

УДК: 576.535,576.385,576.535 576.385
УКПП
№ держреєстрації № 0119U100770
Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ (СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58 e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
д-р.фіз.-мат.наук, професор
А.М. Чорноус

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Визначення ефективності застосування плазмової електрооксидації для
модифікації біодеградуючих сплавів для ортопедії

АНАЛІЗ ПОВЕРХНІ СПЛАВІВ ПІСЛЯ ПЛАЗМОВОЇ ЕЛЕКТРООКСИДАЦІЇ
(проміжний)

Науковий керівник

канд.мед наук

О.М. Олешко

2020

Рукопис закінчено 23 грудня 2020 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 25 листопада 2020 р. № 4

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Старш. наук. співроб., к.мед.наук	_____ (23.12.2020)	Олешко О. М. (реферат, вступ, висновки, розділи 1,2,3)
Наук. Співроб.	_____ (23.12.2020)	Дейнека В. М. (розділ 1,2,3)
Доцент кафедри, канд.мед.наук., договір цивільно-правового характеру	_____ (23.12.2020)	Линдін М.С. (розділ 2)
Наук. співроб. Гусак Є. В.	_____ (23.12.2020)	Гусак Є. В. (розділ 2, 3)
Мол. наук. співроб.	_____ (23.12.2020)	Гапченко А. В. (розділ 2)
Студент, лаборант	_____ (23.12.2020)	Дудко Ю. С. (розділ 3)
Аспірант, договір цивільно-правового характеру	_____ (23.12.2020)	Дригваль Б. О. (розділ 3)
Аспірант, договір цивільно-правового характеру	_____ (23.12.2020)	Миронов П. Ф. (розділ 3)
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____ (23.12.2020)	Юсупова А. Ф. (розділ 2)
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____ (23.12.2020)	Любчак І. В. (розділ 3)
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____ (23.12.2020)	Савченко А. В. (розділ 3)
Студент, договір цивільно-правового характеру	_____ (23.12.2020)	Косенцева К.О. (розділ 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 44 с., 13 рис., 8 табл., 34 джерел.

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

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

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

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

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Дослідження структури поверхні за допомогою растрової електронної мікроскопії;
2. Визначення динаміки резорбції сплавів та динаміки виходу елементів у розчин за допомогою корозійних тестів та ААС.;
3. Вивчення товщини та хімічного складу плівки з використанням методів растрової електронної мікроскопії, Raman, FTIR та XRD.;
4. Узагальнення результатів та відбір зразків.

Проведені дослідження якості модифікованої поверхні магнієвих сплавів, зокрема динаміка резорбції сплавів, товщина та хімічний склад, а також особливості морфології плівки, її механічні властивості, що дало можливість визначити особливості структури та елементного складу поверхні модифікованих магнієвих сплавів. А саме формування окисного шару з фосфатною та сульфатною складовою. Визначена залежність якості покриття від складу розчину та параметрів електрооксидзації та відібрані зразки з оптимальними фізико-хімічними параметрами для проведення культивування культур клітин.

ЗМІСТ

Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів	5
ВСТУП.....	6
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	12
2.1 Матеріали та ПЕО.....	12
2.2.1 Синтез нанокристалів Cu.....	13
2.2.2 Характеристика наночастинок.....	14
2.3 SBF-тест.....	14
2.4 Скануюча електронна мікроскопія	15
2.5 Дослідження шорсткості поверхонь.....	15
2.6 Вимірювання контактного кута.....	15
2.7 Рентгено-дифракційний аналіз.....	16
2.8 Елементний аналіз.....	16
2.9 Аналіз вивільнення іонів з оксидних покриттів.....	16
2.10 Аналіз адгезії бактерій.....	17
2.11 Культура клітин.....	17
2.12 Статистичні методи.....	18
3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	20
3.1 Фізична та хімічна характеристика поверхонь магнієвих сплавів, модифікованих плазмовою електрооксидацією, після занурення в SBF	20
3.2 Структурно-біологічна оцінка покриттів на зразках магнію після плазмової електрооксидації в різних розчинах електролітів.....	24
3.3 Формування бактеріостатичної поверхні на сплаві ZrNb методом анодування в розчині, що містить наночастинки Cu.....	28
ВИСНОВКИ.....	39
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	41

ПЕРЕІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

Mg – Магній

ЕО – електрохімічне осадження

ПЕО – плазмова електрооксидація

CA – контактний кут

SBF – simulated body fluid

EDX – energy dispersive X-ray

SEM – scanning electron microscope

TEM – трансмісійний електронний мікроскоп

XPS – рентгенівська фотоелектронна спектроскопія

°C – градус Цельсія

КУО (CFU) – колонієутворюючі одиниці

Ag – Срібло

AgNP – наночастинки срібла

CuNPs – наночастинки оксиду цинку

Cu – Мідь

Ti – Титан

Zr – Цирконій

Nb – Ніобій

ВСТУП

Плазмова електрооксидация (ПЕО) це один із сучасних методів створення біосумісного антикорозійного керамічного покриття на поверхні медичних імплантатів. Основними напрямками останніх досліджень є створення покриттів з антибактеріальними властивостями та контроль корозійних процесів. В літературі вже є успішні дослідження модифікації поверхні сплавів Ті. Для посилення антибактеріальних властивостей модифікованої поверхні до розчинів електроліту були додані антибіотики та наночастинки срібла. Незважаючи на антибактеріальну дію, антибіотики та AgNP мають різний рівень токсичності, що обмежувало їх використання для клінічного застосування. Через низьку токсичність наночастинки міді можуть бути альтернативою сріблу при розробці антибактеріальних поверхонь на медичних імплантатах. Наші нещодавні дослідження показують безпеку та високу ефективність CuNP, виготовлених із використанням біосинтезу, але відсутні експерименти щодо застосування міді в покриттях ПЕО. Сучасні дослідження показали утворення складного мезопористого покриття на сплавах ZrNb із застосуванням розчину Ca – P, легovanого CuNP. Контроль напруги дозволяє отримувати товсті покриття з незначними концентраціями Zr/Ca та Zr/P в режимі 450 V, дана тенденція підтверджується в інших дослідженнях. На основі сучасних даних можна зробити висновок, що основним механізмом запобігання адгезії бактерій на поверхні ПЕО-покриття можуть бути наночастинки міді, що в свою чергу не передшкочає колонізації клітин і таким чином запобігає розвитку інфекційних ускладнень.

Використання силікатів як основи для електролітів під час ПЕО, забезпечує формування на поверхні імпланту оксидного шару, збіосумісними властивостями. Використання цих покриттів для магнієвих медичних матеріалів забезпечить контроль корозійних процесів та затримку деградації матеріалу в перші дні імплантації.

Отже, основними перевагами нового ПЕО покриття є повна відсутність цитотоксичності, висока біосумісність, а також можливість стимулювати прикріплення та проліферацію клітин, що відкриває нові перспективи для розробки медичних імплантатів з передовими антибактеріальними властивостями для попередження інфекційних ускладнень.

(Результати розділу опубліковані в статтях:

Oleksandr Oleshko, Yevheniia Husak, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Sergiy Kyrylenko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Physical and Chemical Characterization of The Surfaces of Magnesium Alloys, Modified By Plasma Electrolytic Oxidation, After Immersion In Simulated Body Fluid*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020

Yevheniia Husak, Oleksandr Oleshko, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Structural and Biological Assessment of Mg Alloy Surface after Plasma Electrolytic Oxidation in Different Solutions*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020

V. Korniienko, O. Oleshko, Y. Husak, V. Deineka, V. Holubnycha, O. Mishchenko, A. Kazek-Kęsik, A. JakóbiK-Kolon, R. Pshenychnyi, K. Leśniak-Ziółkowska, O. Kalinkevich, A. Kalinkevich, M. Pisarek, W. Simka, and M. Pogorielov, *Formation of a Bacteriostatic Surface on ZrNb Alloy via Anodization in a Solution Containing Cu Nanoparticles*, *Materials* (Basel). 13, 3913 (2020).)

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Топографія поверхні зубних та ортопедичних імплантатів є критичним питанням для стимуляції проліферації клітин та прискорення процесу остеоінтеграції, а також для запобігання адгезії бактерій [1–3]. Різні модифікації поверхні були розроблені для доступних на ринку імплантатів на основі титану та магнію. Такими модифікаціями є: піскоструменева обробка, травлення кислотами, електрохімічне анодне окислення або кальцій-фосфатні покриття [4]. Обробка з використанням плазмової електрооксидації (ПЕО) імплантатів є однією з найбільш перспективних методик завдяки утворенню міцних зв'язків з металевими підкладками [5]. Існують докази ефективності ПЕО покриттів на поверхні титанових сплавів, свідченням чого є посилення проліферації клітин та краща остеоінтеграція порівняно зі звичайними імплантатами [6–8].

Зубні імплантати з титану (Ti) широко застосовуються протягом останніх 50-ти років для фіксації та підтримки протезних конструкцій від одиночних коронок до нерухомих та знімних протезів [9].

Незважаючи на нові комерційні системи імплантатів, що характеризуються покращеними фізико-хімічними та механічними властивостями, кількість ускладнень все ще збільшується і коливається від 4,5% до 10% [10]. Бактеріальні інфекції, руйнування імплантатів, аномальна фізична активність пацієнта та виснаження на межі тканина-імплантат є найпоширенішими причинами невдалої імплантації [11]. Деякі джерела свідчать про те, що механічні параметри та властивості поверхні є головними факторами, що відповідають за успішну імплантацію [12].

ПЕО покриття сприятливіші для бактерій, за рахунок подібних механізмів адгезії прокаріотичних та еукаріотичних клітин. Тому для попередження бактеріальної адгезії, необхідна модифікація оксидного шару покриттів. Останні дослідження демонструють, що наночастинки срібла (NPs) мають сильний і швидкий бактерицидний ефект завдяки формуванню активних форм кисню (ROS),

і як наслідок, пошкодження клітинної мембрани та ДНК бактерій [13, 14]. Однак Р. Покровецький зазначив, що деякі NPs срібла демонструють цитотоксичність на остеобласти [15], що вимагає нових безпечних та біосумісних форм NPs. Наночасточки мідні токсичні для бактерій, оскільки вони виділяють іони Cu^{2+} і мають тіофільність [16]. Ці властивості вказують на те, що CuNPs можуть бути перспективною альтернативою сріблу. Наночастинки срібла вже застосовувалися для модифікації оксидних покриттів [17]. Проте немає достатнього обсягу інформації про використання покриттів з CuNPs для імплантатів ZrNb.

Завдяки своїм властивостям Ті залишається основним матеріалом для виготовлення зубних імплантатів, відтоді, як був відкритий Вільямом Грегором. Однак, сплави Ті мають невідповідність жорсткості кістковій тканині, що спричиняє захисний ефект, і призводить до розсмоктування кістки та відторгнення імплантату [18]. Повідомляється, що нові метастабільні сплави β -типу Ті мають найнижчий модуль пружності порівняно з іншими сплавами Ті. Додавання нетоксичних металевих елементів, таких як Nb, Mo, Zr, Sn та Ta, широко вивчалось для досягнення біомеханічного успіху та високої біосумісності [19]. Кілька сучасних досліджень зосереджені на вивченні цирконію, як дуже привабливій альтернативі титану в стоматологічній імплантології [20]. Повідомляється, що сплави цирконій-ніобій (Zr – Nb) володіють кращою корозійною стійкістю та подібною біосумісністю, порівняно з Ті – 6Al – 4V та чистим Ті [21, 22]. Більше того, деякі дослідження показали, що бактерії, гірше прикріплюються до імплантатів цирконію, порівняно з титановими [23].

Проте матеріали на основі Mg широко застосовуються в медицині. В ортопедії та щелепно-лицьовій сфері використовують завдяки їх відповідним механічним характеристикам та біодеградації у біологічних рідинах [24, 25].

Mg та його сплави за фізико-механічними властивостями мають переваги перед комерційними імплантатами з нержавіючої сталі та титану [26]. Одне з основних питань в остеопластиці є швидкість корозії матеріалів. Низька корозійна стійкість магнію є основним недоліком імплантованих медичних виробів. Злуження та

газова активність під час корозійного процесу може спричинити запалення та призвести до затримки формування тканино специфічних структур. Легування різними елементами (Mg – Ca, Mg – Zn, Mg – Sr та Mg – Ag) може використовуватися для підвищення корозійної стійкості та контролю швидкості деградації імплантатів на основі магнію у водних середовищах, а також для збереження їх механічної міцності та зменшення побічних ефектів [27].

Серед інших методів контролю корозійних процесів є нанесення додаткового покриття. Додатковий поверхневий шар може контролювати початкову швидкість деградації та підтримувати достатню механічну міцність матеріалу. Метою модифікації поверхні є підтримка механічних властивостей магнію після імплантації [28]. Основними методами поверхневої обробки сплавів Mg, описаних у літературі, є: гідротермічна обробка, плазмова електрооксидация (ПЕО), додавання у сплав рідкоземельних елементів чи електрохімічне осадження (ЕО) [29, 30]. Електрохімічне осадження (ЕО) та ПЕО є найбільш розповсюдженими методами модифікації поверхні. ЕО утворює голкоподібне кристалічне покриття. Тоді як ПЕО може утворювати пористі оксидні шари плівки з різною товщиною, та варіабельною морфологією, що є більш привабливою для адгезії клітин [31]. Тому пориста поверхня більш придатна для медичного застосування. Плівки оксидного шару з додаванням різних елементів можуть збільшити біосумісність імплантатів та контролювати процес корозії у фізіологічному середовищі. Лужні розчини, що містять силікати або фосфати, часто використовують як електроліти під час ПЕО магнію та його сплавів. Однак в деяких роботах описано суперечливі дані корозійної стійкості покриття ПЕО, отриманого в електролітах на основі силікатів та фосфатів [32]. Дослідження також описують відсутність токсичного впливу цих хімічних сполук на клітини [33]. Обидва електроліти привертають увагу завдяки багатообіцяючим результатам, як альтернатива для поліпшення біоактивності оксидного покриття [34].

(Результати розділу опубліковані в статтях:

Oleksandr Oleshko, Yevheniia Husak, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Sergiy Kyrylenko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Physical and Chemical Characterization of The Surfaces of Magnesium Alloys, Modified By Plasma Electrolytic Oxidation, After Immersion In Simulated Body Fluid*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020

Yevheniia Husak, Oleksandr Oleshko, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Structural and Biological Assessment of Mg Alloy Surface after Plasma Electrolytic Oxidation in Different Solutions*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020

V. Kornienko, O. Oleshko, Y. Husak, V. Deineka, V. Holubnycha, O. Mishchenko, A. Kazek-Kęsik, A. Jakóbiak-Kolon, R. Pshenychnyi, K. Leśniak-Ziółkowska, O. Kalinkevich, A. Kalinkevich, M. Pisarek, W. Simka, and M. Pogorielov, *Formation of a Bacteriostatic Surface on ZrNb Alloy via Anodization in a Solution Containing Cu Nanoparticles*, *Materials (Basel)*. 13, 3913 (2020).

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали та плазмова електрооксидация

Na_2SiO_3 , NH_4F , NaOH , Na_2HPO_4 були придбані у компанії Sigma – Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі, США). Зразки магнію ($1 \times 1 \times 1 \text{ см}$) були відшліфовані SiC-папером різної дисперсності, очищені ультразвуком в ацетоні і швидко промиті в дистильованій воді. Склад електроліту та відповідні ідентифікаційні коди зразків представлені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 - склад та назва електролітів для ПЕО

Зразок	Склад електроліту
Електроліт 1 (зразок S1)	10г/л Na_2SiO_3 + 5г/л NH_4F + 10г/л NaOH
Електроліт 2 (зразок S2)	10 г/л Na_2SiO_3 + 5 г/л NH_4F + 10 г/л $\text{Ca}(\text{OH})_2$

ПЕО проводили при щільності імпульсного струму $0,1 \text{ А/см}^2$ з кінцевою напругою до 250 V протягом 10 хв. Площа поверхні зразків дорівнювала 6 см^2 . Зразки тричі промивали деіонізованою водою.

Сплав системи цирконій-ніобій (вагові %: Zr – 97,5; Nb – 2,4–2,5; Hf – 0,01; Ni – 0,01; Cr – 0,02; Ti – 0,007; Al – 0,008 – 0,005) було отримано від NanoPrime (Дембіца, Польща) та використано в експерименті у відповідності протоколу. Циліндричні зразки готували діаметром 6 мм і висотою 6 мм. Всі хімічні речовини були придбані у Sigma Aldrich (Дармстад, Німеччина): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99%; PVP, $M_w = 40000$, K-25, $\text{Na}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 95%), EG- $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$, 90% та ізопропанол ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, 90%).

Всі зразки промивали дистильованою водою та очищали ультразвуком в деіонізованій воді та 2-пропанолі протягом 5 хв кожен. Попередньо підготовлені зразки піддавали анодуванню в електроліті, що містить $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)_2$ (0,5 М), KOH та наночастинки міді (5 г / л). ПЕО проводили під постійним струмом $0,1 \text{ А/см}^2$ з кінцевою напругою 300, 450 і 500 V, впродовж 5 хв (легенди зразків: ZrNb-300,

ZrNb-450 та ZrNb-500). Протягом усіх процедур використовувалось джерело струму (PWR 800H, Кікусуї, Японія). Процес проводили з контрольованим водяним охолодженням на магнітному змішувачі. Використовували титановий сітчастий катод, анодом слугував сплав ZrNb. Модифікована площа поверхні становила $1,89 \text{ см}^2$ (діаметр = 6 мм). Анодовані зразки промивали дистильованою та деіонізованою водою протягом 5 хв. Кількість зразків прораховували з необхідності шести повторів для кожного аналітичного методу.

2.2.1 Синтез наночасточок міді

Синтез CuNPs проводили у водному розчині при кімнатній температурі. Спочатку 4 г камеді акації розчиняли в 120 мл дистильованої води. Процес розчинення тривав майже 30 хв при інтенсивному перемішуванні розчину в склянці об'ємом 600 мл за допомогою магнітної мішалки. Камедь акації використовували як захисне середовище для запобігання злипанню та окислення наночастинок міді після додавання відновника. Розчин 2,5 г (0,01 моль) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ у 80 мл води готували в іншій склянці. Потім до охолодженого розчину камеді акації додавали розчин солі купруму і безперервно та енергійно перемішували протягом 10 хв. Потім до отриманого розчину краплинно додавали 3,6 мл $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Цей об'єм відновника відповідав молярному відношенню використаної солі 1:10. Суміш перемішували протягом 1 год після додавання гідрозингідрату.

Отриманий золь центрифугували протягом 20 хв зі швидкістю 5000 об/хв. Відокремлений продукт тричі промивали з органічного компонента етанолом з наступним центрифугуванням. Отриманий осад диспергували у 100 мл дистильованої води за допомогою ультразвукового диспергатора. Схема синтезу представлена на Рисунку 2.1.

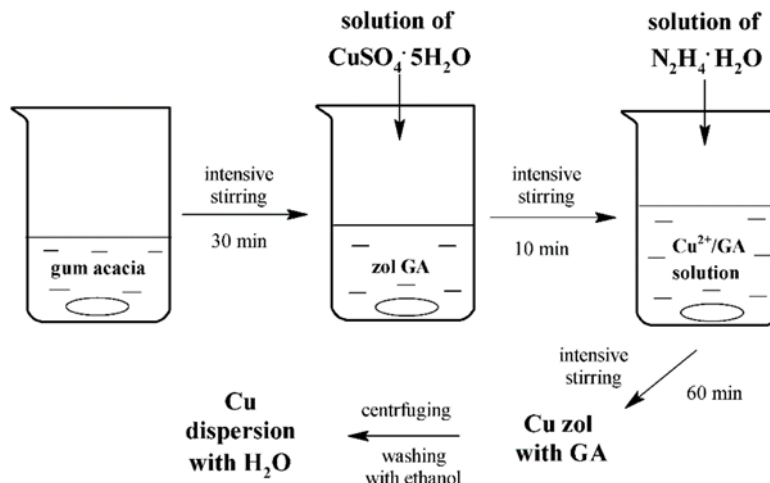


Рисунок 2.1 - схема синтезу нанокристалів Cu

2.2.2 Характеристика наночастинок

Мікроструктурні дослідження з метою вивчення морфології окремих наночастинок та отриманого матеріалу проводились за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (TEM-125K) (SELMІ, Суми, Україна). Значення рентгенівської дифракції зразків реєстрували за допомогою дифрактометра DRON4-07 ("Буревестник", Санкт-Петербург, Росія) із звичайною геометрією Брегга-Брентано θ - 2θ (де 2θ - кут Брегга), оснащеного автоматизованою системою управління та обробкою даних.

2.3 SBF-тест

Корозійну стійкість отриманих покриттів оцінювали за допомогою тесту на занурення в розчин SBF. Зразки занурювали в 50 мл розчину SBF (pH 7,4) на 1, 3, 7 та 63 дні при 37°C . Розчин оновлювали кожні дві доби. Після кожного періоду зразки виймали з розчину, промивали дистильованою водою і сушили на повітрі до досягнення постійної ваги. Швидкість корозії оцінювали шляхом вимірювання втрати ваги. Зразки зважували перед тестом і після кожного періоду занурення.

2.4 Скануюча електронна мікроскопія

Скануючий електронний мікроскоп SEO-SEM Inspect S50-B (FEI, Брно, Чеська Республіка) був використаний для характеристики морфології поверхні анодованих зразків. Розподіл пор та їх розмір оцінювали за допомогою програмного забезпечення Trial version Image-Pro 10.0.7. Хімічний склад поверхневих шарів оцінювали за допомогою енергодисперсійного рентгенівського спектрометра AZtecOne з детектором X-MaxN20 (Oxford Instruments plc), приєднаного до SEM. Дані про хімічний склад поверхні збирали до і протягом SBF-тесту.

2.5 Дослідження шорсткості поверхонь

Шорсткість поверхні та її профіль є вирішальними складовими загальних характеристик морфології поверхні зразків. У нашому дослідженні ми вимірювали такі параметри шорсткості: середнє арифметичне суми значень профілю шорсткості (R_a) та значень десятибальної висоти (R_z). Цифрові дані були отримані за допомогою тестера шорсткості поверхні (Surftest SJ-301, Мітутойо, Кавасакі, Канагава, Японія). Кратність етапу звірки становила 10 мм.

2.6 Вимірювання контактного кута

Гідрофільні властивості поверхонь визначали на основі вимірювань контактного кута (θ). Експерименти проводили за допомогою оптичного приладу для вимірювання оптичного контактного кута OCA 15 EC, серія GM-10-473 V-5.0 (Data Physics, Філдерштадт, Німеччина). Середнє значення визначали шляхом вимірювання п'яти різних крапель для кожного зразка.

2.7 Рентгено-дифракційний аналіз

Результати рентгенівської дифракції зразків реєстрували за допомогою дифрактометра DRON4-07 ("Буревестник", Санкт-Петербург, Росія) із звичайною геометрією Брегга-Брентано θ - 2θ (де 2θ - кут Брегга), з автоматизованою системою управління та обробкою даних. Використовували випромінювання $\text{AlK}\alpha$ з фільтруванням Ni (довжина хвилі 0,154 нм). Струм і напруга рентгенівської трубки становили 20 мА та 30 кВ відповідно. Тримач зразка обертався постійно, щоб усереднити сигнал з його поверхні. Візерунки реєстрували в режимі безперервної реєстрації зі швидкістю $1,0^\circ/\text{хв}$ з кутом 2θ в діапазоні від 10 до 100° . Процедури обробки даних проводились із використанням програмного пакету DIFWIN-1 (ТОВ «Еталон ПТК», Москва, Росія). Фазовий аналіз проводили шляхом порівняння дифракційних візерунків з досліджуваних зразків та довідкових даних JCPDS (Спільного комітету з дифракційних стандартів порошку).

2.8 Елементний аналіз

Хімічний склад та хімічний стан підготовленої поверхні зразка характеризувались рентгенівською фотоелектронною спектроскопією (XPS). Для цього був використаний спектрометр PHI 5000 VersaProbe (ULVAC-PHI, Chigasaki, Японія). Спектри XPS збуджували, використовуючи в якості джерела монохроматичне випромінювання $\text{AlK}\alpha$

2.9 Аналіз вивільнення іонів з оксидних покриттів

Вміст міді, фосфору, кальцію та титану у сольових розчинах Рінгера визначали за допомогою атомно-емісійного спектрометра Varian 710-ES (Санта-Клара, штат Каліфорнія, США), з небулайзером OneNeb та розпилювальною скляною камерою Twister. Застосовували наступні параметри: RF потужність $1,0$ кВт, витрата плазми (аргону) 15 л/хв, допоміжний потік (аргон) $1,5$ л/хв, тиск небулайзера 210 кПа,

швидкість насоса 15 об/хв, лінії викиду Cu: $\lambda = 327,395$ та $324,754$ нм і $206,200$ нм, P: $\lambda = 177,434$ і $213,618$ нм, Ca: $\lambda = 370,602$ і $373,690$ нм. Застосовано метод калібрувальної кривої. Стандарти готували на матриці, ідентичній матриці зразків (розчин Рінгера) з одноелементних стандартних розчинів 1 мг/мл, що постачаються Merck Millipore (Дармштадт, Німеччина). Використовували деіонізовану воду (система Millipore Elix 10, Дармштадт, Німеччина). Результати розраховувались як середнє значення концентрацій, отриманих для всіх аналітичних ліній відповідного елемента зі стандартним відхиленням, що не перевищує $1,5\%$.

2.10 Аналіз адгезії бактерій

Штам бактерій золотистого стафілокока (*S. aureus*, штам В 918) культивували протягом доби у термостаті при 37 °С. Інокуляти ресуспендували до кінцевої щільності 1×10^6 колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл у TSB, використовуючи стандарти Мак-Фарленда. Зразки (модифіковані ПЕО та контроль) занурювали горизонтально у суспензію бактерій у статичних умовах при 37 °С на 2 , 4 та 24 год. Після спільного культивування зразки тричі промивали $2,0$ мл стерильного сольового розчину з фосфатним буфером (PBS; рН = $7,4$) для видалення слабо адгезованих бактерій. Після цього зразки поміщали в $1,0$ мл стерильного PBS і обробляли ультразвуком протягом 1 хв для видалення слабкозв'язаних бактерій в ультразвуковій ванні (B3500S-MT, Branson Ultrasonics Co., Shanghai, China) з подальшим перемішуванням (Mini Rocker-Shaker, BioSan MR-1, Рига, Латвія). Видалені з диска бактерії культивували на твердому середовищі протягом 24 годин. Визначення КУО проводили шляхом підрахунку видимих колоній.

2.11 Культура клітин

Первинні остеобласти людини (Інституційний етичний комітет, протокол No2/17 від 14 лютого 2019 р.), культивувались у середовищі (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) з додаванням L-glutamine, та 100

units/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ amphotericin B, 10% Fetal Bovine Serum, та 1.0 ng/mL bFGF) при 5% зволоженні з додаванням CO_2 за температури 37 °C. Коли клітини заповнили матрас на 80 – 85%, остеобласти висівали на кожну пробу та позитивні контрольні лунки при щільності клітин 2×10^4 клітин в лунку. Неочищений сплав ZrNb використовували як негативний контроль. Клітинна адгезія та проліферація на поверхні скафолдів оцінювалась за допомогою колориметричного аналізу Alamar blue. Резазурин додавали в кількості, що дорівнює 10% від об'єму в кожну лунку. Після інкубації протягом 4 год при 37 °C у темряві, поглинання вимірювали за допомогою зчитувача планшетів Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) при довжинах хвиль 570 нм та 600 нм. Клітини визначали кількісно з різними інтервалами часу: 1, 3 та 7 днів. Всі експерименти повторювали тричі. Розрахунок відсотка відновлення Alamar blue проводили за допомогою рівняння згідно з протоколом виробника.

2.12 Статистичні методи

Статистичний аналіз базувався на односторонньому дисперсійному аналізі (програмне забезпечення GraphPad Prism 8.0), і значення $p \leq 0,05$ вважалося статистично достовірним. Всі тести були виконані в повтореннях. Результати виражаються як середнє значення \pm стандартне відхилення.

(Результати розділу опубліковані в статтях:

Oleksandr Oleshko, Yevheniia Husak, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Sergiy Kyrylenko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Physical and Chemical Characterization of The Surfaces of Magnesium Alloys, Modified By Plasma Electrolytic Oxidation, After Immersion In Simulated Body Fluid*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020

Yevheniia Husak, Oleksandr Oleshko, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Structural and Biological Assessment of Mg Alloy Surface after Plasma Electrolytic Oxidation in Different Solutions*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020

V. Korniienko, O. Oleshko, Y. Husak, V. Deineka, V. Holubnycha, O. Mishchenko, A. Kazek-Kęsik, A. Jakóbiak-Kolon, R. Pshenychnyi, K. Leśniak-Ziółkowska, O. Kalinkevich, A. Kalinkevich, M. Pisarek, W. Simka, and M. Pogorielov, *Formation of a Bacteriostatic Surface on ZrNb Alloy via Anodization in a Solution Containing Cu Nanoparticles*, *Materials (Basel)*. **13**, 3913 (2020).)

3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Фізико-хімічна характеристика поверхонь магнієвих сплавів, модифікованих плазмовою електрооксидацією, після занурення в SBF

ПЕО покриття зразків набули різноманітної морфології з різною пористою структурою (рисунок 3.1.1). Морфологія поверхні зразка S2 була більш шорсткою та пористою. Оксидний шар мав кратероподібну структуру з розміром пор до 7 мкм². Після плазмової електрооксидації на поверхні зразків був сформований оксидний шар. Морфологія якого була представлена мезопористими структурами, такими як: пори, кратери та тріщини різної площі та глибини. Відмінною рисою покриття S1 був більш одноманітний тип поверхні, з кратероподібними порами розміром до 1 мкм². Мікротріщини не виявлялись ні на одній з поверхонь.

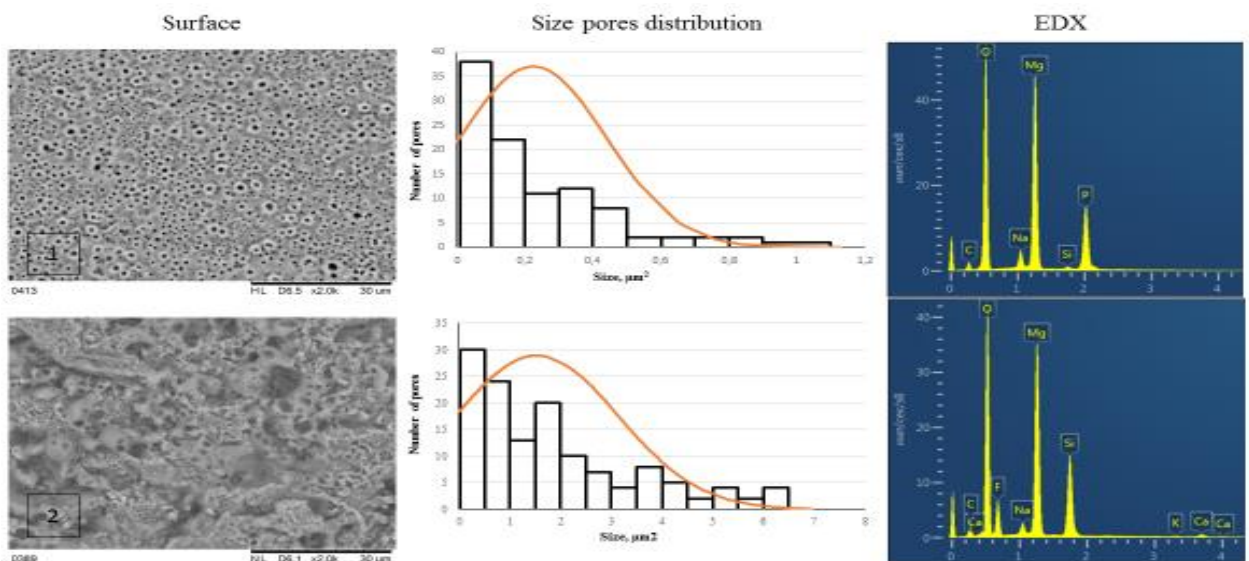


Рисунок 3.1.1 - аналіз морфології та хімічного складу поверхонь методом SEM. Ліві панелі, SEM-зображення зразків, анодованих при 250 V в електролітах для ванн на основі силікату 1 і 2; середні панелі, розподіл розмірів пор; праві панелі, відображення спектрів EDX з аналізом елементного складу поверхонь зразка.

Елементний склад поверхні покриттів оцінювали за допомогою EDX-аналізу (рисунок 3.1.1) було виявлено, що Mg і O представляють основний об'єм покриття.

Наявність О підтверджує оксидний характер шару. Низька концентрація Са і На свідчила про відсутність наявних домішок.

Профіль шорсткості (Ra) і показник (Rz) ПЕО покриттів представлені в таблиці 3.1.1. Значення Ra і Rz збільшуються, при додаванні Са до електроліту порівняно з На. Такий високий показник шорсткості зумовлений утворенням електричної дуги на поверхні зразків, що призводить до появи розвантажувальних каналів чи кратерів. Завдяки цьому можна зробити висновок, що товщина оксидного шару в зразках для електроліту 2 більша. Виражена мезопориста структура призводить до збільшення загальної площі поверхні. Це у свою чергу може сприяти кращій адгезії біологічних структур.

Таблиця 3.1.1 - показники шорсткості та контактного кута

Зразок	Ra, μm	Rz, μm	CA
S1	0.39 \pm 0.01	2.83 \pm 0.13	22.7 °
S2	1.67 \pm 0.08	11.6 \pm 1.24	16.62 °

Гідрофільність або гідрофобність - одна з важливих фізико-хімічних властивостей твердих поверхонь. Умовною лінією розмежування рівня змочування є числове значення контактного кута, а саме вище (гідрофобне) або нижче (гідрофільне), ніж 90 градусів. Модифікація зразків магнію в силікатних електролітах призвела до поліпшення змочуваності поверхонь, що дозволило краплі води легко змочити поверхню і швидко проникнути в покриття. Показники контактного кута (22,7 і 16,62 градусів) вказували на те, що поверхні обох силікатних оксидних покриттів виявляли гідрофільні властивості. Примітно, що ПЕО в електроліті 2 забезпечував кращу гідрофільність. Це свідчить про те, що модифіковані ПЕО-поверхні мають ознаки біосумісності, оскільки вони можуть швидко взаємодіяти з біологічними рідинами.

Корозійну стійкість експериментальних зразків магнію досліджували після занурення в SBF протягом різних часів інкубації. Корозійну стійкість оцінювали

шляхом вимірювання втрати ваги зразків та аналізу EDX поверхонь. Зразок, отриманий в ПЕО з електролітом 1, втратив 6,2% від ваги після 63 днів занурення в SBF, тоді як зразок з електролітом 2 для ванни втратив лише 4,88% від ваги. Динаміка зміни ваги в різні періоди представлена в таблиці 3.1.2.

Таблиця 3.1.2 - масові зміни зразків протягом SBF- тесту

Зразок	1д, %	3д, %	7д, %	63д, %
S1	0.33	-0.32	-0.24	-6.20
S2	0.44	-0.36	-0.24	-4.88

Елементний аналіз поверхонь за допомогою EDS через 1, 3, 7 та 63 дні занурення представлені у таблиці 3.1.3.

Після першого дня елементний склад покриття був представлений як Mg, так і O. Масивна присутність O підтвердила оксидний характер поверхні. I Si, і F були включені з розчинів до складу поверхні (таблиця 3.1.3).

Слід зазначити, що присутність цих елементів була більш інтенсивною для зразка S2. Низькі концентрації Ca і Na вказують на відносну частоту використовуваних хімічних сполук. Це вказує на вплив Ca(OH)₂ на хімічний склад поверхні зразків S2 і ще більше підкреслювало вплив типу електроліту на характер покриття. Вміст як Si, так і F зменшувався через 7 днів під час тесту на занурення в SBF.

Зниження вмісту Mg та збільшення вмісту O мали однакову тенденцію в обох випадках. Зростання вмісту Ca може свідчити про можливі кальцієві відкладення на поверхнях зразків у модельованих середовищах.

Таблиця 3.1.3 - елементний склад поверхонь зразків залежно від тривалості SBF-тесту

Електроліт 1								
Де нь/%	O	Mg	Si	F	C	Na	Ca	P
0	46.89	27.54	8.74	5.02	9.99	1.48	0.20	-
1	54.99	16.50	2.69	2.83	7.06	0.30	6.98	8.56
3	55.17	12.86	1.02	5.4	7.69	0.45	7.88	9.52
7	57.24	10.29	0.27	-	4.89	1.38	11.67	13.82
63	60.25	7.29	-	-	6.48	1.94	12.17	11.87
Електроліт 2								
Де нь/%	O	Mg	Si	F	C	Na	Ca	P
0	45.49	21.11	10.24	9.08	12.07	1.24	0.67	-
1	41.25	20.36	15.61	17.40	8.48	0.4	2.75	-
3	40.82	18.99	4.34	18.29	8.43	0.22	4.06	4.85
7	56.80	8.41	-	-	4.30	1.38	13.61	15.14
63	54.49	8.50	-	-	10.20	1.21	13.21	12.39

(Результати розділу опубліковані в статтях:

Yevheniia Husak, Oleksandr Oleshko, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Structural and Biological Assessment of Mg Alloy Surface after Plasma Electrolytic Oxidation in Different Solutions*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020)

3.2 Структурно-біологічна оцінка покриттів на зразках магнію після плазмової електрооксидзації в різних розчинах електролітів

Модифікована поверхня мала пористу структуру в обох варіантах. На рисунку 3.2.1 представлені SEM-зображення поверхні зразків, анодованих при напрузі до 250 V. Поверхня покриттів має кратероподібну морфологію. Пори, можливо, є результатом виходу газів під час процесу ПЕО. Кратери є результатом охолодження та осадження розплавленого матеріалу на поверхню. Фосфатне покриття сприяє зростанню розміра і меншому розподілі пор, ніж силікатне покриття. Поверхня була вкрита мікротріщинами. У зразків, анодованих у силікатному розчині, поверхня характеризується значно більшою кількістю пор та рівномірним їх розподілом.

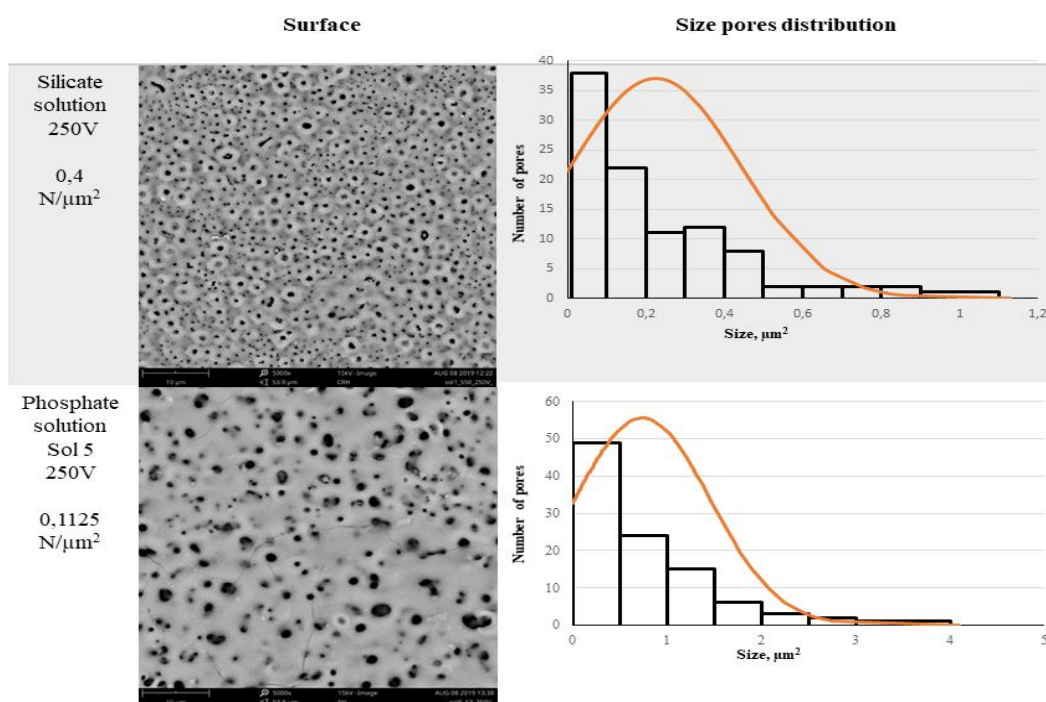


Рисунок 3.2.1 - зображення SEM-зразків, анодованих при 250 V в силікатних та фосфатних розчинах, кількість пор та розподіл за розміром

Розподіл елементів в покритті отриманий за допомогою EDX-аналізу представлений на рисунку 3.2.2. Ці покриття в основному складаються з Mg та O.

Це говорить про характер оксидного покриття ПЕО. Аналіз отриманих спектрів EDX виявляє Si і F, як включення силікатного, а атомів P у покриттях отриманих з залученням фосфатного електроліту.

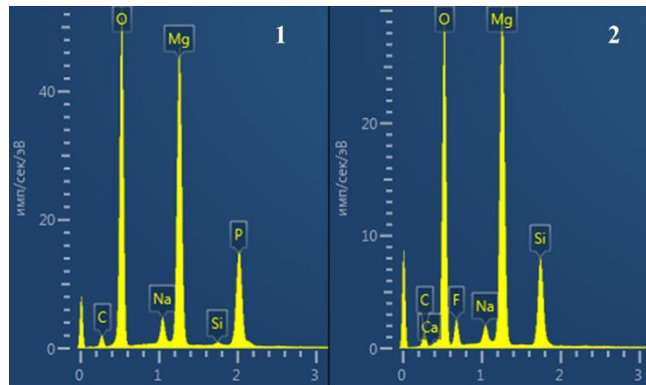


Рисунок 3.2.2 - відображення спектрів EDX силікатного та фосфатних покриттів.

Зразок із силікатним покриттям втрачає 1,1% ваги через 21 день занурення у SBF, тоді як фосфатне покриття, зменшує вагу до 0,68%. Динаміка зміни маси на добу представлена в таблиці 3.2.1.

Таблиця 3.2.1 - вагові зміни силікатних та фосфатних покриттів під час SBF-тесту

Ім'я	3д, %	7д, %	21д, %
Силікатний розчин	-0.32	-0.24	-1.15
Розчин фосфату	-0.39	-0.12	-0.68

Значення шорсткості покриттів ПЕО представлено в таблиці 3.2.2 значення Ra та Rz для фосфатних покриттів зростають порівняно з силікатними. Така величина шорсткості обумовлена іскроутворенням на поверхні, що призводить до появи розрядних каналів та кратерів із більшими розмірами.

Таблиця 3.2.2 - показники шорсткості та контактного кута для силікатних та фосфатних поверхонь

Ім'я	$Ra, \mu m$	$Rz, \mu m$	CA
Силікатний розчин	0.39 ± 0.01	2.83 ± 0.13	22.7°
Розчин фосфату	1.09 ± 0.63	7.79 ± 3.8	70.73°

Модифікація зразків магнію в силікатних електролітах призводить до поліпшення змочуваності поверхонь, що дозволяє краплі води легко розподілятися на поверхні і швидко проникати в мезопористі структури покриття. Статичний контактний кут ($70,73^\circ$) вказує на те, що поверхні фосфатних покриттів мають гідрофобні властивості.

У цьому дослідженні ми виявили залежність терміну інкубації й швидкості адгезії та життєдіяльності бактерій. Не було значної різниці в початковій адгезії після 2-годинної інкубації між зразками, анодованими при однаковій напрузі, але в різних розчинах (рисунок 3.2.3).

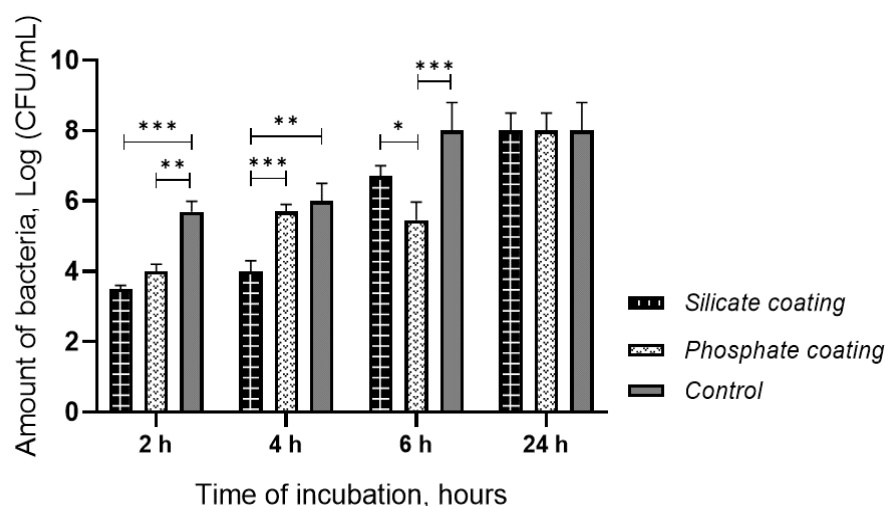


Рисунок 3.2.3 - кількість життєздатних бактерій, що адгезувались на поверхнях зразків через різні інтервали часу експерименту; зірочками позначається суттєва різниця (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p < 0,0005$)

Однак існувала суттєва різниця між контрольними та експериментальними зразками через 2 години ($p > 0,0005$ для силікатного покриття та фосфатного покриття $p > 0,005$), 4 години ($P > 0,005$ для силікату) та 4-х часовий проміжок ($p > 0,0005$ для фосфату) (рис. 3). Кількість прикріплених бактерій на поверхнях зразків, оброблених силікатом під час процесу ПЕО, значно зменшилася порівняно з такою на зразках, оброблених фосфатом після інкубації через 4 години відповідно. На відміну від цього, кількість живих бактерій значно зросла на анодованих силікатними розчинами поверхнях порівняно з фосфатними розчинами через 6 годин експерименту, відповідно. В іншому випадку кількість бактерій зросла до 8 Log CFU після 24 год спільного культивування для обох типів зразків. Отже, отримані результати свідчать про те, що адгезія бактерій помітно знизилася на поверхні експериментальних зразків, незважаючи на вміст розчину електроліту на ранніх етапах аналізу.

(Результати розділу опубліковані в статтях:

Oleksandr Oleshko, Yevheniia Husak, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Sergiy Kyrylenko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Physical and Chemical Characterization of The Surfaces of Magnesium Alloys, Modified By Plasma Electrolytic Oxidation, After Immersion In Simulated Body Fluid*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020)

3.3 Формування бактеріостатичної поверхні на сплаві ZrNb методом анодування в розчині, що містить наночастинки Cu

На дифрактограмі синтезованої речовини відображались під кутами $43,431^\circ$, $50,553^\circ$ і $74,264^\circ$, що відповідає відбиттям від кристалографічних площин кубічної фази Cu (111), (200) та (220). Сторонні фази дифрактометрично не виявлені в матеріалі. Характеристики дифракційних піків сформованого зразка відповідали JCPDS №. 04-0836 (рисунок 3.3.1). Середній розмір областей когерентного розсіювання синтезованого матеріалу становив 15,1 нм, розрахований за фізичним розширенням дифракційного піку (200) за формулою Шеррера.

Розрахункові параметри елементарної комірки синтезованої міді відповідали $a = 3,6114 \text{ \AA}$, а об'єм $V_{\text{unit}} (\text{Cu}) = 47,101 \text{ \AA}^3$. Аналіз ТЕМ-зображень показав, що синтезовані нанокристали міді мали різну форму з розмірами окремих кристалів в діапазоні 10–100 нм.

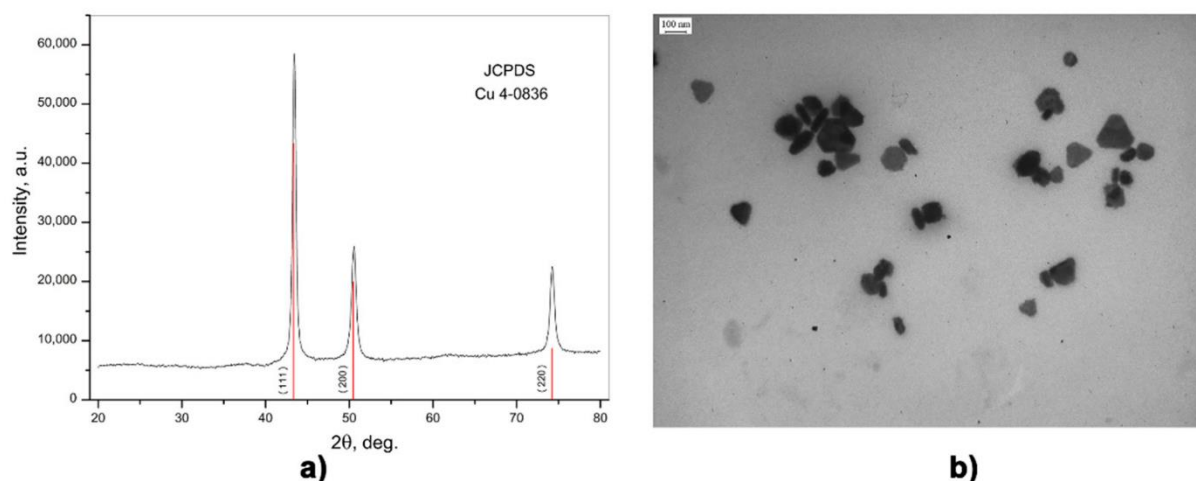


Рисунок 3.3.1 - характеристика CuNPs (a) дифрактограма та (b) ТЕМ

Після ПЕО поверхня ZrNb набула поліморфного характеру. Спостерігались поздовжні горбки неправильної форми, поперечні розміри яких коливались від $5,2 \pm 0,7$ до $10,4 \pm 1,2$ мікрметра. Ці структури піднімалися над загальною поверхнею і хаотично розміщувались по всій площі зразків. При цьому вся поверхня

модифікованого сплаву була пробита тріщинами (рисунок 3.3.2) різної довжини та неправильної форми. Важливо вказати на появу овальних пор та кратерів різного розміру. Тому при використанні ПЕО з електричною напругою 300 V внутрішні розміри пор становили від 1 до 2 мкм, а невелика кількість пор від 3 до 6 мкм. Збільшення напруги до 450 чи 500 V призвело до розширення кратерів. Внутрішні розміри варіювали від $2,1 \pm 0,4$ до $6,3 \pm 0,8$ мкм. Слід також зазначити, що при використанні режиму з напругою електричного струму в 500 V на поверхні зразків з'являлися ймовірно фосфатні відкладення (рисунок 3.3.2 С).

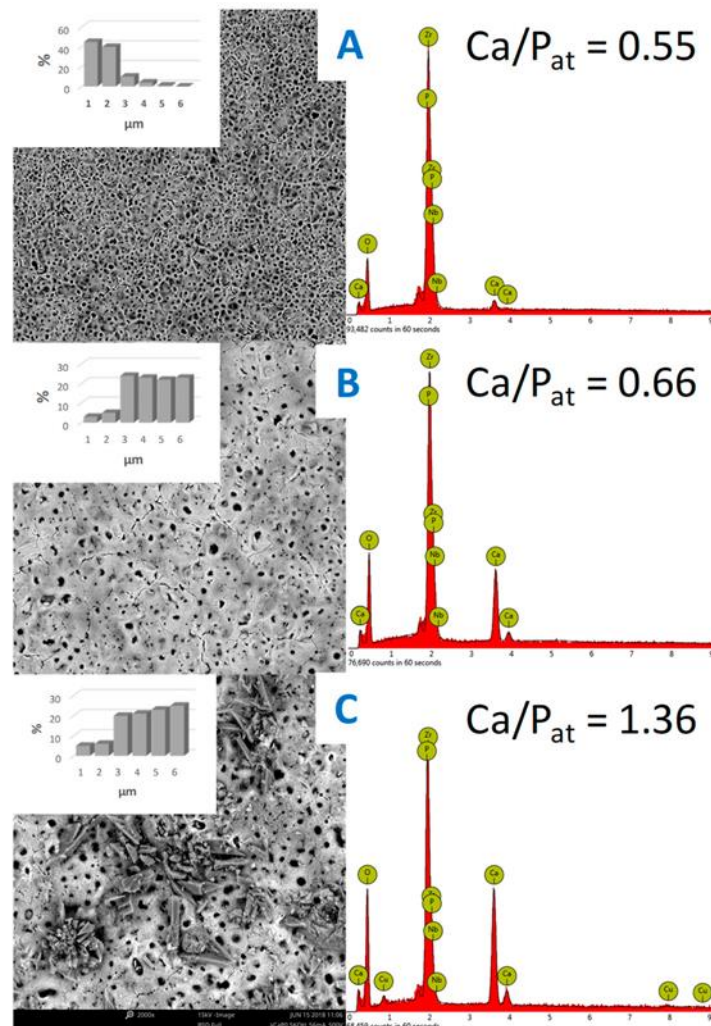


Рисунок 3.3.2 - SEM-поверхні сплаву ZrNb після ПЕО в Ca-вмісному розчині в різних режимах (300 V - (A), 450 V - (B) та 500 V - (C)) з частотою розподілу пор

Поперечні розміри окремих елементів становили 2–10 мікрометрів. Загальновідомо, що наявність фосфатів в організмі людини впливає на широкий спектр процесів. Серед них варто звернути увагу на процес мінералізації кісток. Під час мінералізації формується правильна структура кісткової тканини. Рівень неорганічних фосфатів сильно впливає на активність остеобластів та досягнення мінералізації кісток. Таким чином, ПЕО модифікація поверхні сплавів ZrNb у комбінованому розчині наночастинок міді призводить до утворення мезопористих структур, що повинно сприяти адгезії клітин на поверхні зразків.

У таблиці 3.3.1 представлені результати контактного кута. Усі досліджені поверхні ZrNb після модифікації ПЕО характеризуються контактним кутом нижче 90°, тому можна зробити висновок, що модифіковані поверхні гідрофільні. Крім того, пориста структура матеріалу імплантату може призвести до кращої змочуваності поверхні біоматеріалу. Відомо, що пори, які існують на шарі ПЕО, підтримують менший контактний кут з водою та вищу змочуваність завдяки можливості розповсюдження частинок води в порах. Деякими авторами спостерігалось зменшення контактного кута після ПЕО обробки титанових сплавів.

На основі аналізу EDX можна зробити висновок, що зі збільшенням напруги кількість цирконію в поверхневому шарі зменшується, тоді як кількість фосфору та кальцію збільшується.

Таблиця 3.3.1 - контактний кут поверхні ZrNb після обробки ПЕО в електроліті з CuNPs.

Зразок	Контактний кут
ZrNb-300	57.4 ± 1.9
ZrNb-450	40.7 ± 4.3
ZrNb-500	28.7 ± 1.4

Коефіцієнт Zr/Ca зменшився з 15,56 у ZrNb-300 до 0,7 у зразках ZrNb-500, Zr/P одночасно зменшився з 7,51 до 1,0. Співвідношення Ca/P зросло з 0,55 у ZrNb-300

до 1,36 у ZrNb-500. Варто зазначити, що співвідношення Ca/P 1,36 (ZrNb-500) сильно схоже на співвідношення Ca/P для гідроксиapatиту (НА), яке дорівнює 1,67. Гідроксиapatит - це неорганічний фосфат кальцію і головний компонент кісткової тканини людини. Він відповідає за правильний зв'язок між матеріалом імплантату та кістковою тканиною людини. Це причина, чому співвідношення Ca/P ПЕО покриття ZrNb-500, подібного до гідроксиapatиту, може призвести до покращення біосумісних властивостей. Ці дані можуть свідчити про потовщення керамічного покриття зі збільшеною напругою, а також про збільшення включених елементів в оксидному шарі. Перша поява міді в поверхневому шарі була виявлена після проведення ПЕО в електроліті при 500 V. Було помічено, що підвищення напруги під час процесу плазмової електрооксидації в електроліті 0,1 М $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ призводить до зниження співвідношення Ti/Ca та Ti/P.

На рисунку 3.3.3 показані графіки рентгенівської дифракції сплаву ZrNb, обробленого ПЕО в електроліті, що містить Ca, P, KOH та наночастинки Cu.

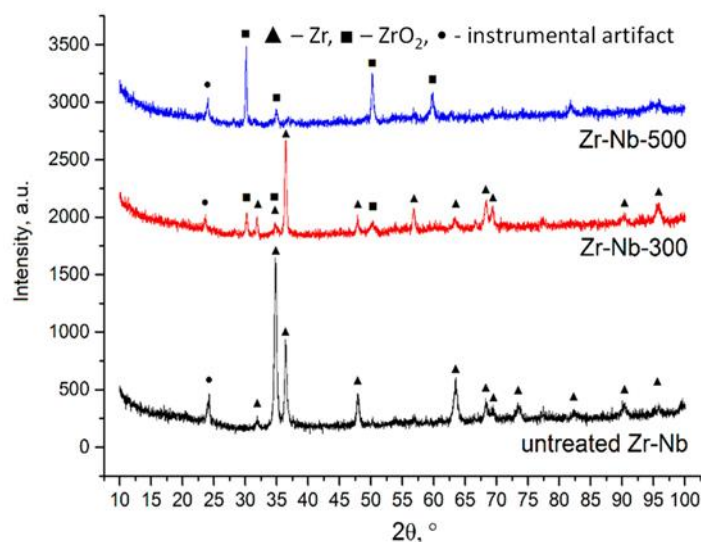


Рисунок 3.3.3 - діаграма рентгенівської дифракції сплавів ZrNb із покриттями ПЕО, утвореними в присутності наночастинок Cu

Діаграма XRD необробленого сплаву наведена нижче. Піки, позначені трикутниками відповідали Zr (картка JCPDS 5-665). Домішки Nb не змінили пікових положень на малюнку. Відносна інтенсивність відображень відрізнялася

від аналогічних показників карти JCPDS. На рентгенограммі зразків, оброблених ПЕО, при 300 V виникла фаза оксиду цирконію (ZrO_2 , картка JCPDS 49-1642, піки, позначені квадратами). Отже, дифракційна картина Zr у цьому випадку повністю відповідає еталону карти, що може свідчити не тільки про утворення оксиду на поверхні, але й про перегрупування металевих шарів. На малюнку зразка, обробленого при 500 V, відмічаються лише піки, що відповідають оксиду цирконію, що свідчить про утворення на поверхні товстого оксидного шару з кристалічною структурою ZrO_2 . Слід зазначити, що кристалічних фаз, що містять мідь, не виявлено. Пік, позначений •, не можна віднести до жодної кристалічної фази, і, швидше за все, це інструментальний артефакт.

Експериментальне покриття, сформоване на сплаві ZrNb при 500 V, було проаналізовано за допомогою методики XPS, а результати вимірювань представлені на рисунку 3.3.4 та в таблиці 3.3.2.

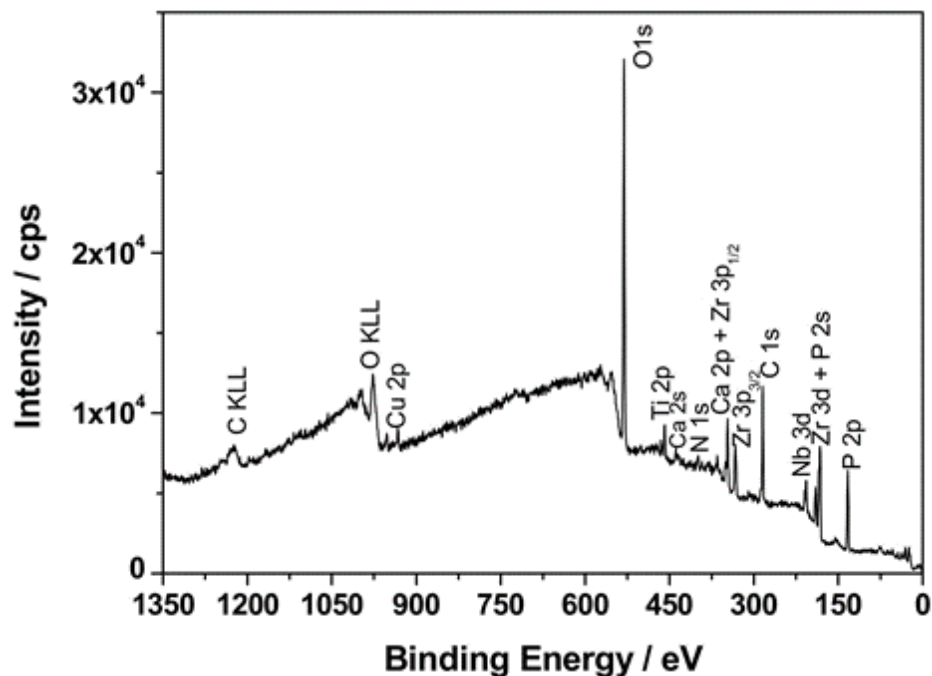


Рисунок 3.3.4 - XPS спектр зразка ZrNb-500

Хімічний склад шару ПЕО оцінювали за допомогою XPS-спектроскопії. Поверхневий аналітичний метод підтвердив наявність таких елементів: O, Zr, Nb, Ti, Ca, P, N, Cu та C, котрі показані на рисунку 3.3.4. Детальний аналіз спектрів XPS

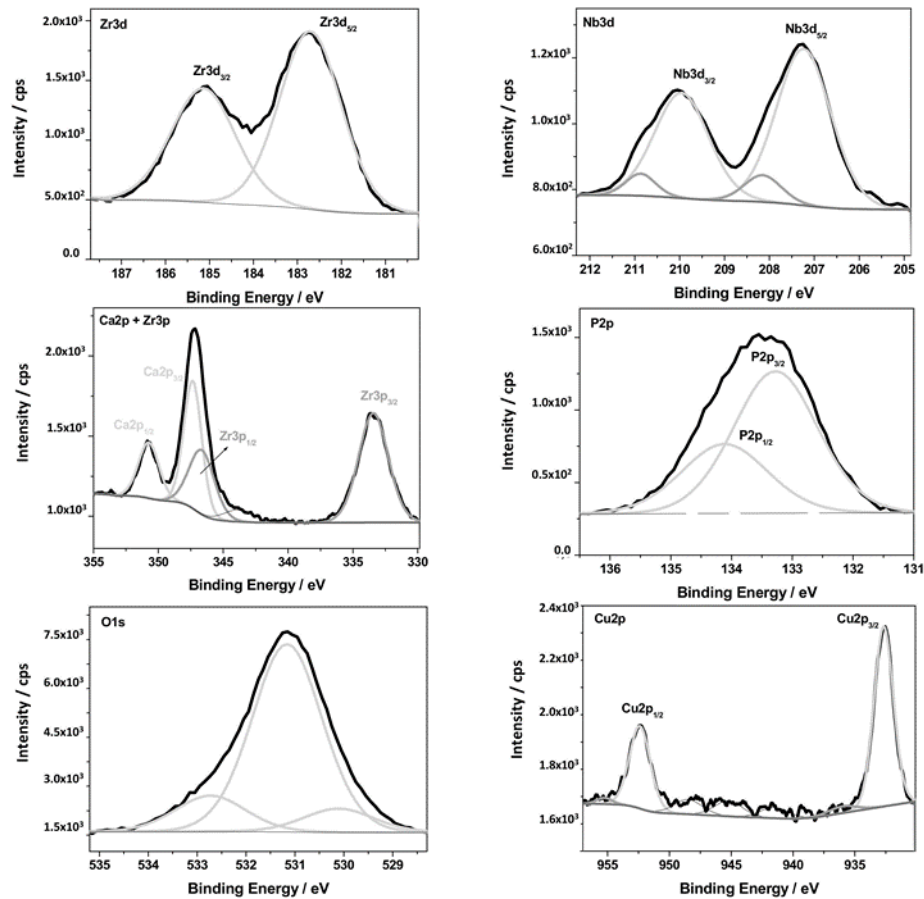


Рисунок 3.3.5 - спектри XPS з високою роздільною здатністю після процедури деконволюції

Результати іонів, що виділяються з аналізованих покриттів, представлені на Рисунок 3.3.6. Аналізуючи результати вивільнення різних іонів із покриттів ПЕО, можна зробити висновок, що концентрація іонів Ca була досить стабільною. Для всіх зразків та часу вивільнення рівень концентрації Ca становив $\sim 80,00 - 90,00$ мг/л і не змінювався протягом 2–6 тижнів після вивільнення. Інший висновок можна зробити у випадку концентрації іонів фосфору. Концентрації іонів P для ZrNb-300 та ZrNb-450 були не вище 1,00 мг/л, навіть після шести тижнів дослідження. Однак поверхня ZrNb анодизована в 500 V характеризується більш значним вивільненням іонів P, приблизно 0,35 – 0,40 мг/л. Це може бути пов'язано з більшим вмістом фосфору в оксидному шарі під час процесу ПЕО, в зв'язку з застосуванням більш високої напруги (500 V). Подібні результати були отримані щодо вивільнення іонів Cu. Зразки, анодовані при нижчій напрузі (300 V), характеризуються

вивільненням іонів Cu в концентрації менше ніж 0,10 мг/л, тоді як в умовах напруги 450 та 500 V з вивільнення іонів Cu становлять $\sim 0,35 - 0,40$ мг/л.

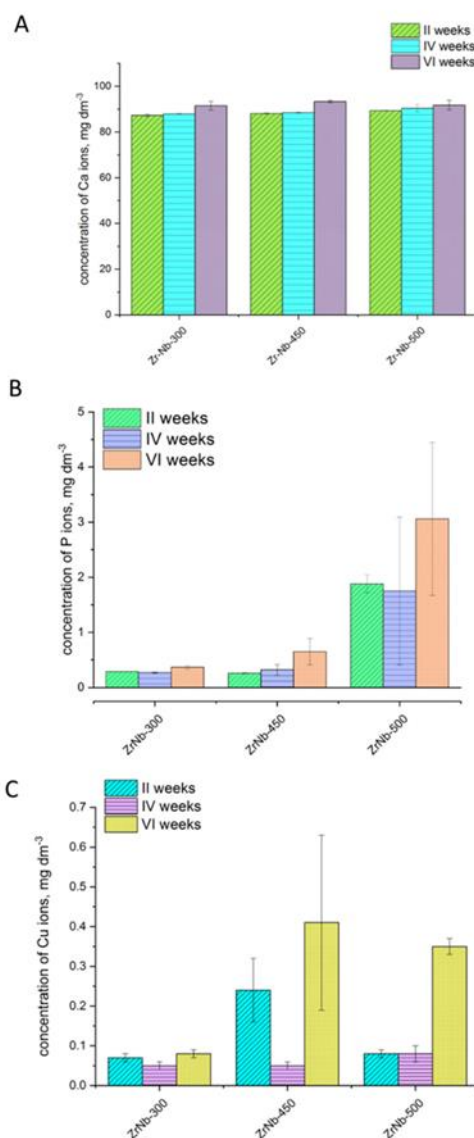


Рисунок 3.3.6 - концентрація іонів ((A) – Ca; (B) – P; (C) – Cu), що виділяються з покриттів після занурення в розчини Рінгера на термін до шести тижнів. Концентрація іонів Zr та Nb для всіх зразків після кожного вимірювання була нижче 0,01 мг / л (включаючи еталонну пробу).

Хоча XRD-аналіз не підтвердив присутність міді, аналіз EDX, XPS та ICP підтвердив. Це можна пояснити наявністю невеликої кількості міді в оксидному шарі. Крім того, мідь, інкорпорована в покриття ПЕО, може бути аморфною.

На рисунку 3.3.7 представлені результати цитосумісності зразків до та після обробки ПЕО (з додаванням CuNP). Через 24 години та три дні проліферації клітин на поверхні контрольних зразків відмічається значно нижча цитосумісність; відсоток скорочення резазурину був нижчим ніж 20%, тоді як він становив ~ 35–63% для експериментальних покриттів з включеними CuNPs. Після семи днів культивування клітин необроблена поверхня імплантату також характеризувалася відносно високою цитосумісністю, де відсоток резазурину становив ~ 55%. Незважаючи на те, що всі досліджені зразки показали хороші показники цитосумісності через сім днів, варто зазначити, що покриття, яке включає CuNP, виявило кращу цитосумісність вже на перший день дослідження. Що є важливою особливістю для забезпечення належного росту та розмноження живих клітин відразу після імплантації.

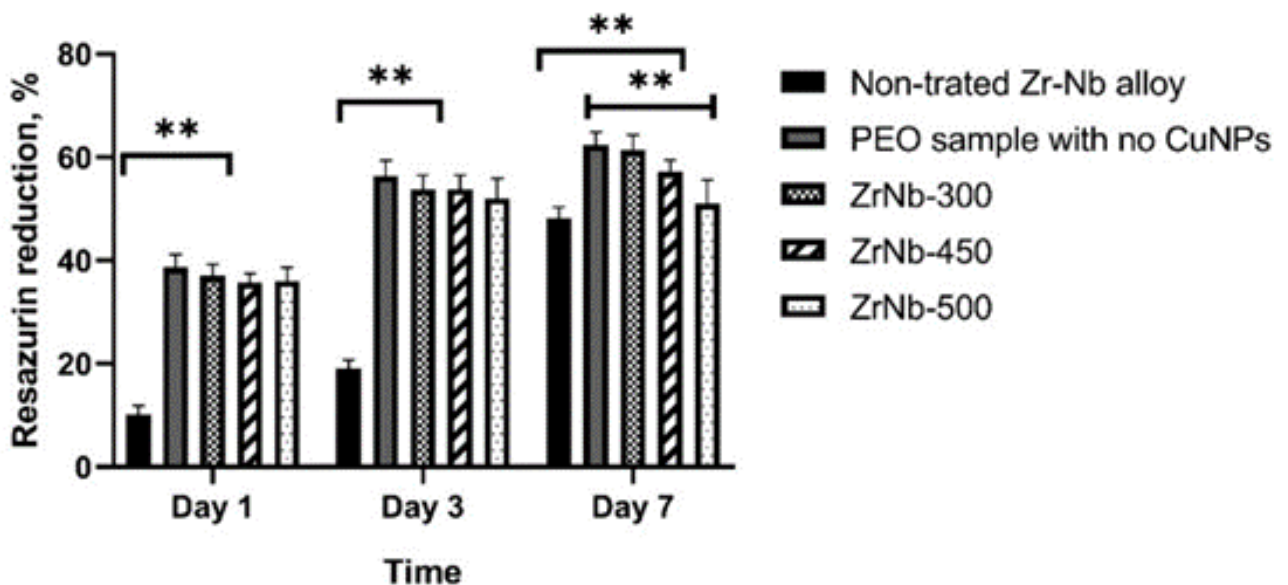


Рисунок 3.3.7 - тест на аналіз відновлення резазурину в різні періоди культивування остеобластів у зразках ZrNb з ПЕО в різних режимах напруги.

Зірочками позначено значення p між групами: ** - $p < 0,001$.

Усі зразки з CuNPs продемонстрували подібні адгезивні властивості бактерій через 2 год після культивації з максимальною концентрацією *S. aureus* при 3,7 log CFU (рисунок 3.3.8).

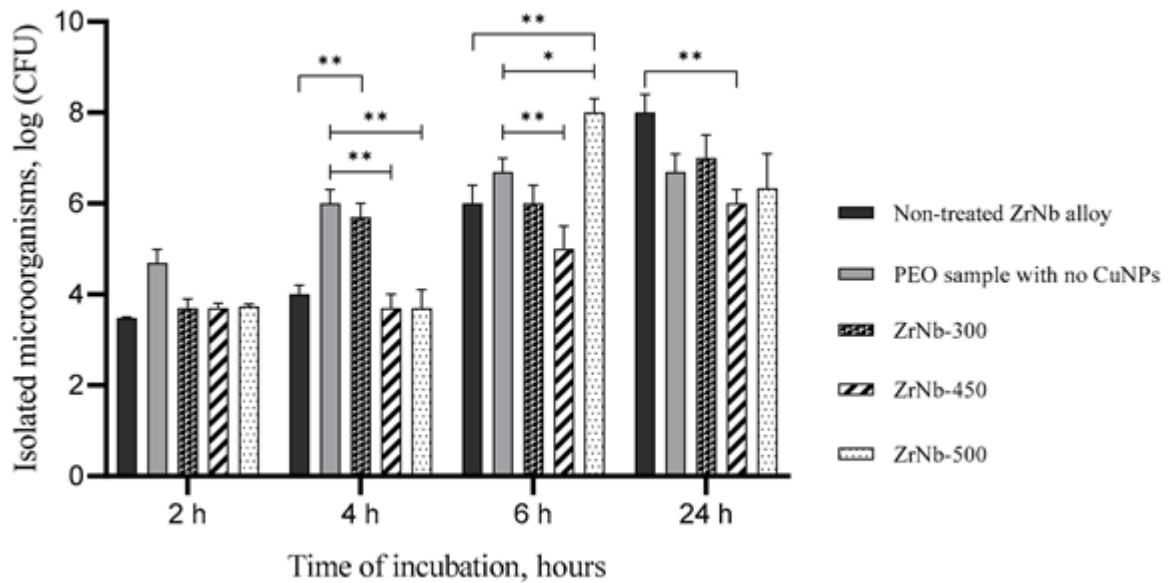


Рисунок 3.3.8 - кількість прикріплених бактерій на поверхнях зразків ZrNb у різні моменти часу інкубації. Дані є середніми та значення SD. Зірочками позначено значення p між групами:

* - $p < 0,005$; ** - $p < 0,0001$.

Суттєвих відмінностей між кількістю бактерій у зразках як сплавів Zr – Nb без ПЕО, так і зразків з ПЕО без CuNPs та ZrNb-300, ZrNb-450 та ZrNb-500 не було. Надмірний ріст бактерій був виявлений в контрольних зразках ПЕО та зразках ZrNb-300 через 4 год інкубації (до 6 log CFU) із суттєвими відмінностями порівняно із ZrNb-450 та ZrNb-500 ($p < 0,0001$), що забезпечували антиадгезивну активність. Однак виявлений швидкий ріст бактерій на поверхні ZrNb-500 через 6 год порівняно з усіма іншими зразками ($p < 0,0001$). Слід зазначити, що всі зразки, оброблені ПЕО, демонстрували меншу адгезію бактерій за 24 години інкубації порівняно з контрольними, але суттєві відмінності можна було виявити лише у режимі ZrNb-450. Найменша адгезія бактерій на поверхні ZrNb-450 може бути пов'язана з найвищим виділенням іонів Cu з поверхні ZrNb-450. Антибактеріальні властивості ПЕО-легованих покриттів не були кращими протягом перших 2–6 год порівняно з поверхнею без покриття. Хоча через 24 години всі три типи покриттів

- ПЕО з CuNP виявили сильніші бактеріостатичні ефекти, ніж необроблена поверхня. У цьому випадку кількість бактерій *S. aureus* була значно нижчою, ~ 10 – 100 разів, ніж для необроблених зразків. Результати показують, що включені CuNP до покриття ПЕО, виявляють бактеріостатичні властивості протягом 24 годин після процесу імплантації. Процес імплантації, як різновид операції, вимагає захисту від контамінації бактерій протягом перших кількох днів після операції, тому важливо забезпечити виражені бактеріостатичні властивості відразу після процесу імплантації.

(Результати розділу опубліковані в статтях:

V. Korniienko, O. Oleshko, Y. Husak, V. Deineka, V. Holubnych, O. Mishchenko, A. Kazek-Kęsik, A. Jakóbi-Kolon, R. Pshenychnyi, K. Leśniak-Ziółkowska, O. Kalinkevich, A. Kalinkevich, M. Pisarek, W. Simka, and M. Pogorielov, *Formation of a Bacteriostatic Surface on ZrNb Alloy via Anodization in a Solution Containing Cu Nanoparticles*, *Materials (Basel)*. 13, 3913 (2020).)

ВИСНОВКИ

1. Покриття ПЕО в обох варіантах силікатних електролітів (як з додаванням NaOH - 1, так і CaOH₂ - 2) представлені як відносно однорідні оксидні покриття. Мезопористість поверхні проявляється у різних формах, з мінімальним розміром пор для електроліту 1 і значно більшими порами для електроліту 2. Обидві поверхні проявляють виражені гідрофільні властивості. Плазмова електрооксидация з електролітом 2 забезпечує кращу корозійну стійкість експериментальної поверхні. Отримані результати вимагають подальшого вивчення ПЕО покриттів магнієвих зразків у *in vitro* та *in vivo* дослідженнях, зокрема для визначення рівня їх цитотоксичності та можливих антибактеріальних властивостей.

2. Покриття ПЕО забезпечуює однорідний пористий оксидний шар для фосфатного і силікатного електролітів. Поверхневий хімічний склад зразків відрізняється додатковими елементами завдяки використанню різних сполук електроліту. Поверхнева структура силікатного покриття характеризується рівномірним розподілом пор розміром до 1 мкм та високими властивостями змочуваності. Фосфатні покриття характеризуються не значною кількістю пор діаметром до 4 мкм на одиницю площі поверхні, гідрофобними властивостями та високим показником шорсткості, порівняно з силікатним покриттям. Результати втрати ваги показали хорошу корозійну стійкість для покриттів обох типів. Бактеріальний тест на адгезію показав, що оксидні плівки, створені із запропонованими електролітними композиціями за допомогою ПЕО, можуть затримати початкову адгезію *S. aureus* на поверхні зразків, що можна використовувати для запобігання формування бактеріальної біоплівки.

Згідно з результатами, силікатне покриття є більш придатним для хірургічного застосування завдяки морфологічним властивостям та низькій швидкості деградації. Більш того, необхідно провести додаткові дослідження, спрямовані на визначення цитотоксичності та цитосумісності експериментальних поверхонь з різними електролітами.

3. Модифікація поверхні сплаву ZrNb шляхом плазмової електрооксидації у розчині Са – Р з наночасточками міді утворює стійкий керамічний шар, з включеними у нього CuNPs. Експериментальна поверхня забезпечує кращу адгезію остеобластів впродовж всіх часових періодів, порівняно з необробленим металом та демонструє антибактеріальну активність середнього ступеня. Процес ПЕО при напрузі електричного струму в 450 V може забезпечити кращі антибактеріальні властивості, а отже є рекомендованими для подальших досліджень.

(Результати розділу опубліковані в статтях:

Oleksandr Oleshko, Yevheniia Husak, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Sergiy Kyrylenko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Physical and Chemical Characterization of The Surfaces of Magnesium Alloys, Modified By Plasma Electrolytic Oxidation, After Immersion In Simulated Body Fluid*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020

Yevheniia Husak, Oleksandr Oleshko, Tetiana Oleshko, Viktoriia Kornienko, Bohdan Dryhval, Julia Dudko, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov, *Structural and Biological Assessment of Mg Alloy Surface after Plasma Electrolytic Oxidation in Different Solutions*, IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2020) Sumy, Ukraine, 9-13 Nov. 2020

V. Kornienko, O. Oleshko, Y. Husak, V. Deineka, V. Holubnycha, O. Mishchenko, A. Kazek-Kęsik, A. Jakóbi-Kolon, R. Pshenychnyi, K. Leśniak-Ziółkowska, O. Kalinkevich, A. Kalinkevich, M. Pisarek, W. Simka, and M. Pogorielov, *Formation of a Bacteriostatic Surface on ZrNb Alloy via Anodization in a Solution Containing Cu Nanoparticles*, *Materials* (Basel). 13, 3913 (2020).)

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Patel, A.R.; Patra, F.; Shah, N.P.; Shukla, D. Biological control of mycotoxins by probiotic lactic acid bacteria. *Dyn. Dairy Ind. Consum. Demands* 2017, 2015, 2–4.
2. Ehlers, M.R.; Todd, R.M. Genesis and Maintenance of Attentional Biases: The Role of the Locus Coeruleus-Noradrenaline System. *Neural Plast.* 2017, 1, 2–3.
3. Li, B.; Ge, Y.; Wu, Y.; Chen, J.; Xu, H.H.; Yang, M.; Li, M.; Ren, B.; Feng, M.; Weir, M.D.; et al. Anti-Bacterial and Microecosystem-Regulating Effects of Dental Implant Coated with Dimethylaminododecyl Methacrylate. *Molecules* 2017, 22, 2013
4. Velasco-Ortega, E.; Ortiz-García, I.; Jiménez-Guerra, A.; Monsalve-Guil, L.; Muñoz-Guzón, F.; Perez, R.A.; Gil, F.J. Comparison between sandblasted acid-etched and oxidized titanium dental implants: In vivo study. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3267.
5. Michalska, J.; Sowa, M.; Piotrowska, M.; Widziołek, M.; Tylko, G.; Dercz, G.; Socha, R.P.; Osyczka, A.M.; Simka, W. Incorporation of Ca ions into anodic oxide coatings on the Ti-13Nb-13Zr alloy by plasma electrolytic oxidation. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 104, 109957.
6. Polo, T.O.B.; da Silva, W.P.; Momesso, G.A.C.; Lima-Neto, T.J.; Barbosa, S.; Cordeiro, J.M.; Hassumi, J.S.; da Cruz, N.C.; Okamoto, R.; Barão, V.A.; et al. Plasma Electrolytic Oxidation as a Feasible Surface Treatment for Biomedical Applications: An in vivo study. *Sci. Rep.* 2020, 10, 1–11.
7. Yeung, W.K.; Reilly, G.C.; Matthews, A.; Yerokhin, A. In vitro biological response of plasma electrolytically oxidized and plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V alloy. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2013, 101, 939–949.
8. Chung, C.J.; Su, R.T.; Chu, H.J.; Chen, H.T.; Tsou, H.K.; He, J.L. Plasma electrolytic oxidation of titanium and improvement in osseointegration. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2013, 101, 1023–1030.
9. Insua, A.; Monje, A.; Wang, H.L.; Miron, R.J. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2017, 105, 2075–2089.

10. Liaw, K.; Delfini, R.H.; Abrahams, J.J. Dental Implant Complications. *Semin. Ultrasound CT MRI* 2015, 36, 427–433.
11. Kirmanidou, Y.; Sidira, M.; Drosou, M.E.; Bennani, V.; Bakopoulou, A.; Tsouknidas, A.; Michailidis, N.; Michalakis, K. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *BioMed Res. Int.* 2016, 2016, 2908570
12. Al-Radha, A.S.D.; Dymock, D.; Younes, C.; O’Sullivan, D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J. Dent.* 2012, 40, 146–153.
13. Siddiqi, K.S.; Husen, A.; Rao, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnol.* 2018, 16, 14.
14. Escárcega-González, C.E.; Garza-Cervantes, J.A.; Vazquez-Rodríguez, A.; Montelongo-Peralta, L.Z.; Treviño-Gonzalez, M.T.; Castro, E.D.B.; Saucedo-Salazar, E.M.; Morales, R.C.; Soto, D.R.; González, F.T.; et al. In vivo antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using acacia rigidula as a reducing and capping agent. *Int. J. Nanomed.* 2018, 13, 2349–2363.
15. Pokrowiecki, R.; Zareba, T.; Szaraniec, B.; Pałka, K.; Mielczarek, A.; Menaszek, E.; Tyski, S. In vitro studies of nanosilver-doped titanium implants for oral and maxillofacial surgery. *Int. J. Nanomed.* 2017, 12, 4285–4297. [CrossRef]
16. Molteni, C.; Abicht, H.K.; Solioz, M. Killing of bacteria by copper surfaces involves dissolved copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76, 4099–4101.
17. Oleshko, O.; Deineka, V.V.; Husak, Y.; Korniienko, V.; Mishchenko, O.; Holubnycha, V.; Pisarek, M.; Michalska, J.; Kazek-Keşik, A.; Jakóbi-Kolon, A.; et al. Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy. *Materials* 2019, 12, 3742.
18. Shirazi, H.A.; Ayatollahi, M.R.; Asnafi, A. To reduce the maximum stress and the stress shielding effect around a dental implant–bone interface using radial functionally graded biomaterials. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng.* 2017, 20, 750–759.

19. Yu, S.R.; Zhang, X.P.; He, Z.M.; Liu, Y.H.; Liu, Z.H. Effects of Ce on the short-term biocompatibility of Ti-Fe-Mo-Mn-Nb-Zr alloy for dental materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004, 15, 687–691.
20. Hashim, D.; Cionca, N.; Courvoisier, D.S.; Mombelli, A. A systematic review of the clinical survival of zirconia implants. *Clin. Oral Investig.* 2016, 20, 1403–1417.
21. Zhao, X.L.; Li, L.; Niinomi, M.; Nakai, M.; Zhang, D.L.; Suryanarayana, C. Metastable Zr–Nb alloys for spinal fixation rods with tunable Young’s modulus and low magnetic resonance susceptibility. *Acta Biomater.* 2017, 62, 372–384.
22. 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.
23. Hao, Y.; Huang, X.; Zhou, X.; Li, M.; Ren, B.; Peng, X.; Cheng, L. Influence of dental prosthesis and restorative materials interface on oral biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3157.
24. Yongjun Chen, Zhigang Xu, Christopher Smith, Jag Sankar, “Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants,” *Acta Biomater.* 10(11), pp. 4561-4573, Nov. 2014.
25. Y. Husak, O. Solodovnik, M. Pogorielov, O. Oleshko, Y. Kozik, A. Yusupova, O. Mishchenko. Mg alloys in vitro degradation in simulated body fluid and citrate solutions. *Proceedings of the 2017 IEEE 7th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties*, 04NB09, 2017.
26. Barati Darband Gh., Aliofkhazraei M., Hamghalam P., Valizade N., “Plasma electrolytic oxidation of magnesium and its alloys: Mechanism, properties and applications,” *Journal of Magnesium and Alloys*, vol 5. issue 1, pp. 74-132, 2017.
27. Peng Tian and Xuanyong Liu, “Surface modification of biodegradable magnesium and its alloys for biomedical applications,” *Regenerative Biomaterials*, 2(2), pp. 135–151, 2015.
28. Shuang Wu, Yong-Seok Jang, Yu-Kyoung Kim, Seo-Young Kim, Seung-O Ko and Min-Ho Lee, “Surface Modification of Pure Magnesium Mesh for Guided Bone

Regeneration: In Vivo Evaluation of Rat Calvarial Defect,” *Materials*, vol 12, p.2684, 2019.

29.Nabil Nassif and Ibrahim Ghayad, “Corrosion Protection and Surface Treatment of Magnesium Alloys Used for Orthopedic Applications,” *Biomaterials: Advances and Applications*, vol. 2013, p. 10, 2013.

30.Wu, H., Xi, K., Xiao, S., Qasim, A. M., Fu, R. K. Y., Shi, K., Chu, P. K., “Formation of self-layered hydrothermal coating on magnesium aided by titanium ion implantation: Synergistic control of corrosion resistance and cytocompatibility,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 1, p. 26251, 2020.

31.Ieva Bružauskaitė, Daiva Bironaitė, Edvardas Bagdonas, and Eiva Bernotienė, “Scaffolds and Cells for Tissue Regeneration: Different Scaffold Pore Sizes—Different Cell Effects,” *Cytotechnology*, vol. 68(3), pp. 355–369, 2016.

32.Mori, Y., Koshi, A., Liao, J., Asoh, H., & Ono, S., “Characteristics and Corrosion Resistance of Plasma Electrolytic Oxidation Coatings on AZ31B Mg-alloy Formed in Phosphate – Silicate Mixture Electrolytes,” *Corrosion Scienc*, vol. 88, p. 254–262, 2014.

33.Jia Z. J., Li M., Liu Q., Xu X. C., Cheng Y., Zheng Y. F., Xi T. F., Wei S. C., “Micro-arc Oxidization of a Novel Mg–1Ca Alloy in Three Alkaline KF Electrolytes: Corrosion Resistance and Cytotoxicity,” *Appl. Surf. Sci.*, 292, pp. 1030–1039, 2014.

34.Yansong Wang, Minfang Chen, and Yun Zhao, “Preparation and Corrosion Resistance of Microarc Oxidation-Coated Biomedical Mg–Zn–Ca Alloy in the Silicon–Phosphorus-Mixed Electrolyte,” *ACS Omega*, 17:4(25), pp. 20937-20947, Dec. 2019.