup>4</sup> клітин на лунку. Адгезію клітин через 24 години і проліферацію клітин у зразках оцінювали за допомогою

колориметричного аналізу Alamar blue, який використовується для вимірювання життєздатності клітин. Alamar blue (Invitrogen) додавали в кількості, що дорівнює 10% від обсягу середовища, в кожен лунку. В якості негативного контролю розчин Alamar blue додавали в лунки, що містять тільки культуральне середовище без клітин. В якості позитивного контролю розчин Alamar blue додавали в лунки, що містять тільки клітини без зразків (контроль ТКФ). Планшети інкубували протягом восьми годин при 37 °C в темряві. Потім середу переносили в інший 96-луночний планшет, і вимірювали оптичну щільність за допомогою планшет-рідера Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Уолт, Массачусетс, США) при довжинах хвиль 570 і 595 нм. Кількість клітин визначали через різні часові інтервали: 1 і 7 днів. Всі експерименти повторювали тричі.

### **3.1.7 Аналіз продукції колагену**

Колаген, синтезований клітинами U2OS і накопичений в зразках, був виявлений шляхом фарбування барвником Sirius Red. Фарбування проводили наступним чином: на 14-й і 21-й дні інкубації зразки переносили в інші 24-луночні планшети і тричі промивали крижаним PBS (4 °C). Потім 1,5 мл розчину Буена додавали в кожен лунку на 1 годину при кімнатній температурі. Після видалення розчину зразки промивали холодною водопровідною водою і сушили в витяжній шафі протягом ночі. На наступний день до зразків додавали 1,5 мл барвника Sirius Red на 1 годину, потім видаляли і кожен лунку промивали чотири рази 0,01 М розчином HCl. У кожен лунку додавали 1 мл 0,1 М розчину NaOH для отримання зв'язаного барвника. Планшет поміщали на шейкер на 30 хвилин. Після цього 100 мкл отриманого барвника з кожної лунки переносили в 96-луночний планшет, і вимірювали оптичну щільність з використанням планшет-рідера Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Уолт, Массачусетс, США) при довжині хвилі 550 нм.

## 3.2 Результати

### 3.2.1 Характеристика матеріалів

На рисунку 3.1 показані ІЧ-Фур'є спектри гідроксиapatиту, використаного для термічного нанесення покриття.

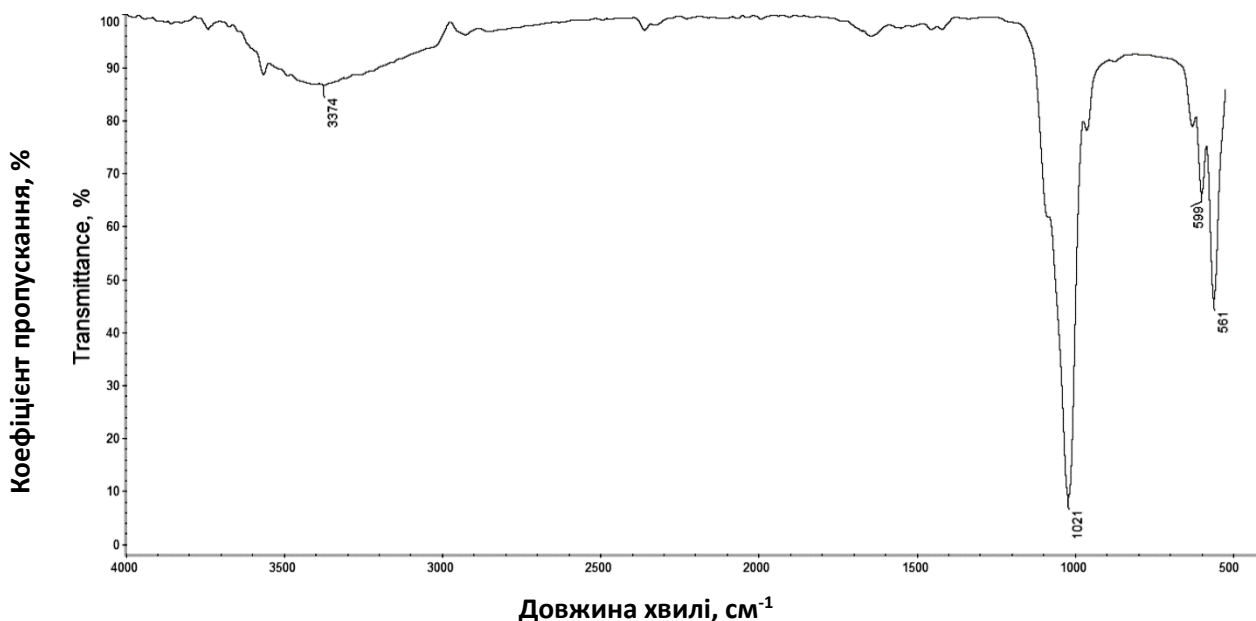


Рисунок 3.1 – ІЧ-Фур'є-спектр ГА, використаного для осадження

Піки поглинання, розташовані при 1092 та 1033  $\text{cm}^{-1}$ , походять від асиметричного розтягнення ( $\nu_3$ )  $\text{PO}_4^{3-}$ , а при 566 і 603  $\text{cm}^{-1}$  були віднесені до вигинових коливань ( $\nu_4$ )  $\text{PO}_4^{3-}$  відповідно. Симетричні валентні коливання ( $\nu_1$  і  $\nu_2$ )  $\text{PO}_4^{3-}$  також спостерігалися при області близько 961  $\text{cm}^{-1}$ , в той час як низький гострий пік при 3573  $\text{cm}^{-1}$  відповідав валентним коливанням решітки ОН-іонів [73, 74]. Типові смуги ГА, які можна віднести до  $\text{PO}_4^{3-}$  асиметричного розтягнення розташованому на частоті коливань 1021  $\text{cm}^{-1}$  валентному ( $\nu_3$ ), 599-561  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ), і валентному коливанню О-Н при 3374  $\text{cm}^{-1}$ , були виявлені в отриманому зразку гідроксиapatиту.

Результати рентгеноструктурного аналізу (рис. 3.2) показують, що отриманий зразок відповідає гідроксиapatиту (JCPDS 9-0432). Для попередньої

обробки використовували свіжоприготовлений гідроксиapatит у вигляді суспензії. Спікання при 900 °С використовували під час рентгеноструктурного дослідження порошку для перевірки наявності  $\beta$ -трикальцій фосфата ( $\beta$ -ТКФ). Відсутність фази  $\beta$ -ТКФ показує, що отриманий гідроксиapatит був стехіометричним. Параметри решітки отриманих зразків представлені в Таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Параметри решітки (a і c) і Xs для ГА в порівнянні зі спеченою при 900 °С і стандартної картою JCPDS

ІКП (°)	JCPDSO	свіжоприготовлений ГА	оброблений при 900 °С ГА
0 0 2	25,88	26,00	26,15
2 1 0	28,97	29,25	29,20
2 1 1	31,77	31,90	32,05
1 1 2	32,20	33,05	32,45
3 0 0	32,90	-	33,20
2 0 2	34,05	34,15	34,35
3 1 0	39,82	39,85	40,10
3 1 2	48,10	49,55	48,35
2 1 3	49,47	-	49,75
3 2 1	50,49	-	50,75
4 1 0	51,29	53,25	51,55
4 0 2	52,10	-	52,35
0 0 4	53,15	-	-

Піки ГА в (0 0 2), (2 1 1) та (2 0 2) площинах, яка присутня на дифрактограмах сплавлених і приготованих зразків, інші відповідні площини для ГА, як визначено стандартом JCPDS, включаючи (1 1 2), (3 1 2), (2 1 3), (3 2 1), (4 1 0), (4 0 2) близькі до отриманих для зразків, сплавлених при 900 °С протягом 1 години. Інші фази, крім гідроксиapatиту, що не спостерігаються як у вихідних, так і в сплавлених зразках.

Попередня хімічна обробка Ті (ступінь 4) не впливає на фазовий склад шару гідроксиapatиту. При попередній кислотній обробці застосовувалися два типи травлення: в 20% щавлевої кислоти, в 20% NaOH або послідовно в обох випадках після піскоструминної обробки. Нарешті, всі зразки були оброблені 20% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> протягом 1 хв.

Морфологія отриманих термічним осадженням гідроксіапатитових покриттів представлена на рис. 3.3. У всіх випадках можна спостерігати однорідні покриття з шорсткою поверхнею. Попередня обробка поверхні дуже впливає на отримані покриття. Морфологія поверхні демонструє неправильну і шорстку структуру з безліччю дрібних отворів, які спостерігаються при великому збільшенні ( $\times 2000$ ). Крім того, спостерігаємо дрібні мікроямки і гострі краї. Характерні розміри представлені в таблиці 3.3.

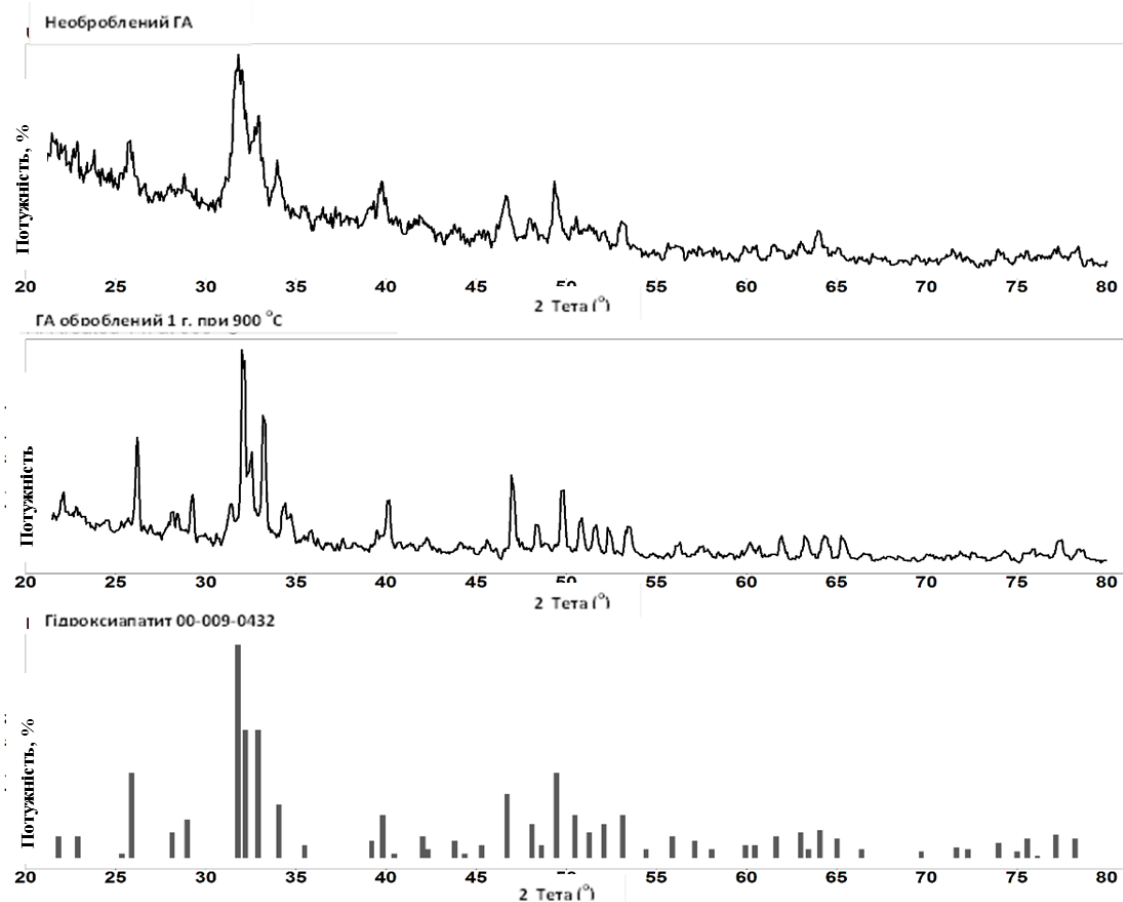


Рисунок 3.2 – РД отриманого і сплавленого при 900 °C порошку ГА

Ці морфологічні характеристики поверхні не змінилися після нанесення ГА покриття. Покриття ГА є агломератами неправильної форми для всіх зразків, крім 6 і 7, які були покриті однорідним шаром ГА. Кристалами ГА були заповнені отвори і ямки. Зразок без обробки має неоднорідний шар ГА.

Таблиця 3.3 – Розміри частинок ГА і їх розподіл на поверхні

Номер зразка	Структура поверхні (отвори, ямки) мкм <sup>2</sup>				ГА агломерати, мм <sup>2</sup>				N агломератів/мм <sup>2</sup>
	Середнє	СтВідх	Мін	Макс	Середнє	СтВідх	Мін	Макс	
1	4,82	6,76	0,22	39,61	0,0304	0,0161	0,0051	0,0682	11,11
2	5,03	6,16	0,38	29,96	0,0141	0,0066	0,0011	0,0361	11,56
3	24,116	25,73	0,19	78,29	0,0282	0,0189	0,0045	0,1039	8,39
4	18,26	20,019	0,19	78,29	0,0190	0,0120	0,0047	0,0835	10,00
5	10,75	12,67	0,49	58,12	0,0218	0,0124	0,0053	0,0620	5,89
6	19,29	19,23	0,2	79,31	Повністю покриті, однорідний шар				
7	13,18	13,67	0,50	55,13	Повністю покриті, однорідний шар				
8	15,66	16,25	0,48	82,49	0,0428	0,0488	0,0026	0,2123	5,30
9	Без обробки				Повністю покриті, неоднорідний шар.				

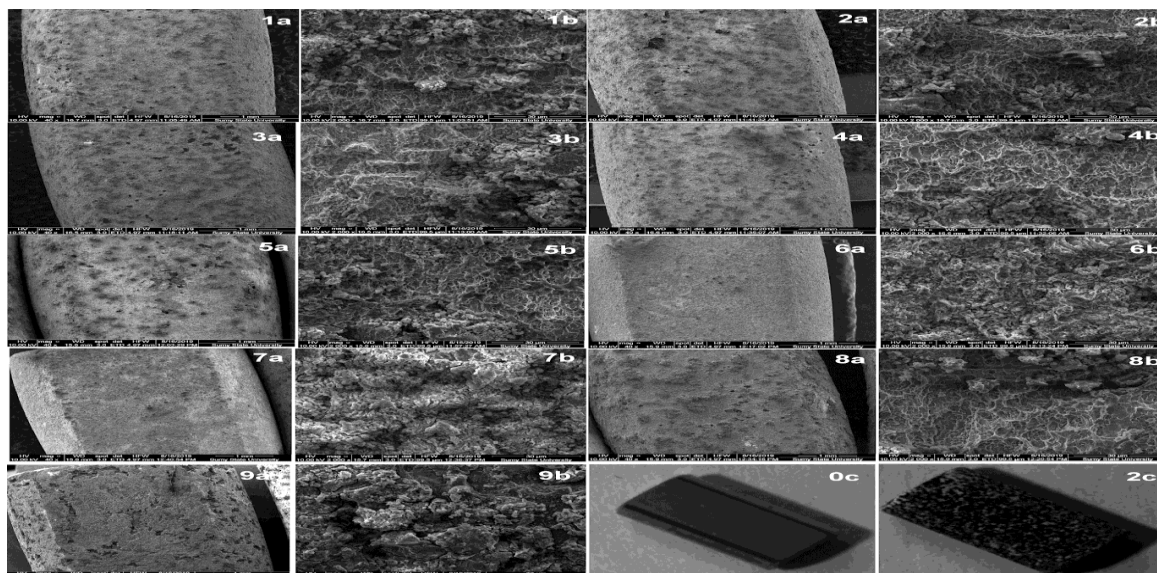


Рисунок 3.3 – Морфологія отриманих зразків 1-9 кальцій-фосфатних покриттів при а)  $\times 40$  і б)  $\times 2000$  в) загальний вигляд. Зразок 0с - без будь-якої обробки, а зразок 2с - загальний вигляд зразка. Оскільки загальний вигляд для всіх зразків з ГА є практично однаковим, була надана тільки одна фотографія.

Були обрані три різні варіанти попередньої обробки: 20% NaOH (зразки 1, 2), 20% щавлева кислота (зразки 3, 4, 6, 7, 8) і комбінація попередньої обробки 20% щавлевою кислотою 4 г, 20% NaOH 1 г (зразок 5) (рис. 3.4).

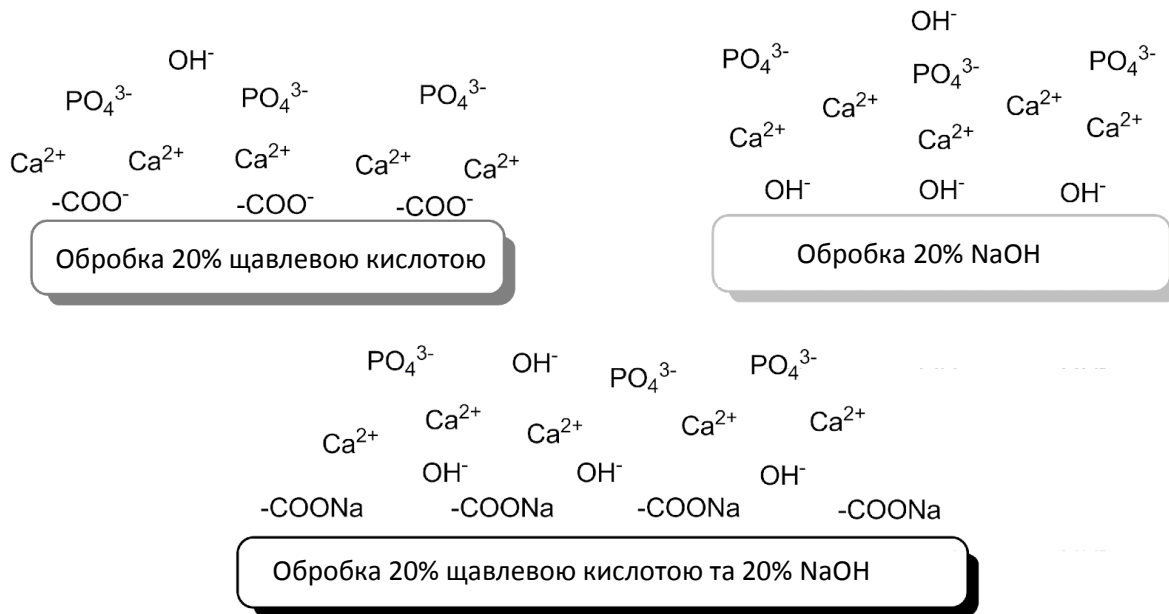


Рисунок 3.4 – Попередня обробка поверхні зразків після піскоструминної обробки кислотою, лугом або їх сумішшю

Зразки 1 та 2 були попередньо оброблені 20% розчином NaOH протягом трьох годин і відрізняються тільки двома циклами піскоструминної обробки (зразок 1) і зменшеним часом осадження гідроксиапатиту (зразок 2). Зразки 3 і 4 мають однакову попередню обробку, але відрізняються двома циклами попередньої обробки для 4-го зразка, потужністю і часом осадження. Зразки 3 і 6 відрізняються за часом попередньої обробки 20% щавлевої кислотою, потужності і часу осадження. Зразки 2 і 4 розрізняються типом попередньої обробки 20% NaOH (для зразка 2) і 20% щавлевої кислотою (для зразка 4). Зразок 5 має обидва типи попередньої обробки 20% NaOH і 20% щавлевої кислотою. Зразки 6 і 7 мають однакові умови, але відрізняються тиском піскоструминної обробки. Зразки 7 і 8 мають однакові умови, але відрізняються часом просочування в 20% щавлевій кислоті. Зразок 9 являє собою покриття ГК, нанесене на необроблену поверхню. Всі гідроксиапатитові покриття, отримані термічним осадженням, мають однорідні поверхні. Найбільш однорідна поверхня була отримана для зразка 6.



### 3.2.2 Вимірювання змочування та шорсткості поверхні

Результати вимірювань шорсткості та змочування наведені у Таблиці 3.4 та на рисунку 3.5.

Таблиця 3.4 – Характеристики шорсткості та змочування отриманих покриттів

Номер зразка	Шорсткість, мкм		Змочування
	Ra <sup>1</sup>	Rz <sup>2</sup>	
1	3,86 ± 0,41	22,38 ± 2,21	0 °
2	2,63 ± 0,1	17,48 ± 1,35	0 °
3	4,13 ± 0,1	27,7 ± 2,33	56,62 °
4	2,7 ± 0,1	18,61 ± 0,88	0 °
5	2,54 ± 0,28	15,82 ± 2,42	0 °
6	2,43 ± 0,09	15,58 ± 0,37	0 °
7	2,4 ± 0,1	15,87 ± 0,98	0 °
8	5,37 ± 0,94	37,16 ± 4,73	0 °
9	6,51 ± 0,15	40,66 ± 3,79	22,97 °

Де: 1Ra: середнє арифметичне сум всіх значень профілю

2Rz: середнє значення загальної вимірної довжини

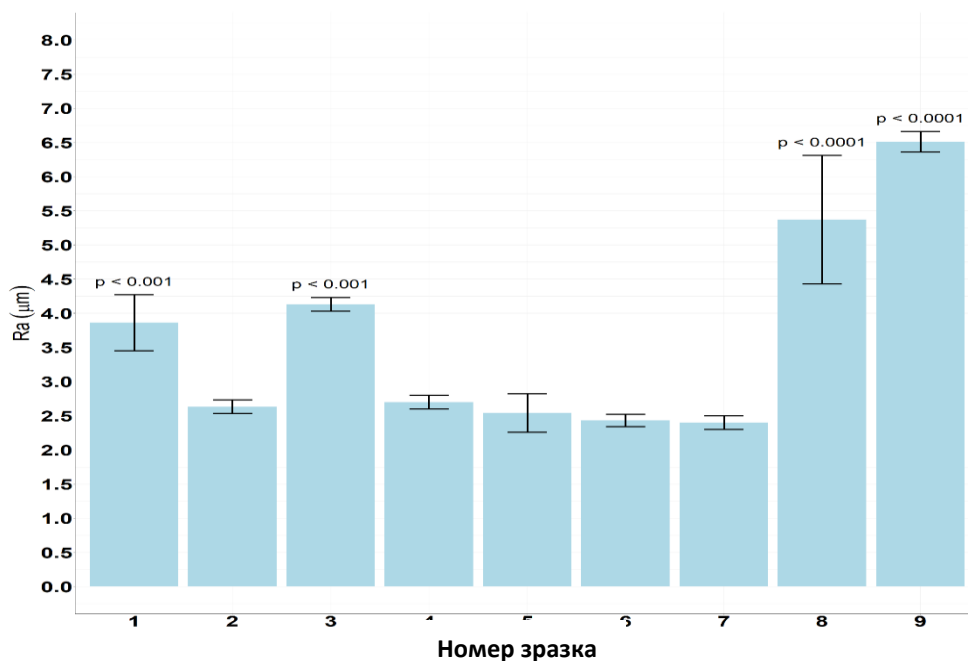


Рисунок 3.5 – Шорсткість поверхні (Ra) покриттів ГА, отриманих методом термічного напилення

Результати показали статистично значущу відмінність між значенням шорсткості серед отриманих покриттів ГА. Шорсткість поверхні (Таблиця 3.4) відображає інформацію про профілі лінії, отримані за допомогою методу тактильного щупа, відповідно, для покриттів ГА. Слід зазначити, що нанесений шар ГА значно збільшує ( $P < 0,0001$ ) шорсткість поверхні в разі зразків 8 та 9 до 5,37 і 6,51 мкм, в той час як є подібне значення у випадку зразків 2, 4, 5, 6, 7 ГА покриття. Подібність шорсткості поверхні наступних покриттів ( $R_a$ ) 2,4-2,7 мкм статистично не відрізняється (таблиця 3.4). Відповідні вимірювання шорсткості наведені на рис. 3.6. Було також відзначено, що нанесення покриттів з гідроксиапатиту призвело до збільшення середніх значень  $R_a$  для ГА покриттів 1 і 3 з 3,86 до 4,13 мкм ( $P < 0,001$ ). Зразки 3 і 8 з ГА покриттям були отримані методом термічного осадження на поверхню, піддану піскоструминному очищенню, шляхом попередньої обробки 20% щавлевої кислотою. Значення  $R_a$  зразків 2 і 4-7 мають аналогічні значення профілю поверхні, які є відносно нижчими, ніж у зразків 1 і 3 (рис. 5). Зразки 2 і 4-7 порівнювали із зразком 8, який показав підвищену шорсткість поверхні (рис.5). Однак серед усіх зразків необроблена поверхня показала більш високі значення  $R_a$  і  $R_z$ . Це можна пояснити неоднорідним розподілом ГА на плоскій поверхні, в той час як на піскоструминних зразках наночастинки ГА вбудовуються в пори, тому отримана поверхня стає шорсткою.

Кут змочування, виміряний для контрольного зразка 9, становив  $22,97^\circ$ , як показано в таблиці 4. Значення кута змочування інших покриттів становили  $0^\circ$ , за винятком зразка 3 ( $56,62^\circ$ ), для якого поверхня має повне змочування. Згідно з отриманими даними, зразки 3 і 9 показали найвище змочування.

### 3.2.3 Експерименти на культурі клітин

Аналіз відновлення резазурином показав задовільну адгезію клітин остеобластів U2OS через 1 день експерименту (мал. 6). Немає суттєвої різниці між необробленими полірованими поверхнями і покритими ГА з попередньою

обробкою піскоструминним очищенням. Навпаки, полірована поверхня з ГА покриттям демонструє значно меншу адгезію клітин. Відомо, що звичайна обробка не забезпечувала достатньої адгезії ГА до металевої основи, яка може бути основним фактором для чистого розподілу клітин в нашому експерименті. Через 7 днів ми підтверджуємо проліферацію клітин U2OS на полірованому Ті-субстраті і в більшості основ покритих ГА без суттєвої різниці між групами, але зразки №5 і №8 демонструють значно меншу проліферацію, ймовірно, через несприятливу структури поверхні або хімічного складу. Слід зазначити, що у нас спостерігається значне зростання зміни резазурину в зразку 9 (без попередньої обробки), але зі значно меншими активностями в порівнянні з полірованими.

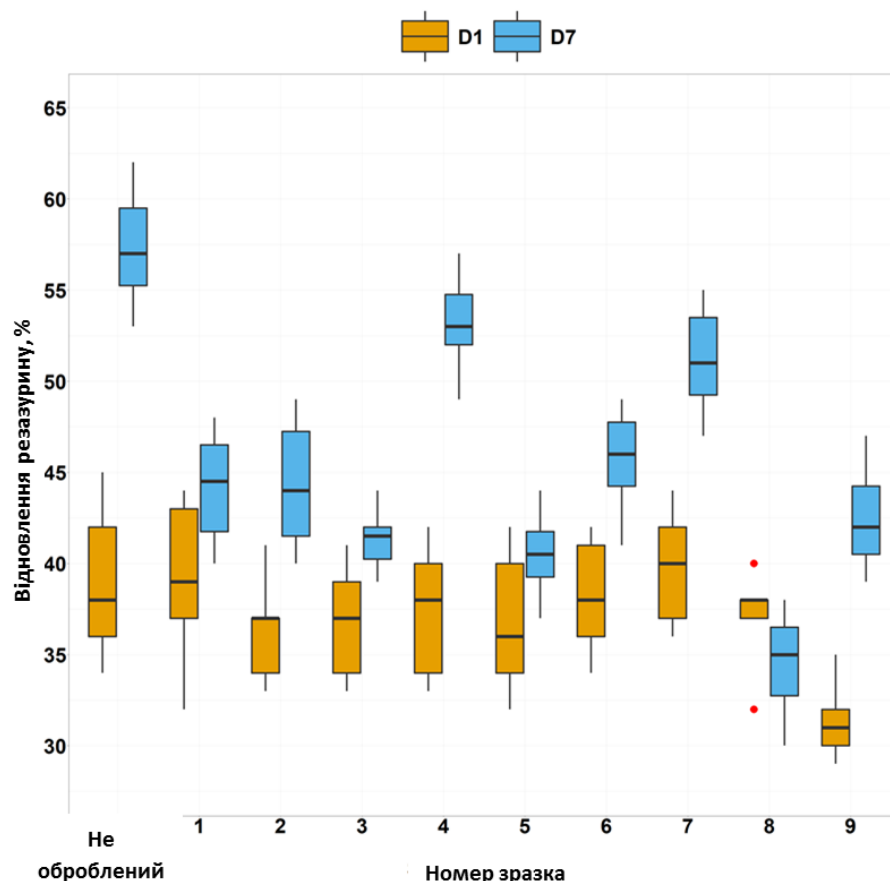


Рисунок 3.6 – Аналіз відновлення резазурину клітинами U2OS через 1 і 7 днів після посіву. Статистична значимість оцінювалася в порівнянні з необробленим (полірованим) зразком Ті (значення  $p$  оцінюється після виконання двостороннього тесту дисперсії для двох зразків).

Щоб перевірити гіпотезу про відмінності між D1 і D7, був використаний ANOVA (рис. 3.7). Нормальність була перевірена за допомогою тесту Шапіро-Уїлкі, де результати кожної групи відповідають нормальному розподілу (значення  $p$  (D1) = 0,4047798 і (D2) = 0,4719734).

Тест Бартлетта на однорідність дисперсій показує, що значення  $p$  дорівнює  $8,652 \times 10^{-5}$ . Отже, дисперсність неоднорідна. Ось чому дисперсний аналіз був підтверджений тестом суми рангів Крускала-Уолліса, згідно з яким значення  $p$  складає  $3,021 \times 10^{-10}$ , тому існує цінна різниця. Результати аналізу ANOVA показують  $F = 55,35$ ,  $p = 2,56 \times 10^{-11}$ . Перевірка нормальності залишкового розподілу забезпечувалася критерієм Шапіро-Уїлкі, який підтвердив нормальний розподіл ( $p$ -значення 0,5658). Аналіз ANOVA показує цінну різницю між D1 і D7 ( $P = 2,56 \times 10^{-11}$ ). Цей висновок був підтверджений сумою рангів Крускала-Уолліса. (значення  $p = 3,021 \times 10^{-10}$ ).

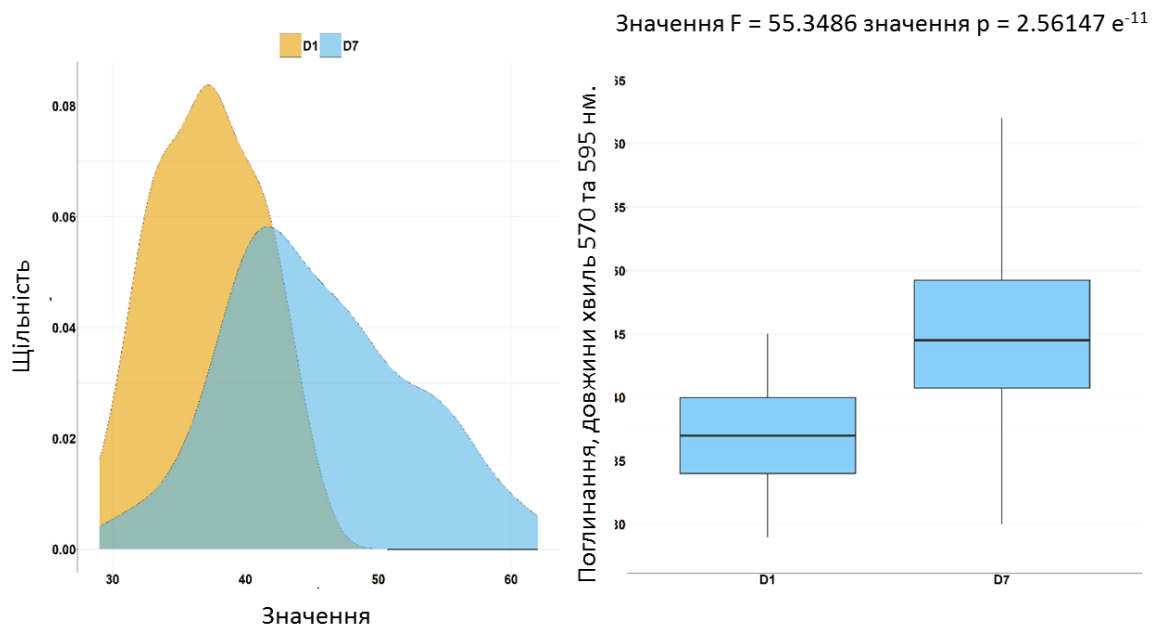


Рисунок 3.7 – Результати аналізу ANOVA: а) розподіл в групах D1 і D7; б) результати дисперсійного аналізу для D1 і D7.

### 3.2.4 Аналіз продукції колагену

Аналіз продукції колагену може значно оцінити активність клітин в період проліферації, і ми можемо підтвердити низьку продукцію колагену як на необроблених (полірованих), так і на полірованих ГА поверхнях в порівнянні з ГА поверхнями, підданими піскоструминному очищенню (рис. 3.8).

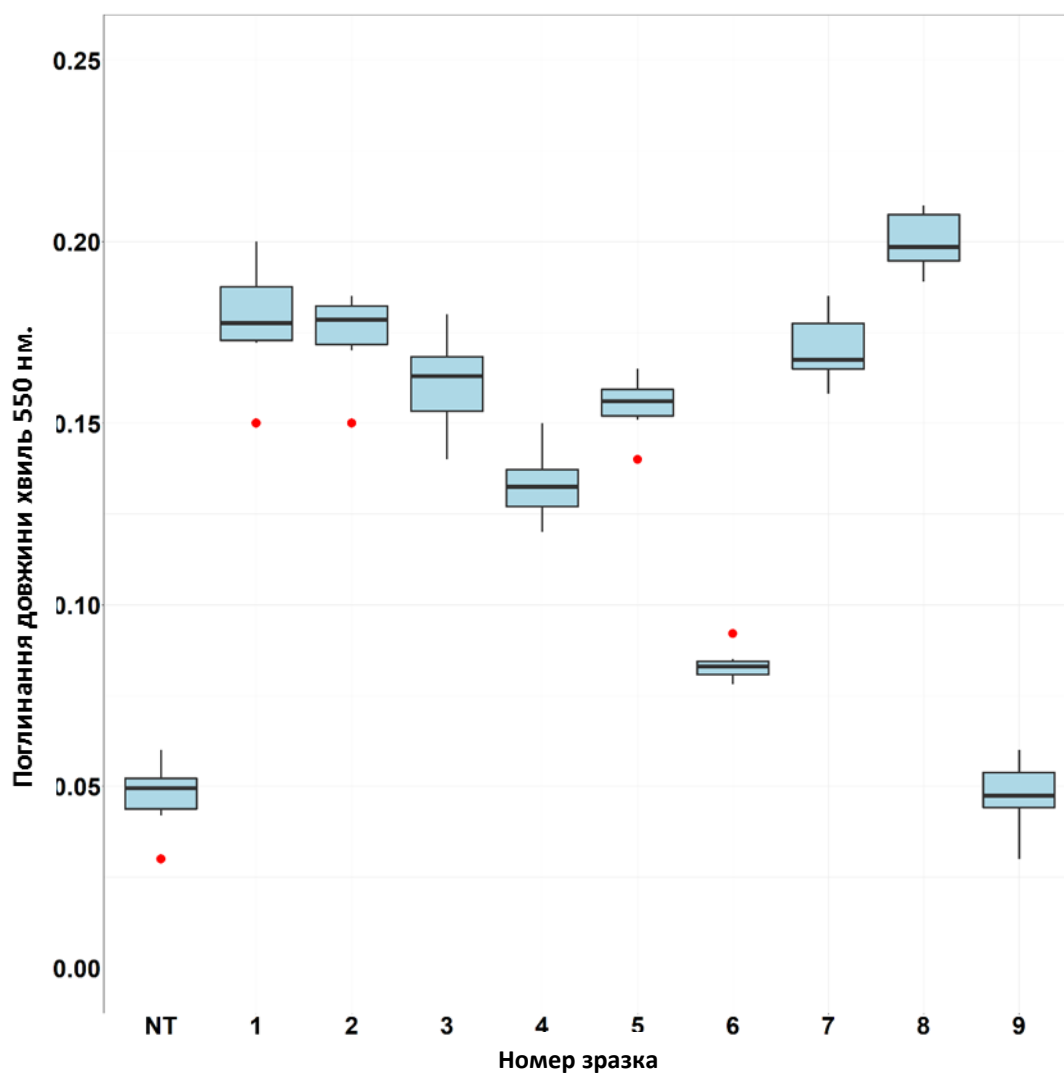


Рисунок 3.8 – Рівень поглинання Sirius Red через 14 днів після посіву клітин U2OS

### 3.3 Обговорення

Кислотне травлення робить поверхню більш шорсткою і видаляє всі після піскоструминної обробки. Додаткова попередня обробка 20% NaOH викликала осадження ГА на попередньо обробленій поверхні, але не впливає на фазовий склад (фаза ГА), оскільки вона повністю сформувалася перед термічним осадженням.

Збільшення значень шорсткості після такого виду попередньої обробки можна пояснити ретельним промиванням і травленням поверхні після піскоструминної обробки (зразок 8 попередньо обробляли протягом чотирьох годин). Отримана поверхня була шорсткою, і після попередньої обробки покриття ГА також мають шорстку поверхню.

Всі виміряні кути змочування нижче  $90^\circ$ , що означає, що отримані поверхні ГА гідрофільні і вказує на те, що змочування поверхні сприятливе, і рідина буде поширюватися по великій площі поверхні. Гідрофільність отриманих покриттів зробила їх придатними для біомедичного застосування в стоматології.

Зразок 6 показав значно меншу продукцію колагену протягом двох тижнів культивування в порівнянні з іншою обробленою ГА поверхнею. Однак рівень поглинання Sirius Red все ще вище в порівнянні з контролем (NT і №9). Добре відомо, що вироблення колагену є критичним фактором для успішної інтеграції імплантату [74], і топографія поверхні і хімічний склад повинні впливати на адгезію і активність клітин остеобластів [75]. Підвищення середньої шорсткості було показано (як *in vitro*, так і *in vivo*), що поверхні з більш високим Ra мають більш високу швидкість остеоінтеграції [76, 77]. Крім того, хімічна модифікація, включаючи фосфат кальцію (CaP) або ГА, має високу остеокондуктивних і продемонструвала остеоінтеграційний потенціал *in vivo* [78, 79]. Нарешті, обидві стратегії (наприклад, шорсткість поверхні і біологічно активні покриття) можуть бути об'єднані для досягнення взаємопідсилюючого ефекту. Але кращі стратегії комбінації і роль кожного фактора в остеоінтеграції все ще

обговорюються. Наші дані показують, що шорсткість відіграє важливу роль в адгезії і проліферації клітин, але ГА покриття забезпечує додаткові стимули для клітинної активності (синтезу колагену).

### **Розділ 3 висвітлений у статті:**

Yanovska, A. et al. Cell viability and collagen deposition on hydroxyapatite coatings formed on pretreated substrates. 2021, Volume 258, 15, 123978 (article in press).

## ВИСНОВКИ

1. Під час РЕО утворюються оксиди Ті та інші реакційноздатні форми сполук Ті. Можна генерувати біоактивні шари з використанням сполук Са і Р на поверхнях імплантатів Ті зі збільшеною здатністю до остеоінтеграції. Розчин електролітного розчину №2 сприяв активній кристалізації апатитів після обробки РЕО імплантатів Ті. Однак швидкість кристалізації слід ретельно контролювати, оскільки занадто товсті шари апатиту мають обмежену механічну стійкість. Шари РЕО можуть підвищити електрохімічну стійкість до корозії.
2. РЕО може бути використаний для створення біоактивних поверхонь із покращеними властивостями щодо адгезії еукаріотичних клітин, одночасно пригнічуючи прикріплення та ріст бактерій.
3. Всі зразки після піскоструминної обробки мали шорстку поверхню, але покриття з ГА на зразках без попередньої обробки показали більш високі значення Ra і Rz. Шорсткість відіграє важливу роль в адгезії і проліферації клітин, але ГА покриття забезпечує додаткові стимули для клітинної активності, що виражається в синтезі колагену. Низький рівень вироблення колагену як на необроблених (полірованих), так і на полірованих поверхнях з ГА, в порівнянні з поверхнями з ГА після піскоструминної обробки. Аналіз відновлення резазурину показав задовільну адгезію остеобластних клітин U2OS через 1 день експерименту. Немає суттєвої різниці між необробленими полірованими поверхнями і ГА покриттями з попередньою обробкою піскоструминним очищенням.
4. Поверхні, піддані піскоструминній обробці, попередньо оброблені хімічною обробкою, з нанесеними ГА покриттями, роблять їх більш остеокондуктивними за рахунок збільшення синтезу колагену. Всі виміряні кути змочування були нижче 90 °, що вказує на утворення гідрофільних ГА поверхонь, коли рідина буде поширюватися по великій площі поверхні, що забезпечує їх придатність для біомедичного застосування в стоматології.



## ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Buser, D., von Arx, T., ten Bruggenkate, C., Weingart, D. Basic surgical principles with ITI implants. 2000. *Clinical oral implants research*, 11 Suppl 1, 59-68.
2. Darcey, J., Eldridge, D. Fifty Years of Dental Implant Development: a Continuous Evolution. 2016. *Dental historian: Lindsay Club newsletter*, 61 (2), 75-92.
3. Hafezeqoran, A., Koodaryan, R. Effect of Zirconia Dental Implant Surfaces on Bone Integration: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2017. *BioMed Research International*. 2017, art. no. 9246721.
4. Afrashtehfar, K.I., Del Fabbro, M. Clinical performance of zirconia implants: A meta-review. 2020. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 123 (3), 419-426.
5. Albrektsson, T., Chrcanovic, B., Mölne, J., Wennerberg, A. Foreign body reactions, marginal bone loss and allergies in relation to titanium implants. 2018. *European Journal of Oral Implantology*, 11, s37-s46.
6. Lugovskoy, A., Lugovskoy, S. Production of hydroxyapatite layers on the plasma electrolytically oxidized surface of titanium alloys. 2014. *Materials Science and Engineering C*, 43, 527-532.
7. Chouirfa, H., Bouloussa, H., Migonney, V., Falentin-Daudré, C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. 2019. *Acta Biomaterialia*, 83, 37-54.
8. Insua, A., Monje, A., Wang, H.-L., Miron, R.J. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. 2017. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105 (7), 2075-2089.
9. Gupta, A., Rathee, S., Suman, T., et al. Nicotine, the predictor of success or failure of dental implants: A retrospective study. 2018. *Contemporary Clinical Dentistry*, 9 (4), 597-600.
10. Smeets, R., Stadlinger, B., Schwarz, F., Beck-Broichsitter, B., Jung, O., Precht, C., Kloss, F., Ebker, T. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. 2016. *BioMed Research International*, 2016, art. no. 6285620.

11. Annunziata, M., Guida, L. The Effect of Titanium Surface Modifications on Dental Implant Osseointegration. 2015. *Frontiers of Oral Biology*, 17, 62-77.
12. Matykina, E., Arrabal, R., Skeldon, P., Thompson, G.E. Transmission electron microscopy of coatings formed by plasma electrolytic oxidation of titanium. 2009. *Acta Biomaterialia*, 5 (4), 1356-1366.
13. Tanase, C.E., Golozar, M., Best, S.M., Brooks, R.A. Cell response to plasma electrolytic oxidation surface-modified low-modulus  $\beta$ -type titanium alloys. 2019. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 176-184.
14. Kulkarni Aranya, A., Pushalkar, S., Zhao, M., et al. Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces. 2017. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105 (8), 2218-2227.
15. Chen, Q., Li, W., Ling, K., Yang, R. Investigation of growth mechanism of plasma electrolytic oxidation coating on Al-Ti double-layer composite plate. 2019. *Materials*, 12 (2), art. no. 272.
16. Pereira, B.L.; da Luz, A.R.; Lepienski, C.M.; Mazzaro, I.; Kuromoto, N.K. Niobium treated by Plasma Electrolytic Oxidation with calcium and phosphorus electrolytes *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018, 77, 347-352.
17. Marques Ida, S.; da Cruz N.C.; Landers, R.; et al. Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration. *Biointerphases*. 2015, 10, 041002.
18. Rack, H.J.; Qazi, J.I. Titanium alloys for biomedical applications. *J. Mat. Sci. Eng. C*. 2006, 26, 1269–1277.
19. Faghihi-Sani, M.A.; Arbabi, A.; Mehdinezhad-Roshan, A. Crystallization of hydroxyapatite during hydrothermal treatment on amorphous calcium phosphate layer coated by PEO technique. *J. Ceramics International*. 2013, 39, 1793–1798.
20. Heimann, R.B. The challenge and promise of low-temperature bioceramic coatings, in: *J. Surf. Coat. Techn.* 2016, 301, 1–5.
21. Ferraris, S.; Yamaguchi, S.; Barbani, N.; et al. Bioactive materials: In vitro investigation of different mechanisms of hydroxyapatite precipitation. *J. Acta Biomaterialia*. 2020, 102, 468–480.

22. Singh, G.; Sharma, N.; Kumar, D.; Hegab, H. Design, development and tribological characterization of Ti–6Al–4V/hydroxyapatite composite for bio-implant applications. *J. Mat. Chem. Phys.* V. 2020, 243, 122662.
23. Epinette, J. A.; Toni, A.; Willmann, G.; Eds. *Bioceramics in joint arthroplasty*. Georg Thieme, Stuttgart, New York. 2001, 84–91.
24. Creugers, N.; The survival of hydroxyapatite-coated implants is questioned. *Evidence-based Dentistry* 3. 2002, 3, 77-78.
25. Domínguez-trujillo, C.; Peón, E.; Chicardi, E.; et al. Sol-gel deposition of hydroxyapatite coatings on porous titanium for biomedical applications. *J. Surf. Coat. Technol.* 2018, 333, 158–162.
26. Ivanova, A.A.; Surmeneva, M.A.; Surmenev, R.A.; Depla, D. Structural evolution and growth mechanisms of RF-magnetron sputter-deposited hydroxyapatite thin films on the basis of unified principles. *J. Appl. Surf. Sci.* 2017, 425, 497–506.
27. Nishikawa, H.; Hasegawa, T.; Miyake, A.; et al. Effect of laser fluence and ambient gas pressure on surface morphology and chemical composition of hydroxyapatite thin films deposited using pulsed laser deposition. *J. Appl. Surf. Sci.* 2018, 427, 458–463.
28. Drevet, R.; Ben Jaber, N.; Fauré, J.; et al. Electrophoretic deposition (EPD) of nano-hydroxyapatite coatings with improved mechanical properties on prosthetic Ti6Al4V substrates. *J. Surf. Coat. Technol.* 2016, 301, 94–99.
29. He D.H.; Wang, P.; Liu, P.; et al. HA Coating Fabricated by Electrochemical Deposition on Modified Ti6Al4V Alloy. *J. Surf. Coat. Technol.* 2016, 301, 6–12.
30. Huang, H.; Lan, P.-H.; Zhang, Y.-Q.; et al. Surface characterization and in vivo performance of plasma-sprayed hydroxyapatite-coated porous Ti6Al4V implants generated by electron beam melting. *J. Surf. Coat. Technol.* 2015, 283, 80–88.
31. Levingstone, T.J.; Ardhaoui, M.; Benyounis, K.; Looney, L.; Stokes, J.T.; Plasma sprayed hydroxyapatite coatings: understanding process relationships using design of experiment analysis. *J. Surf. Coatings Technol.* 2015, 283, 29–36.

32. Pereira, B. L.; Beilner, G.; Lepienski, C. M.; et al. Oxide coating containing apatite formed on Ti-25Nb-25Ta alloy treated by Two-Step Plasma Electrolytic Oxidation. *J. Surf. Coat. Technol.* 2020, 382, 125224.
34. Kazek-Kesik, A.; Kalemba-Rec, I.; Simka, W. Anodization of a medical-grade Ti-6Al-7Nb alloy in a Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-hydroxyapatite suspension. *Materials (Basel)*. 2019, 12.
35. Rajesh, P.; Muraleedharan, C.V.; Komath, M.; Varma, H. Pulsed laser deposition and in vitro characteristics of triphasic - HASi composition on titanium. *J Mater Sci Mater Med.* 2011, 22, 1671-1679.
36. Kusakabe, S.; Rawls, H.R.; Hotta, M. Effects of mechanical properties of adhesive resins on bond strength to dentin. *Dent Mater.* 2016, 32, e55-62.
36. Rueden, C.T.; Schindelin, J.; Hiner, M.C.; et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data *BMC Bioinformatics.* 2017, 18, 529.
38. Kokubo, T. T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment *Acta Materialia.* 1998, 46, 2519-2527.
39. Mortazavi, G.; Jiang, J.; Meletis, E.I.; *Applied Surface Science.* 2019, 488, 370-382.
40. Pisarek, M.; Roguska, A.; Andrzejczuk, M.; et al. Effect of two-step functionalization of Ti by chemical processes on protein adsorption *Applied Surface Science.* 2011, 257, 8196-8204.
41. Sowa, M.; Parafiniuk, M.; Mouzêlo, C.M.S.; et al. DC plasma electrolytic oxidation treatment of gum metal for dental implants. *Electrochimica Acta.* 2019, 302, 10-20.
42. Chastain, J.; Moulder, J.F. Physical Electronics Inc., Eden Prairie, Minnesota, USA. 1995.
43. Jemat, A.; Ghazali, M.J.; Razali, M.; Otsuka, Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *BioMed research international.* 2015, 2015, 791725.
44. Mohedano, M.; Matykina, E.; Arrabal, R.; Pardo, A.; Merino, M.C. Metal release from ceramic coatings for dental implants. *Dent Mater.* 2014, 30, e28-40.

45. Marques, I.D.; Barao, V.A.; da Cruz, N.C.; et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application *Corrosion science*. 2015, 100, 133-146.
46. Khan, M.A.; Williams, R.L.; Williams, D.F. In-vitro corrosion and wear of titanium alloys in the biological environment *Biomaterials*. 1996, 17, 2117-2126.
47. de Souza, V.Z.; Manfro, R.; Joly, J.C.; et al. Viability and collagen secretion by fibroblasts on titanium surfaces with different acid-etching protocols *International journal of implant dentistry*. 2019, 5, 41.
48. Chung, C.J.; Su, R.T.; Chu, H.J.; et al. Plasma electrolytic oxidation of titanium and improvement in osseointegration *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013, 101, 1023-1030.
49. Polo-Corrales, L.; Latorre-Esteves, M.; Ramirez-Vick, J.E. Scaffold design for bone regeneration *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2014, 14, 15-56.
50. Rafieerad, A.R.; Ashra, M.R.; Mahmoodian, R.; Bushroa, A.R. Surface characterization and corrosion behavior of calcium phosphate-base composite layer on titanium and its alloys via plasma electrolytic oxidation: A review paper *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2015, 57, 397-413.
51. Etminanfar, M.R.; Khalil-Allafi, J.; Montaseri, A.; Vatankhah-Barenji, R. Endothelialization and the bioactivity of Ca-P coatings of different Ca/P stoichiometry electrodeposited on the Nitinol superelastic alloy. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2016, 62, 28-35.
52. Best, S.; Sim, B.; Kayser, M.; Downes, S. The dependence of osteoblastic response on variations in the chemical composition and physical properties of hydroxyapatite *J Mater Sci Mater Med*. 1997, 8, 97-103.
53. Monchau, F.; Hivart, P.; Genestie, B.; Chai, F.; Descamps, M.; Hildebrand H.F. Calcite as a bone substitute. Comparison with hydroxyapatite and tricalcium phosphate with regard to the osteoblastic activity *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2013, 33, 490-498.

54. Zhao, Q.M.; Li, X.K.; Guo, S.; et al. Osteogenic activity of a titanium surface modified with silicon-doped titanium dioxide *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2020, 110, 110682.
55. Li, J.; Cui, X.; Hooper, G.J.; Lim, K.S.; Woodfield, T.B.F. Rational design, bio-functionalization and biological performance of hybrid additive manufactured titanium implants for orthopaedic applications: A review *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020, 105, 103671.
56. Gui, N.; Xu, W.; Abraham, A.N.; et al. A comparative study of the effect of submicron porous and smooth ultrafine-grained Ti-20Mo surfaces on osteoblast responses *J Biomed Mater Res A*. 2018, 106, 2020-2033.
57. Wang, Q.; Hong, Y.B.; Huang, M.D.; Wang, Q.M.; Teng, W. W. Constructing self-adhesive and robust functional films on titanium resistant to mechanical damage during dental implanting *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2020, 110, 110688.
58. Prado, R.F.; Esteves, G.C.; Santos, E.L.S.; et al. In vitro and in vivo biological performance of porous Ti alloys prepared by powder metallurgy *PLoS One*. 2018, 13, e0196169.
59. Aparicio, C.; Ginebra, M.-P. *Mineralization of Fibers For Bone Regeneration*. Woodhead Publishing. 2016, 482.
60. Prasad, S.; Wong, R.C. Unraveling the mechanical strength of biomaterials used as a bone scaffold in oral and maxillofacial defects *Oral Science International*. 2018, 15, 48-55.
61. Prasad, S.; Suresh, S.; Hong, K.L.; et al. Biomechanics of alloplastic mandible reconstruction using biomaterials: The effect of implant design on stress concentration influences choice of material *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020, 103, 103548.
62. Mishchenko, O.; Ovchynnykov, O.; Kapustian, O.; Pogorielov, M. New Zr-Ti-Nb alloy for medical application: Development, chemical and mechanical properties, and biocompatibility *Materials*. 2020, 13, 1306.

63. Lopez-Quiles, J.; Forteza-Lopez, A.; Montiel, M.; et al. Effects of locally applied insulin-like growth factor-i on osseointegration *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019, 24, e652-e658.
64. Saruta, J.; Sato, N.; Ishijima, M.; et al. Disproportionate effect of sub-micron topography on osteoconductive capability of titanium *Int J Mol Sci*. 2019, 20.
65. Yanovska, A.; Kuznetsov, V.; Stanislavov, A.; Danilchenko, S.; Sukhodub, L. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-based coatings for medical implants obtained on chemically modified Ti6Al4V substrates, *Surface & Coatings Technology*. 2011, 205, 5324-5329.
66. Strnad, G.; Chirila, N.; Petrovan, C.; Russu, O. Contact angle measurement on medical implant Titanium-based biomaterials, *Procedia Technology*. 2016, 22, 946-953.
67. Yuan, Y.; Randall, Lee T. Contact angle and wetting properties, in: Bracco, G.; Holst, B.; (Eds.). *Surface Science Techniques, Springer Series in Surface Sciences 51*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2013, 1-34.
68. Bhushan, B. *Modern Tribology Handbook, Two Volume Set 1st Edition*, in: Bhushan, B.; (Eds.), CRC Press. 2000, 1760.
69. EN ISO 4287:(1999) Geometrical product specifications (GPS) – surface texture: profile method—terms, definitions, and surface texture parameters. International Organization for Standardization. Geneva: ISO. 1999, 36.
70. DIN 4768:(1990) Determination of values of surface roughness parameters Ra, Rz, Rmax using electrical contact (stylus) instruments; concepts and measuring conditions. Published by: Deutsches Institut für Normung E.V. (DIN). 1990, 3.
71. Huang, T. H.; Yang, C. C.; Ding, S. J.; et al. Biocompatibility of human osteosarcoma cells to root end filling materials *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater*. 2005, 72B, 140-145.
72. Yanovska, A.; Kuznetsov, V.; Stanislavov, A.; et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatine composite materials for orthopedic application, *J. Mat. Chem. Phys*. 2016, 183, 93-100.

73. Bee, S.-L.; Mariatti, M.; Ahmad, N.; Yahaya, B. H.; Abdul Hamid, Z. A. Bio-CAM 2017 Effect of the calcination temperature on the properties of natural hydroxyapatite derived from chicken bone wastes, *Materials Today: Proceedings*. 2019, 16, 1876-1885.
74. Huang, S.; Ulloa, A.; Nauman, E.; Stanciu, L. Collagen Coating Effects on Fe-Mn Bioresorbable Alloys, *J. Orthop. Res.* 2020, 38(3), 523-535.
75. Pereira, H.F.; Cengiz, I.F.; Silva, F.S.; Reis, R.L.; Oliveira, J.M. Scaffolds and coatings for bone regeneration, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2020, 31(3), 27.
76. Tavakoli, J.; Khosroshahi, M.E. Surface morphology characterization of laser-induced titanium implants: lesson to enhance osseointegration process, *Biomed. Eng. Lett.* 2018, 8(3), 249-257.
77. Gnilitzkyi, I.; Pogorielov, M.; Viter, R.; et al. Cell and tissue response to nanotextured Ti6Al4V and Zr implants using high-speed femtosecond laser-induced periodic surface structures. *J. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2019, 21, 02036.
78. Burtscher, S.; Krieg, P.; Killinger, A.; Al-Ahmad, A.; Seidenstücker, M.; Latorre, S.H.; Bernstein, A. Thin Degradable Coatings for Optimization of Osteointegration Associated with Simultaneous Infection Prophylaxis. *Materials (Basel)*. 2019, 12(21), 25.
79. Su, Y.; Cockerill, I.; Zheng, Y.; et al. Biofunctionalization of metallic implants by calcium phosphate coatings. *J. Bioact. Mater.* 2019, 4, 196-206.