

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Дригваль Богдан Олександрович

УДК 616-089.843; 616.71-089; 615.465

ДИСЕРТАЦІЯ

БІОСУМІСНІСТЬ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ
ОРТОПЕДИЧНИХ ІМПЛАНТАТІВ З МАГНІЄВИХ СПЛАВІВ,
МОДИФІКОВАНИХ З ВИКОРИСТАННЯМ ПЛАЗМОВОЇ
ЕЛЕКТРОЛІТИЧНОЇ ОКСИДАЦІЇ

222 – Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Б.О. Дригваль

Науковий керівник – **Погорелов Максим Володимирович**, доктор медичних наук, професор

Олешко Олександр Миколайович, кандидат медичних наук, доцент

Суми – 2023

АНОТАЦІЯ

Дригваль Б. О. Біосумісність та антибактеріальні властивості ортопедичних імплантатів з магнієвих сплавів, модифікованих з використанням плазмової електролітичної оксидації. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина». – Навчально-науковий медичний інститут, Сумський державний університет, Суми, 2023.

На даний час імплантологія займає одну з провідних ролей при лікуванні пошкоджень опорно-рухового апарату. Довгий час в імплантології використовувались автотрансплантати, але на ряду з позитивними характеристиками, такими як остеоіндуктивність та остеогенність, вони мають безліч побічних ускладнень при їх використанні та обмежені ресурси. На даний час одним із пріоритетних матеріалів при лікуванні дефектів кісткової тканини є металеві імплантати. Незважаючи на те що на даний час вони є еталоном під час використання несучих конструкцій та відповідають безлічі критеріїв при використанні матеріалів під час імплантації довгострокових металоконструкцій, вони мають і певні недоліки. З часом використання таких конструкцій може супроводжуватися фізичним подразненням, хронічними запальними реакціями або викликати генотоксичність чи канцерогенність. Більшість металевих імплантатів мають відмінні від кісткової тканини механічні властивості, що може призводити до розвитку синдрому «зміщення стресу». Від так, при даних умовах, потребується повторне оперативне втручання після відновлення функцій та механічної цілісності пошкоджених тканин. Для вирішення даної проблеми імплантології потрібна розробка біодеградуєчих імплантатів, котрі будуть позбавлені недоліків вищевказаних матеріалів, матимуть контрольовану швидкість корозії, збережені механічні властивості до повного загоєння пошкоджених тканин та не потребуватимуть додаткових оперативних втручань. На даний час, в якості біодеградуєчих матеріалів досліджуються два класи матеріалів: полімери та метали. Імплантати на основі полімерів є широко поширеними і, як правило,

виготовляються з природних полімерів. Головною перевагою полімерних імплантатів є можливість легко адаптувати їх швидкість біодеградації. Але зниженням механічних властивостей полімерних матеріалів у фізіологічних середовищах різко обмежує їх використання у несучих конструкціях. Виходячи з цього, перспективним матеріалом для даного типу імплантацій є біодеградуючі метали, які мають високу ударну міцність, зносостійкість, пластичність і в'язкість, на відміну від полімерних матеріалів. В даний час існує три види біодеградуючих металів залізо (Fe), цинк (Zn) та магній (Mg). Повільна швидкість деградації та феромагнітна природа заліза не дозволила йому набути широкого розповсюдження в імплантології. Як правило, імплантати на основі Fe деградують дуже повільно, близько 2-3 років, що значно перевищує клінічні вимоги та може призвести до появи ускладнень, а продукти корозії не виводяться з організму в достатній швидкості. Сплави на основі цинку, на ряду з їх перевагами, такими як простота виготовлення чи відсутність токсичності, існують і негативні характеристики, а саме низька міцність, пластичність, що не дозволяють використання його в підтримуючих металоконструкціях. Результатом цього стало, що матеріали на основі Zn використовуються виключно, як біодеградуючі скоби, хірургічні затискачі, заклепки, мікрозатискачі, заглушки або у вигляді серцево-судинних стентів. Що ж до магнію, він грає важливу роль в структурі кісток, як основний компонент кристалічного гідроксиапатиту, що є головним складовим елементом кістки. Відсутність магнію в кристалах гідроксиапатиту може призвести до збільшення їхнього розміру, що робить кістки більш крихкими і схильними до переломів. В той час, як чудові біомеханічні та біодеградуючі параметри Mg, його нетоксичність по відношенню до клітин та участі іонів у пришвидшенні загоєння ран роблять цей матеріал перспективним для подальших досліджень.

Дисертація присвячена дослідженню біосумісності та антибактеріальних властивостей ортопедичних імплантатів з магнієвих сплавів, модифікованих з використанням плазмової електролітичної оксидації

(ПЕО), їх фізико-хімічних характеристик, структурних особливостей, біосумісності, системної токсичності та антибактеріальних властивостей.

В ході дисертаційної роботи ми досліджували зразки, які модифікувалися у різних електролітичних ваннах та за різної анодуючої напруги. Дані зразки були поділені на два типи С1 та С2, які в своєму складі мали по два зразка 200 В, 250 В та 250 В, 300 В відповідно.

Усі експерименті зразки були досліджені за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, рентгенівської енергодисперсійної спектроскопії, дослідження поперечного перерізу, шорсткості поверхні та профілю зносу, визначення гідрофобності та гідрофільності поверхонь, фотолюмінісценції, тестів деградації з SBF *in-vitro*, аналізу антибактеріальних властивостей, визначення токсичності та біосумісності за допомогою культур клітин.

Поверхня модифікованих Mg імплантатів характеризувалася пористою структурою з розподілом пор від субмікронних (менше 0,5 мкм) до поодиноких пор з розмірами від 1 до 5 мкм у розчинах С1 та, від 1 мкм до 5 мкм – у розчині С2. В той час як збільшення напруги зменшувало загальну пористість для обох груп.

Рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія продемонструвала наявність Si у всіх зразках та залежність концентрації від напруги. Оксидний шар поверхонь був ідентифікований присутністю O у зразках та підтверджений картуванням поперечного перерізу. Також відзначалися невеликі включення Na та Ca в залежності від складу електролітичної ванни.

Дослідження фотолюмінісценції допомогли нам виявити більшу кількість структурних дефектів у зразках типі С2 у порівнянні з типом С1 та залежність кількості дефектів від напруги. Аналіз антибактеріальної активності показав більш високе інгібування бактеріальної адгезії у зразках С1.

Визначення токсичності та біосумісності з використанням культур клітин продемонструвало задовільну адгезію та проліферацію клітин на поверхні зразків. В ході дослідження також було виявлено підвищення рівня

токсичності зразків в результаті корозії покриттів та наявності структурних дефектів.

Проаналізувавши одержані результати, для кінцевого експерименту по дослідженню взаємодії імплантат-тканина та біосумісності було відібрано два зразки з різних груп, а саме С1 250 В та С2 300 В. В ході досліджень дані зразки продемонстрували наявність антибактеріальних властивостей, а також продемонстрували гарні результати під час тесту на деградацію та визначення токсичності за допомогою культур клітин. До групи порівняння увійшли зразки чистого Mg без модифікацій. Було проведено імплантацію в підшкірно-жирову клітковину лабораторних щурів з подальшими вивченням взаємодії елементів сполучної тканини з поверхнею імплантатів за допомогою гістологічних досліджень, які показали розростання сполучної тканини, утворення окремих вогнищ грануляційної тканини на завершальному етапі дозрівання та відсутність місцевого та загального прозапального і токсичного впливу при використанні зразків С2 300 В, в той час, як зразки С1 250 В показали протилежні результати на 7-му добу, а до другого запланованого терміну у 31 день не дожило жодного щура. Групу порівняння не вдалося дослідити у зв'язку зі смертю всіх піддослідних тварин на другий день експерименту.

Крім того, імуногістохімічний аналіз виявив відмінні клітинні відповіді між групами, зокрема в групі С1 250 В переважали М1 макрофаги, а С2 300 В - М2 макрофаги та α SMA+ міофібробласти. Ці дані свідчать про те, що модифікація поверхні С2 300 В сприяє більш сприятливому середовищу для заживлення тканин, сприяючи прорегенеративній відповіді.

Отримані дані поглиблюють знання з процесу плазмової електролітичної оксидації сплавів магнію, утворення модифікованих поверхонь імплантатів Mg та впливу їх на елементи сполучної тканини. Процес імплантації та взаємодії з елементами сполучної тканини залежить від розчину електролітичної ванни та напруги при модифікації, терміну корозійної стійкості й запального процесу в місці імплантації.

Результати дослідження доводять, що магнієві імплантати модифіковані шляхом плазмової електролітичної оксидації у силікатних розчинах мають однорідну структуру покриття, володіють антибактеріальними властивостями та біосумісні.

Отже, отримані дані по кількісному та якісному складу електролітичної ванни для ПЕО, параметри напруги оксидування можуть використовуватись для виготовлення імплантатів медичного призначення, для лікування дефектів кісткової тканини, котрі потребують тимчасових металевих конструкцій та не потребують повторних оперативних втручань.

Ключові слова: медичні імплантати, магнієві біодеградуючі імплантати, біомінералізація, сполучна тканина, модифікація поверхні, гістологія, імуногістохімія сполучної тканини, in-vivo оцінка.

SUMMARY

Dryhval B. O. Biocompatibility and Antibacterial Properties of Orthopedic Implants Made from Magnesium Alloys Modified by Plasma Electrolytic Oxidation. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 "Medicine". – Educational and Scientific Medical Institute, Sumy State University, Sumy, 2023.

Currently, implantology occupies one of the leading roles in the treatment of injuries in the musculoskeletal system. For a long time, autotransplants have been used in implantology, but along with positive characteristics, such as osteoinductivity and osteogenicity, they have many side complications during their use and limited resources. One of the priority materials in the treatment of bone tissue defects is metal implants. Even though they are currently the standard when using load-bearing structures and meet many criteria when using materials during the implantation of long-term metal structures, they also have certain disadvantages. Over time, the use of such structures can be accompanied by physical irritation, chronic inflammatory reactions, or causes genotoxicity or carcinogenicity. Most metal implants have different mechanical properties from bone tissue, which can

lead to the development of "stress displacement" syndrome. Therefore, under these conditions, repeated surgical intervention is required after restoring the functions and mechanical integrity of the damaged tissues. To solve this problem of implantology, it is necessary to develop biodegradable implants, which will be devoid of the disadvantages of the above-mentioned materials, have a controlled corrosion rate, preserve mechanical properties until damaged tissues are healed completely, and will not require additional surgical interventions.

Currently, two classes of materials are being studied as biodegradable materials: polymers and metals. Polymer-based implants are widely used and are typically made from natural polymers. The main advantage of polymer implants is their ability to easily adjust their biodegradation rate. However, a significant decrease in the mechanical properties of polymer materials in physiological environments greatly limits their use in load-bearing structures. Based on this, biodegradable metals, which, unlike polymer materials, have high impact strength, wear resistance, plasticity, and viscosity, are promising materials for this type of implantation. Currently, there are three types of biodegradable metals: iron (Fe), zinc (Zn), and magnesium (Mg). The slow degradation rate and ferromagnetic nature of iron have prevented it from gaining widespread use in implantology. Typically, Fe-based implants degrade very slowly, around 2-3 years, which significantly exceeds clinical requirements and can lead to complications, as corrosion products are not eliminated from the body at a sufficient rate. Zinc-based alloys, despite their advantages such as ease of manufacturing and lack of toxicity, have some negative characteristics, notably low strength and plasticity, which restrict their use in load-bearing metal structures. As a result, materials based on Zn are exclusively used as biodegradable staples, surgical clips, fasteners, microclips, plugs, or in the form of cardiovascular stents. As for magnesium, it plays a crucial role in bone structure as the primary component of crystalline hydroxyapatite, which is the main constituent of bone. The absence of magnesium in hydroxyapatite crystals can lead to an increase in their size, making bones more brittle and prone to fractures. While magnesium exhibits excellent biomechanical and biodegradable qualities of Mg, its

non-toxicity towards cells, and the participation of ions in accelerating wound healing make this material promising for further research.

The dissertation is devoted to the study of the interaction of connective tissue elements with the surface of implants, which are modified with the help of plasma electrolytic oxidation (PEO) in silicate solutions, their physical and chemical characteristics, structural features, biocompatibility, systemic toxicity, and antibacterial properties.

We studied samples modified in different electrolytic baths and at different anodizing voltages during the dissertation. These samples were divided into S1 and S2, which included two samples of 200 V, 250 V, and 250 V, 300 V, respectively.

All experimental samples were investigated using scanning electron microscopy, X-ray energy dispersive spectroscopy, cross-sectional studies, surface roughness, and wear profile, determination of hydrophobicity and hydrophilicity of surfaces, photoluminescence, degradation tests with SBF in-vitro, analysis of antibacterial properties, determination of toxicity and biocompatibility by using cell cultures.

The surface of modified Mg implants was characterized by a porous structure with a distribution of pores from submicron (less than 0.5 μm) to individual pores with sizes from 1 to 5 μm in S1 solutions and from 1 μm to 5 μm in S2 solution. While increasing the voltage decreased the total porosity for both groups.

X-ray energy dispersive spectroscopy demonstrated the presence of Si in all samples and the dependence of concentration on voltage. The oxide layer of the surfaces was identified by the presence of O in the samples and confirmed by cross-sectional mapping. Slight inclusions of Na and Ca were also noted, depending on the composition of the electrolytic bath.

Photoluminescence studies helped us to reveal a more significant number of structural defects in samples of type S2 compared to type S1 and the dependence of the number of defects on voltage. Analysis of antibacterial activity showed a higher inhibition of bacterial adhesion in S1 samples.

Determination of toxicity and biocompatibility using cell cultures demonstrated satisfactory adhesion and proliferation of cells on the surface of the

samples. During the study, an increase in the level of toxicity of the samples was also revealed due to corrosion of the coatings and the presence of structural defects.

After analyzing the obtained results, two samples from different groups, namely S1 250 V and S2 300 V, were selected for the final experiment on the study of implant-tissue interaction and biocompatibility. During the research, these samples demonstrated the presence of antibacterial properties and good results during degradation tests and determination of toxicity using cell cultures. The comparison group included samples of pure Mg without modifications. Implantation was carried out in the subcutaneous adipose tissue of laboratory rats with further study of the interaction of connective tissue elements with the surface of the implants using histological studies, which showed the growth of connective tissue, the formation of separate foci of granulation tissue at the final stage of maturation, and the absence of local and general pro-inflammatory and toxic effects at using samples S2 300 V, while samples S1 250 V showed the opposite results on the 7th day, and not a single rat survived to the second planned term of 31 days. The comparison group could not be studied due to the death of all experimental animals on the second day of the experiment.

In addition, immunohistochemical analysis revealed distinct cellular responses between the groups: in the S1 250V group M1 macrophages predominated, and in the S2 300V group M2 macrophages and α SMA+ myofibroblasts predominated. These data suggest that surface modification of S2 300V promotes a more favorable environment for tissue healing, promoting a pro-regenerative response.

The obtained data deepen the knowledge of the plasma electrolytic oxidation process of magnesium alloys, the formation of modified surfaces of Mg implants, and their influence on connective tissue elements. The process of implantation and interaction with the elements of the connective tissue depends on the solution of the electrolytic bath and the voltage during modification, the term of corrosion resistance, and the inflammatory process in the place of implantation.

The study's results prove that magnesium implants modified by plasma electrolytic oxidation in silicate solutions have a uniform coating structure, have antibacterial properties, and are biocompatible.

So, the obtained data on the quantitative and qualitative composition of the electrolytic bath for PEO and the oxidation voltage parameters can be used to manufacture medical implants to treat bone tissue defects that require temporary metal structures and do not require repeated surgical interventions.

Keywords: medical implants, magnesium biodegradable implants, biomineralization, connective tissue, surface modification, histology, connective tissue immunohistochemistry, in-vivo assessment.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Oleshko O, Deineka V, Husak Y, Korniienko V, **Dryhval B**, Dudko J, et al. Plasma Electrolytic Oxidation of TiZr Alloy in ZnONPs-Contained Solution: Structural and Biological Assessment. In: Springer Proc Phys [Internet]. Springer Proc. Phys; 2020. p. 75–82. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-3996-1_8. (Дисертант провів експериментальне дослідження, виконав огляд літератури, сформулював результати дослідження).
2. Oleshko O, Kornienko V, Kyrylenko S, Simka W, Husak Y, **Dryhval B**, et al. Physical and Chemical Characterization of the Magnesium Surface Modified by Plasma Electrolytic Oxidation – Influence of Immersion in Simulated Body Fluid. In: 2020 IEEE 10th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2020. p. 02BA11-1-02BA11-4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9309586/>. (Здобувач провів експериментальне дослідження, сформулював результати дослідження та висновки, підготував статтю до друку).
3. Husak Y, Kornienko V, Simka W, Oleshko O, Oleshko T, **Dryhval B**, et al. Structural and Biological Assessment of Mg Alloy Surface after Plasma Electrolytic Oxidation in Different Solutions. In: 2020 IEEE 10th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2020. p. 02BA08-1-02BA08-4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9309693/>. (Автор провів дослідження фізичних властивостей, опрацював результати дослідження та сформулював висновки).
4. Husak Y, Michalska J, Oleshko O, Korniienko V, Grundsteins K, **Dryhval B**, et al. Bioactivity Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions. *Molecules* [Internet]. 2021 Apr 6;26(7):2094. Available

from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/7/2094>. (Здобувач провів експериментальне дослідження по деградації, виконав огляд літератури).

5. Husak Y, Oleshko O, Michalska J, Korniienko V, Solodovnyk O, **Dryhval B**. F- and P-enriched Coatings for Mg Implants by Low Energy PEO Process. In: 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2021. p. 1–4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9568602/>. (Автор провів експериментальне дослідження та літературний пошук, опрацював отримані результати, сформував висновки).

6. **Dryhval B**, Husak Y, Sulaieva O, Deineka V, Pernakov M, Lyndin M, et al. In Vivo Safety of New Coating for Biodegradable Magnesium Implants. Materials (Basel) [Internet]. 2023 Aug 24;16(17):5807. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/16/17/5807>. (Дисертант провів експериментальне дослідження, виконав огляд літератури, опрацював статистичні дані та підготував статтю до друку).

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

7. **Dryhval B**, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Modification of magnesium alloys using plasma electrolytic oxidation in silicate solutions. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 109. (Автор провів дослідження фізичних властивостей, опрацював результати дослідження та підготував тези до друку).

8. **Dryhval B**, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Effect of koh for cell toxicity and antibacterial properties of metal alloys after PEO. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 110. (Дисертант визначив цитотоксичність, виконав огляд літератури, описав результати дослідження та підготував тези до друку).

9. **Dryhval B**, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Plasma electrolytic oxidation for surface modification of pure magnesium. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 111. (Дисертант структурний аналіз, виконав огляд літератури, опрацював статистичні дані, та підготував тези до друку).
10. Oleshko O, Deineka V, Korniienko V, Dudko J, **Dryhval B**. Effect of CuNPs for cell toxicity and antibacteria properties of metal alloy after PEO. Nanomaterials For Biosensor and Biomedical Applications International conference Jurmala, Latvia 2-4 July; 2019. p. 45. (Дисертант провів мікробіологічне дослідження, виконав огляд літератури, опрацював статистичні дані, та підготував тези до друку).
11. **Dryhval B**, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Wettability and roughness profile coatings of magnesium obtained by PEO in different solutions. BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2020. p. 85. (Автор провів дослідження фізичних властивостей, опрацював результати дослідження, та підготував тези до друку).
12. Husak Y, **Dryhval B**. Phosphate and Fluoride Bath Electrolyte for Lowenergy PEO Coatings on Mg-based Biodegradable Materials. Surfcoat Korea; 2021. (Дисертант провів експериментальне дослідження, опрацював отримані результати, сформував висновки, підготував тези до друку).
13. **Dryhval B**, Savchenko A, Oleshko O, Husak Y. Dynamic fluid circulation system for investigation surface adhesive properties. ABSTRACT BOOK BIOMEDICAL PERSPECTIVE III International Medical Conference; 2021. p. 95. (Автор провів експериментальне дослідження, опрацював результати, підготував тези до друку).
14. Husak Y, Kyrylenko S, Korniienko V, Diedkova K, Roshchupkin A, **Dryhval B**, et al. Biological properties of silicate based peo coatings on the pure Mg. 12th International Conference “Nanomaterials: Applications & Properties” (IEEE NAP-2022), Kraków, Poland. IEEE; 2022. p. 128. (Дисертант провів

експериментальне дослідження, опрацював отримані результати, сформував висновки, підготував тези до друку).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	24
1.1. Імпланти для ортопедії – сучасні данні, статистика використання, ускладнення	24
1.2. Біодеградуючі імпланти – види, історія створення, сучасне застосування.	28
1.3. Шляхи зменшення швидкості деградації.....	35
1.4. Покриття – види, техніки: загальний опис.....	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	44
2.1 Матеріали.....	44
2.2 Дослідження структури та властивостей матеріалів.....	46
2.3 Дослідження біологічних властивостей матеріалу.....	49
2.4 Дослідження взаємодії елементів сполучної тканини з поверхнею імплантів.....	51
2.5 Статистичний аналіз	54
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	55
3.1 Дослідження фізико-хімічних та структурних властивостей імплантів Mg модифікованих ПЕО.....	55
3.2 Дослідження біологічних властивостей імплантів Mg модифікованих ПЕО.....	69
3.3 Дослідження взаємодії елементів сполучної тканини з поверхнею імплантів.....	73
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	82
ВИСНОВКИ.....	91
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	94
ДОДАТКИ.....	118

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ПЕО	–	плазмова електролітична оксидація.
КУО	–	колонієутворювальні одиниці.
SBF	–	simulated body fluid.
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота.
ФЛ	–	фотолюмінісценція.
EDX	–	energy-dispersive X-ray spectroscopy.
SEM	–	scanning electron microscope.

ВСТУП

Актуальність проблеми. Пошкодження кісткової тканини встають все більш поширеними через проблеми старіння населення, дорожньо-транспортні пригоди, спортивні травми, метаболічні захворювання та бойові дії [1–3]. Вірогідність перелому впродовж життя становить приблизно 40 %, а щорічна частота випадків 3,6% [4]. Загоєння пошкоджених кісткових тканин – це процес реконструкції та відновлення її біологічних та біомеханічних функцій [5,6]. Одним з найпоширеніших хірургічних методів лікування є внутрішня та зовнішня фіксація за допомогою штифтів, гвинтів, пластин і т.д., що дозволяє забезпечити механічну стабільність та загоєння [7]. Традиційні фіксуючі матеріали, як правило є стабільними до корозії, такі як нержавіюча сталь (SS), титан (Ti) та його сплави, а також сплави кобальт-хрому (Co-Cr) [8]. Вони мають задовільну біосумісність, високу зносостійкість і гарну механічну міцність [9–11]. Але на ряду з цим у них є і недоліки: великий модуль пружності (190–200 ГПа для 316L SS, 210–240 ГПа для сплавів Co-Cr і 90–110 ГПа для сплавів Ti), невідповідність жорсткості в системі «імплантат-тканина» та необхідність повторних операцій для видалення в разі встановлення тимчасових фіксуючих конструкцій [12,13].

Біодеградуючі матеріали якнайкраще підходять для вирішення даних питань. Такі імплантати можуть забезпечити механічну підтримку після порушення цілісності кісткової тканини на початкових стадіях регенерації. З часом, відновлена структура кістки буде перехоплювати дані функції, біодеградуючий матеріал руйнуватися, а продукти його розпаду поглинатися та метаболізуватися макроорганізмом [14]. Біорозкладні полімерні матеріали, використовуються при фіксації м'яких тканин, відновлення меніска та там де нема потреби у великій міцності імплантату [15].

У порівнянні з полімерами, матеріали на основі магнію мають вищу міцність та модуль пружності, котрий близький до характеристик кортикальної кістки. Іони магнію позитивно впливають на регенерацію кісткових тканин [16]. Mg, як біодеградуючий метал, став потенційним кандидатом для біомедичних імплантатів через унікальні властивості, а саме:

легкої ваги, модуля пружності, межі текучості при стисканні та суміжним властивостям притаманним натуральній кістковій тканині [17–20]. Щільність Mg дорівнює $1,738 \text{ г/см}^3$, що дещо нижче за щільність натуральної кісткової тканини ($1,8\text{-}2,1 \text{ г/см}^3$), але модуль пружності дорівнює 45 ГПа у порівнянні з кістковою тканиною людини $7\text{-}57 \text{ ГПа}$ [21,22]. Це автоматично усуває проблему ефекту стресового зміщення та, за рахунок своїх властивостей біодеградації, знімає питання повторних оперативних втручань [23]. На ряду з цими перевагами магній також є нетоксичним, а його надмірна кількість, в організмі людини, може виводитись за допомогою нирок.

В той же час існує проблема неконтрольованої швидкості корозії, що призводить до порушень механічної цілісності імплантату та утворенню так званих водневих кишень в місці імплантації [24], що сповільнюють процеси загоєння. Дана проблема є основним недоліком магнієвих імплантатів [25], тому край важливо мати змогу контролювати швидкість корозії [26].

На даний момент, основною стратегією впливу на корозійні властивості магнієвих імплантатів є модифікація поверхонь, котрі можна поділити на три основні методи: механічна модифікація (знос тертям та дробеструйною обробка) [27,28], фізична модифікація (лазерне плавлення [29]) та хімічна модифікація (хімічне перетворення поверхні [30], анодне окислення [31], плазмове електролітичне оксидування [32]).

Однією з переваг ПЕО, є можливість використання різних розчинів, що призводять до утворення різноманітних поверхонь, як по структурі, так і по складу, а додавання різноманітних домішок дають можливість корегувати вказані характеристики та надавати необхідні властивості покриттю. Технологія плазмової електролітичної оксидації дозволяє отримати однорідні, товсті, міцні, стійкі до стирання та корозії покриття з гарною адгезією [33–35].

Однак, достовірно невідомий вплив напруги та якісного складу електролітичної ванни на формування модифікованого покриття Mg зразків з подальшою взаємодією з елементами сполучної тканини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету в рамках, а дисертант є виконавцем держбюджетних тем «Біологічна ефективність застосування плазмової електролітичної оксидації та золь-гель депозиції для створення функціональної поверхні імплантатів» (номер державної реєстрації 0119U100823), «Розробка методу діагностики та прогнозування перебігу пухлин з використанням молекул клітинної адгезії раково-ембріонального антигену та циклооксигеназ» (номер державної реєстрації 0122U100111), «Визначення остеокондуктивних та остеоіндуктивних властивостей полімер-нано-гідроксиапатитних біодеградуючих скафолдів» (номер державної реєстрації 0122U000770), а також проекту Горизонт-2020 MSCA-RISE «Nanostructural surface development for dental implant manufacturing» (Номер проекту – 777926).

Мета дослідження – покращення якості медичних магнієвих імплантатів, що модифіковані плазмовою електролітичною оксидацією у силікатних розчинах при різних режимах напруги шляхом визначення взаємодії їх поверхні з елементами сполучної тканини.

Завдання дослідження:

1. Розробити технологію створення нової поверхні біодеградуючих металевих сплавів для використання в якості тимчасових конструкцій в імплантології та провести дослідження фізико-хімічних та структурних характеристик.
2. Дослідити клітинну токсичність, *in vitro* біосумісність та антибактеріальні властивості нових поверхонь біодеградуючих імплантатів модифікованих за різних умов.
3. Вивчити особливості адгезії та проліферації клітин остеобластичного диферону на поверхні модифікованих імплантатів.
4. Визначити швидкість та особливості деградації зразків модифікованих імплантатів *in vitro*.

5. Дослідити процеси взаємодії поверхні модифікованих зразків з елементами сполучної тканини в різні терміни після імплантації.
6. Проаналізувати ефективність проведених модифікацій зразків для створення нових імплантатів.

Об'єкт дослідження: процеси взаємодії біодеградуючих імплантатів з біологічними системами.

Предмет дослідження: біосумісність та антибактеріальні властивості ортопедичних імплантатів з магнієвих сплавів, модифікованих з використанням плазмової електролітичної оксидації.

Методи дослідження:

1. Модифікація поверхні магнієвих зразків шляхом плазмової електролітичної оксидації: полірування зразків, створення електроліту, анодування.
2. Дослідження фізико-хімічних та структурних особливостей та властивостей зразків: сканувальна електронна мікроскопія, рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія, вимірювання пористості, дослідження поперечного перерізу, фотолюмінісценції шорсткості поверхні, профілю зносу, контактного кута поверхні;
3. Визначення швидкості деградацію in-vitro (за допомогою тесту з SBF).
4. Визначення антибактеріальних властивостей зразків: дослідження на основі інгібування бактеріальної адгезії (бактерії *S. aureus*)
5. Дослідження токсичності та біосумісності за допомогою епітеліальних клітин остеосаркоми кістки людини (лінія U2OS).
6. Експеримент на тваринах: аналіз біосумісності in-vivo та дослідження взаємодії елементів сполучної тканини з поверхнею імплантатів.
7. Гістологічний метод: забарвлення тканин гематоксиліном та еозином.
8. Імуногістохімічний метод.
9. Статистичні методи (застосування параметричних та непараметричних статистичних показників).

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі вперше визначено оптимальні фізичні характеристики силікатних розчинів $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{NH}_4\text{F} + \text{NaOH}$, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{NH}_4\text{F} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ та параметрів оксидації для модифікації поверхні Mg імплантатів шляхом ПЕО.

Виявлена кореляційна залежність між складом електролітної ванни та напругою під час процесів ПЕО. А саме вплив якісного складу розчину та сили напруги на кінцевий результат у вигляді модифікованої поверхні, її фізико-хімічних характеристик, структури та кількість дефектів оксидного шару.

Вперше встановлено, що модифікована поверхня магнієвих імплантатів, має антибактеріальні властивості відносно основних збудників інфекції кісткової тканини. Доведено вплив якісного складу електролітичної ванни на ступінь адгезії та проліферації клітин на поверхні.

Вперше досліджено взаємодію елементів сполучної тканини з модифікованою поверхнею магнієвих імплантатів у силікатних розчинах $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{NH}_4\text{F} + \text{NaOH}$ при напрузі 250 В та $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{NH}_4\text{F} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ 300 В та їх токсичний вплив на печінку та нирки.

Експериментально доведено, що зразки модифіковані в силікатному розчині $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{NH}_4\text{F} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ при напрузі 300 В мають всі ознаки біосумісності та не завдають токсичного впливу тканинам печінки та нирок на відміну від модифікованих зразків у силікатних розчинах $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{NH}_4\text{F} + \text{NaOH}$ при напрузі 250 В.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані результати під час дисертаційного дослідження демонструють біосумісність та антибактеріальні властивості ортопедичних імплантатів з магнієвих сплавів, модифікованих з використанням плазмової електролітичної оксидації. Дані дослідження можуть бути призначені для лікування кісткових дефектів, котрі потребують використання тимчасових біодеградуючих металоконструкцій з метою запобігання повторних операцій.

Створено модифіковані магнієві імплантати за допомогою ПЕО, встановлено оптимальний склад електролітичного розчину та напруга окисації. Досліджений вплив якісного складу електроліту та напруги на утворення модифікованої поверхні може бути підґрунтям для подальших модифікацій поверхонь Mg з метою контролю швидкості корозії.

Виявлено вплив особливостей поверхонь імплантатів на процеси адгезії та проліферації клітин. Це може бути основою для створення нових типів імплантатів та модифікації існуючих, за для забезпечення покращення умов імплантації.

Матеріали дисертаційного дослідження впроваджені в навчальний та наукові процеси на кафедрі стоматології післядипломної освіти Запорізького державного медичного університету (м. Запоріжжя), кафедрі патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету (м. Полтава) та кафедрі нормальної та патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету (м. Харків).

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел та патентно-інформаційний пошук згідно теми дисертаційного дослідження, визначив мету та завдання, розробив дизайн експерименту. Автор створив модифіковані імплантати методом плазмової електролітичної окисації, дослідив фізико-хімічні та антибактеріальні властивості. Здобувач провів дослідження біодеградації, опрацював та проаналізував отримані дані. За безпосередньої участі дисертанта було проведено визначення токсичності, біосумісності, гістологічні та імуногістохімічні дослідження. Здобувач написав усі розділи та висновки дисертації. Основна частина досліджень була виконана на базі Центру біомедичних досліджень ННМІ СумДУ. Модифіковані імплантати були отримані у співпраці з кафедрою неорганічної та аналітичної хімії та електрохімії Сілезького технологічного університету (Глівіце, Сілезія, Польща). Гістологічні та імуногістохімічні дослідження були виконані у співпраці з Науковим центром патоморфологічних досліджень кафедри

патологічної анатомії Навчально-наукового медичного інституту СумДУ. Разом з науковим керівником проведені узагальнення проведених досліджень та їх результатів та обговорені підсумки.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати роботи висвітлені на: міжнародних науково-практичних конференціях студентів «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» (Суми, 2019-2021), міжнародній конференції «Surfcoat» (Корея, 2021), міжнародних конференціях «Nanomaterials: Applications and Properties» (2020-2022).

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи опубліковані в 14 наукових працях, серед яких 6 статей, що індексуються наукометричною базою Scopus та 8 тез доповідей у матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 124 сторінках. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, 3 розділів власних досліджень, узагальненню та аналізу отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертаційна робота містить перелік процитованої літератури до якого входить 180 найменувань, 30 рисунків та 3 таблиці.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Імпланти для ортопедії – сучасні дані, статистика використання, ускладнення

Хірургічне лікування кісткових пошкоджень стало звичайною справою. Мільйони потерпілих потребують хірургічного лікування в наслідок отриманих травм кісткової тканини під час занять активними видами спорту чи в результаті дорожньо-транспортних пригод [36],[37],[38].

За даними ВООЗ, станом на 2019 рік, в результаті дорожньо-транспортної пригоди помирають 1,35 млн людей, а десятки мільйонів отримують тілесні ушкодження [39]. Велика кількість травм відбувається в наслідок розвитку промисловості, за рахунок збільшення кількості побутового травматизму та військових дій, серед них і травми кісткової тканини. Від так основною причиною смерті є травматизм, на нього приходиться 9% від загальної смертності. За підрахунками на кожну смерть припадає десятки госпіталізацій, сотні звернень до відділення невідкладної допомоги та тисячі звернень до лікарів. Більша кількість людей з травмами отримують тимчасову чи постійну інвалідність.

Щороку по всьому світу в хірургічній практиці проводиться близько 4 млн. оперативних втручань з використанням імплантів чи трансплантів [40].

Протягом тривалого часу ауто трансплантати рахувались «золотим стандартом» матеріалів котрі використовувались для лікування пошкоджених кісткових тканин в наслідок того, що вони мають все необхідне для стимуляції росту нової кісткової тканини, а саме остеоіндуктивність, остеогенність. Але в той же час ресурси даних імплантів обмежені та можуть мати низку побічних ускладнень [37],[41],[42].

В результаті розвитку медицини та науки в цілому на даний час ми можемо використовувати сплави металів в імплантології. Успішна остеointegraція імплантів в макроорганізмі є одною зі складових ланок під

час вирішення проблем зв'язаних з патологією кісткової тканини. Незважаючи на розвиток медицини існують ускладнення під час використання металевих імплантатів, наприклад: підвищена сенсibiliзація, порушення процесів імплантації, утворення запальних процесів, системна токсичність, генотоксичність та канцерогенність [43].

Іони металу, після імплантації, можуть викликати реакції гіперчутливості на місцевому та системному рівні. Такі реакції, прийнято вважати реакціями IV типу гіперчутливості (гіперчутливість сповільненого типу). В таких випадках іони металів, що виділяються з імплантатів, діють як гаптени, які в подальшому утворюють гаптенно-білкові комплекси та діють, як антигени [44]. Сенсibiliзацію або алергенний ризик, на даний час, оцінюють для всіх металевих імплантатів, використовуючи 3 основних методи: GMPT, LLNA та метод Бюлера. GMPT (глюкозамін-монофосфат тест) використовується для визначення рівня антитіл до глюкозамін-монофосфату в крові людини. Для проведення тесту використовують повний ад'ювант Фрейнда (Complete Freund's Adjuvant (CFA)) - спеціальний комплекс ад'ювантів, які допомагають стимулювати імунну відповідь організму на введення антигену. GMPT найчутливіший з представлених тестів. Local Lymph Node Assay – імунологічний тест, який використовується для оцінки потенційної токсичності хімічних речовин на шкіру, але LTT тести в сьогоденні не використовують, так як вони погано передбачають діапазон місцевих та системних імунних реакцій, включаючи гіперчутливість до металевих імплантатів, котрі розміщені в недермальних місцях, а саме внутрішньосудинні, ортопедичні, гінекологічні та стоматологічні імплантати [45].

Процеси імплантації та місцева токсичність імплантованого матеріалу є одним з найважливіших факторів під час вибору імплантату. На даний час, всі імплантати проходять ретельну доклінічну перевірку шляхом оцінки досліджень імплантації на тваринах та тестів на місцеві ефекти після імплантації. Дослідження імплантації включають тестові пристрої та засоби контролю та певний проміжок часу, під час якого мають змогу оцінити

остаточне інтегрування для оцінки повернення тканини до стабільного стану. Макроскопічний та мікроскопічний метод дають змогу оцінити характер та інтенсивність реакцій місцевої тканини, включаючи такі параметри, як фіброз, некроз та запалення. Однак дослідження імплантації, розроблені спеціально для оцінки біосумісності та зазвичай, не призначені для оцінки реакцій тканин макроорганізму на механічні пошкодження. Біологічні ризики викликані внаслідок механічних несправностей оцінюються за допомогою додаткових досліджень реакцій *in vivo* на компоненти імплантату, що зазнали механічних несправностей [46].

Утворення запальних процесів вважаються нормальною реакцією організму на пошкодження тканин. Запальна реакція лежить в основі більшості реакцій викликаних імплантацією. В свою чергу імплантат може викликати гостру запальну реакцію, яка, як правило, триває від хвилин до декількох днів, залежно від ступеня пошкодження тканини в місці імплантації. Основними клітинами гострого запального процесу, що беруть участь під час загоєння, є мієлоїдні клітини, такі як нейтрофіли та макрофаги. Також імплантат може продовжувати викликати хронічну запальну реакцію, яка буде тривати місяці або довше та характеризуватиметься більш широкою інфільтрацією імунними клітинами мієлоїдного та лімфоїдного характеру. Хронічні запалення викликані металевими імплантатами можуть призвести до несприятливих клінічних наслідків[47]. В даний час місцева реакція тканин на металевий імплантат оцінюється шляхом розміщення імплантату відповідно до стандарту ISO 10993-6. Гістопатологічна оцінка включає характеристику запальної реакції шляхом оцінки інтенсивності реакції, а також визначення типів клітин, що беруть участь у реакції тканини.

Оцінка генотоксичності та канцерогенності (раковий потенціал) є важливими компонентами оцінки безпеки імплантатів. Корозія металевих імплантатів, утворення залишків зносу або проблеми зі структурною цілісністю металевих імплантатів можуть призвести до вивільнення іонів металів, що потенційно може збільшити генотоксичність та канцерогенний

ризик [48]. Метали можуть викликати генотоксичність та канцерогенність за кількома різними механізмами:

1. Індукція окисного стресу, що призводить до пошкодження клітинних компонентів, включаючи ДНК;
2. Втручання у відновлення ДНК;
3. Дерегуляцію проліферації клітин.

Рекомендується оцінювати генотоксичний та канцерогенний потенціал для постійних або довгострокових металевих пристроїв більше 30 діб, які належать до таких категорій пристроїв:

1. Поверхневі пристрої, що контактують із зламанною або пошкодженою поверхнею;
2. Зовнішні комунікаційні пристрої з прямим або непрямим контактом крові або контактом тканини чи кістки;
3. Імплантаційні пристрої з контактом тканини чи кістки або крові [49].

Для тестування генотоксичності рекомендується провести наступні два випробування *in vitro*, а також необов'язковий третій тест *in vivo*:

1. Аналіз мутації бактеріальних генів OECD 471. Цей тест проводиться з інженерними штамами *Salmonella typhimurium* та *Escherichia coli*, призначеними для виявлення всіх можливих змін окремих пар основ, а також мутацій зсуву [50];
2. Аналіз генотоксичності *in vitro*. Рекомендується вибрати один із наступних варіантів:
 - а. Тест генної мутації лімфоми миші OECD 2016с. OECD 2016с є кращим, оскільки він виявляє найширший набір генотоксичних механізмів пов'язаних з канцерогенною активністю, включаючи як генні мутації, так і хромосомні пошкодження[51];

б. Аналіз хромосомної аберації *in vitro* OECD 473, який виявляє лише хромосомні пошкодження [52];

с. Мікроядерний аналіз *in vitro* OECD 487, який виявляє лише хромосомні пошкодження [53].

3. Рекомендується розглянути аналіз цитогенетики *in vivo*, наприклад, для імплантатів, що містять нові матеріали. Однак, якщо кількість матеріалів у випробувальному екстракті після вилучення імплантату нижче порогу виявлення аналізу *in vivo*, випробування проводити не потрібно.

Системна токсичність, а точніше оцінка гострої системної токсичності рекомендовано практично для всіх імплантатів, за винятком тих, котрі контактують з непошкодженою шкірою, незалежно від тривалості контакту, і тих, які контактують зі слизовими оболонками менше 24 годин. Крім того, для імплантатів з постійним чи тривалим контактом з тканинами може бути обов'язкова оцінка потенціалу хронічної токсичності. Пірогенна реакція (гарячка) на імплантати може бути викликана пірогенами, опосередкованими матеріалами, включаючи металеві частинки та солі металів, які описані в ISO 10993-11 [54]. Матеріально-опосередковану пірогенність зазвичай оцінюють за допомогою тесту на піроген кролика [55].

1.2. Біодеградуючі імплантати – види, історія створення, сучасне застосування.

Металеві імплантати є еталоном матеріалів під час використання несучих конструкцій, відповідаючи критеріям чудової механічної міцності та ударної в'язкості. На даний час широко використовуються металеві біоматеріали котрі включають нержавіючу сталь, титан та сплави на основі кобальту-хрому. Вони мають хорошу корозійну стійкість під час використання довгострокової металоконструкції під час імплантації. Але, з часом вони можуть викликати фізичне подразнення, хронічну запальну реакцію чи бути причиною генотоксичності та канцерогенності. Крім того, дані види імплантатів, мають суттєво різні механічні властивості у порівнянні з

біологічними тканинами, котрі вони замінюють. Використання таких матеріалів короткочасно, для підтримки кісток під час регенерації, потребує повторного оперативного втручання для видалення металоконструкції після відновлення функцій макроорганізму. Даний варіант імплантації призводить до збільшення ризиків під час оперативного втручання, завдає додаткових страждань для пацієнта та підвищує вартість медичних витрат. Таким чином розробка біодеградуючих імплантатів, котрі будуть руйнуватися зі швидкістю адаптованою до загоєння тканин, при цьому збільшуючи несучу здатність підтримуємої тканини та зберігаючи певну механічну цілісність до повного загоєння, стала пріоритетним завданням у дослідженні біомедичних матеріалів [56].

На даний час полімери та метали є двома класами матеріалів, котрі широко досліджувалися, як біодеградуючі матеріали для тимчасових застосувань. Їх властивості повільно розчиняються без ускладнень на мікро- та макроскопічних рівнях є одним із фактором вибору [57,58]. Факт зменшення жорсткості та міцності тимчасових імплантатів під час загоєння ранового процесу водночас разом з відновленням постраждалих тканин дає змогу відійти від традиційної повторного оперативного втручання для видалення імплантату [59].

Тимчасові імплантати на основі полімерів є загальнодоступними, і як правило, виготовлені з натуральних полімерів, таких як колаген, альгінат, агароза, хітозан та фібрин, або з синтетичних полімерів, а саме полігліколева, полімолочна кислоти та полі-діоксанон [60,61]. Основною перевагою полімерних імплантатів є те, що їх можливо легко адаптувати для контролю швидкості біодеградації, але механічні властивості цих полімерів різко знижуються у фізіологічних середовищах, що обмежує їх використання як несучих імплантатів [62]. Було встановлено, що металеві біодеградуючі матеріали, у порівнянні з полімерними матеріалами, мають високу ударну міцність, зносостійкість, пластичність і в'язкість. Відтак, ці метали використовуються в ортопедії, загальних та серцево-судинних операціях завдяки їх характеристикам [63].

Під час вибору матеріалу для майбутніх біодеградуючих металевих імплантатів було проведено низку досліджень котрі показали, що реакцію металу з навколишнім середовищем можна виміряти за допомогою зміни вільної енергії Гіббса, чим більше негативних значень, тим більша схильність металу до корозії. Також стало відомо, що метали виражають різний потенціал корозії в різних рідинах організму, але досі не встановлено достатніх та загальноновстановлених значень корозійного потенціалу металів у різних рідинах тіла. Теоретично, будь-який метал зі стандартним електродним потенціалом, меншим за потенціал водню ($E_0 = 0\text{В}$), демонструє потенціал деградації у водному середовищі за стандартних умов. Реакція чистого металу з водою непередбачена та незворотна. Тому було розглянуто численні метали з реакціями відновлення, значення E_0 яких більше негативних, ніж у стандартного водневого електроду. Виходячи з даних та публікацій про потенціал електродів, елементи Mg, Fe, Zn, Ca та Sr демонструють негативний стандартний електродний потенціал. Але Ca і Sr мають більше негативних значень потенціалу а ніж Mg, Fe, Zn і тому вони демонструють надзвичайно швидкі показники деградації [64].

Відтак на даний час, залізо (Fe), цинк (Zn) та магній (Mg), вважаються основними біодеградуючими матеріалами для медичного застосування [65].

Хоча використання в імплантології Fe, Zn та Mg було зафіксовано ще з кінця XIX сторіччя, але вперше затвердженим біодеградуючим матеріалом в 1960-роках став полімер. З того моменту почали стрімко розробляти та використовувати в медичних виробках для фіксацій переломів [66], і тільки в 2014 році професор Юфен Чжен з Пекінського університету дав перший варіант визначення біодеградуючих металів та його класифікацію [67].

Натомість, як біодеградуючий матеріал, Fe був виготовлений та імплантований у низхідну аорту новозеландського білого кролика в 2001 році [68]. Результати імплантації не показали суттєвих доказів появи ускладнень, але повільна швидкість деградації та феромагнітна природа Fe не дозволила отримати цьому матеріалу широке застосування [25]. Fe та імплантати на основі Fe зазвичай деградують дуже повільно (протягом більше 2–3 років),

швидкість деградації значно нижча від клінічних вимог, і, отже, може викликати аналогічні ускладнення (такі як емболізація фрагментів), як це було зазначено з іншими небіорозкладаними імплантатами [69]. Крім того, їх побічні продукти корозії не виводяться з організму із задовільною швидкістю і зберігаються в навколишніх тканинах, а також у біологічних матрицях протягом тривалого часу [70].

Сплави на основі Zn можуть бути перспективними у вирішенні питання біодеградуючих імплантатів за рахунок легкої методики виготовлення, відсутності місцевої чи загальної токсичності, або іншої біосумісності. Але на ряду з позитивними характеристиками, чистий Zn має досить низьку міцність та пластичність, що накладає свій відбиток на використання даного матеріалу в підтримуючих металоконструкціях [65,71]. Відтак в Сучасному світі матеріали на основі Zn в більшій мірі використовуються для різноманітних біомедичних застосувань, таких як пристрої для закриття ран (біодеградуючі скоби, хірургічні затискачі, заглушки, мікрозатиски та заклепки) чи серцево-судинних стентах [12].

На ряду з іншими Mg та його сплави мають чудові біомеханічні та біодеградуючі параметри, котрі роблять їх перспективними кандидатами для медичних цілей [72].

1.2.1 Магній – гомеостаз та його вплив на організм людини.

Магній, важливий іон в організмі людини, є другим найпоширенішим катіоном у клітинах ссавців після калію [73]. Він є незамінним компонентом багатьох фізіологічних процесів, таких як ферментативні реакції, передача клітинних сигналів, робота іонних каналів, клітинний метаболізм та стабільність біомолекул [74]. Збалансований рівень магнію є важливим для клітинного росту, диференціації, енергетичного метаболізму у мозку, серці та скелетних м'язах [75]. Додатковий прийом магнію у вигляді дієтичних добавок показався корисним для відновлення кісткової тканини, лікування ішемічної хвороби серця та зменшення симптомів астми. Mg має важливе значення для метаболізму людини, як кофактор багатьох ферментів, а іони магнію

пришвидшують та полегшують загоєння тканин. В цілому, у здорової дорослої людини вагою близько 70 кг міститься приблизно 24 г магнію, а 99% цього магнію знаходиться у кістках, м'язах і м'яких тканинах організму [76]. Більша частина магнію, що міститься в кістках, знаходиться у формі поверхневих замісників гідроксиапатиту. Для підтримки здоров'я дорослих рекомендується щоденний прийом магнію в кількості 300-400 мг [77,78]. Крім того, Mg не викликає клітинної токсичності в організмі людини і зазвичай виводиться з сечею [79,80]. Тому високі концентрації магнію, викликані деградацією магнієвих імплантатів, є припустимими [77]. Отже підтримка оптимальної концентрації магнію в організмі необхідна для нормального функціонування клітин і запобігання захворюванням [75].

Гідроксиапатит є основним компонентом кістки, і більшість іонів магнію в кістці зв'язані з поверхнею кристалічного гідроксиапатиту. Відсутність магнію в кристалах гідроксиапатиту призводить до збільшення їх розмірів, роблячи кістки крихкими і більш схильними до переломів. Магній також може сприяти формуванню кісток на декількох рівнях. Він є корисним для проліферації та диференціації мезенхімальних стовбурових клітин і сприяє виділенню фактору росту ендотелію судин і фактору, пов'язаного з ангиогенезом, що прискорює процес регенерації кісткової тканини [81]. Дефіцит магнію збільшує кількість остеокластів, а додавання магнію послаблює цей ефект, збільшуючи кількість попередників остеокластів [82,83]. Клітини-попередники остеокластів є джерелом тромбоцитарного фактора росту, який сприяє утворенню судин під час процесу остеогенезу [84,85]. Нервові волокна котрі є важливою складовою окістя, на ранніх стадіях відновлення пошкодженої кісткової тканини є першою тканиною, яка регенерує та бере участь у процесі відновлення [86]. Деградація магнієвих імплантатів у організмі вивільняє іони магнію, які мігрують на поверхню кістки, де їх захоплюють аксони. Іони магнію, що потрапляють в аксони, спонукають їх вивільняти більше пептиду, пов'язаного з геном кальцитоніну, який впливає на стовбурові клітини, сприяючи їх відновленню [87].

Іони магнію відіграють важливу роль у належному функціонуванні серця, особливо на другій і третій стадіях серцевого потенціалу дії. Вони впливають на калієві та кальцієві канали, функціонування яких визначає електричну активацію та скорочення серця. Mg, являючись природним антагоністом кальцію, взаємодіє з кальцієвими білками та транспортерами, конкуруючи з кальцієм за їх зв'язування [88]. Крім того, магній відомий своїм здатністю розширювати судини. Його механізм дії на розширення судин пов'язаний з регуляцією синтезу оксиду азоту, але також може мати механізми, незалежні від нітроген оксиду [89]. Щодо ролі магнію у функціонуванні легень, досліджень у цій області ще недостатньо, тому механізми, за допомогою яких магній впливає на легені, ще не повністю зрозумілі. Проте, як і більшість вазодилітаторів, магній може сприяти розширенню бронхів шляхом пригнічення вивільнення ацетилхоліну та гістаміну [90]. Деякі дослідження також показали зв'язок між низьким рівнем магнію і захворюваннями легень, такими як астма [91]. Низький рівень магнію пов'язаний зі збільшення запалення, і додатковий прийом магнію може зменшити запальну реакцію у хворих на ХОЗЛ та інші захворювання легень, маючи протизапальний ефект [92,93].

1.2.2 Магнієві імпланти – історія, застосування, побічні ефекти

Mg вперше був відкритий сером Хамфрі Деві в 1808 році, а в 1833 році Майкл Фарадей синтезував його за допомогою електролізу. Уже в 1878 році Mg був використаний Гусом, як медичний матеріал, під час операцій по зупинці артеріальної кровотечі та оперативного втручання при варикоцеле [94]. Хоча результат використання був успішним, проте подальше дослідження та використання було призупинене аж до 1900 року, коли Ервін Пайр повідомив про інші можливі методи використання. Він розпочав використовувати Mg, як з'єднувач судин, а в подальшому, в 1905 році, як гемостатик.

Першим практичним застосуванням Mg слід вважати використання магнію зі стальними гвинтами, під час лікування Ламботом в 1906 році

перелому гомілки у 17-ти річного підлітка. Проте, після оперативного втручання він виявив значне підшкірне газоутворення. На 8 день після оперативного втручання, Ламбот, видалив фрагменти Mg. В подальшому він провів низку експериментів по дослідженню Mg без сталі та отримав позитивні результати, в наслідок чого розпочав рекомендувати Mg-імпланти під час лікування переломів Беннета, переломах тазової кістки, ключиці, зап'ястя, фаланги і п'ясткової кістки, радіальних епіфізарних переломах нижніх кінцівок, переломах плечової головки, переломах щиколотки, косих переломах великогомілкової кістки [95].

З 1914 року Пайр запропонував використовувати Mg трубки для зшивання нервових волокон та досяг значних успіхів після 7-ми оперативних втручань [65].

В 1924 році Сіліг зрозумів, що Mg який, на той час, був доступним являвся досить крихким. Через це він розпочав дослідження з синтезу Mg шляхом перегонки у вакуумі для отримання більш пластичних зразків. Також він вирішив легувати Mg з благородними металами, а саме золотом і сріблом, для покращення механічних властивостей. Але після декількох експериментів він зрозумів, що нові зразки мають низьку міцність на розрив [96].

З цього періоду розпочалися дослідження Mg заради покращення фізико-механічних властивостей. Значних успіхів в цьому досягли Троїцький та Цитрін, котрі в 1944 році використовували сплав Mg з не великою кількістю Cd для лікування 34-х пацієнтів з переломами кісток. Тільки 9 оперативних втручань були негативними із-за приєднання інфекцій. В інших випадках спостерігалось повне загоєння кісток без запальних реакцій навколо імплантату. Швидкість корозії імплантатів була прийнятною, в більшості випадків, та становила 10-12 місяців, але були і випадки коли імпланти деградували за 3-5 тижнів через підвищення рівня кислотності в зоні перелому [97].

У 1972 р. Бородкін та ін. використовується сплав Mg з рідкоземельними елементами. Сплав складався з 0,4–4% рідкоземельного металу, 0,05–1,2% Cd, 0,05–1,0% Ca або Al та Mn, Ag, Zr або Si. Вони продемонстрували повільну

деградацію складного сплаву протягом 5–10 місяців *in vivo*, але не повідомили про розподіл мікроелементів та будь-які ускладнення [98].

Віднедавня Mg та його сплави були представлені у вигляді нового класу біодеградуєчих металевих матеріалів та почали привертати увагу, як потенційної матриці для ортопедичних застосувань [99]. А характеристики даного матеріалу дозволяють його використання в тимчасових імплантатах, таких як кісткові пластини, гвинти чи стенти [56].

Однак через складну природу матеріалів на основі Mg є і недоліки:

1. Високий потенціал негативного електроду – 2,38 В [100];
2. Вплив легуючих елементів на деградацію, механічну міцність та біосумісність мають вирішальне значення [101];
3. Виділення H_2 при деградації впливає на рН навколишнього середовища [102];
4. Було помічено, що швидкість корозії матеріалів на основі Mg, виміряних у середовищі *in vitro*, вища, ніж у середовищі *in vivo* [103];
5. Результати легування на другій фазі, такі як Fe, Ni, Cr та Co призводять до гальванічної корозії матеріалів на основі Mg [103];
6. Легуючі елементи, такі як рідкісноземельні елементи низької щільності та високої міцності призводять до різної корозійної поведінки [104].

Основні механізми, що впливають на корозію сплавів Mg - це гальванічна корозія, корозія з точковим нальотом, корозійне розтріскування та втомна корозія. Одночасні дії цих механізмів корозії у матеріалах імплантатів на основі Mg ускладнили ситуацію та викликали багато проблем [105].

1.3. Шляхи зменшення швидкості деградації

1.3.1 Розробка сплавів магнію

Враховуючи це, сучасні дослідження направлені на подолання недоліків використання магнієвих імплантатів, а саме нестабільну корозійну активність. Тому розробка нових композитних матеріалів надзвичайно важлива для

створення імплантатів, що мають оптимальну міцність та стійкість до корозії у фізіологічному середовищі. Нові композитні матеріали можуть забезпечити вирішення проблем корозії, використовуючи сплави на основі Mg як матрицю [106]. Для вирішення даних проблем був розроблений новий клас матеріалів, відомий як біокомпозит на основі магнію. Основою ціллю при виготовленні даних біокомпозитів було створення матеріалу з оптимальними механічними властивостями, корозійною стійкістю, мінімальною цитотоксичністю та високою біосумісністю. З цією метою було використано декілька методів виготовлення, таких як disintegrated melt deposition (DMD), лиття з перемішуванням, гравітаційне лиття, плавлення, порошкова та напівпорошкова металургія. Також використовувались легування Mg до якого додавали такі метали як Ca, Zn, Mn, Sr, Ti та Zr. Ca – біосумісний елемент з масовою часткою 1,34% в Mg, покращує механічну міцність, опір повзучості (деформації) та корозійну стійкість завдяки мікроструктурному очищенню Mg [107]. Zn та Mn – також присутні у кістковій та м'язовій тканинах, при легуванні з Mg вони зменшують виділення H_2 під час біокорозії. Mn з масовою часткою 2,2% у сплаві дещо покращує межу текучості, але значно підвищує корозійну стійкість шляхом перетворення домішок, таких як Fe у нешкідливі інтерметаліди [24]. Розчинність Sr обмежена 0,11 % масової частки, що покращує мікроструктурне очищення та корозійну стійкість [108]. Al, Ca, Zn, Ni, Ce, Ag, Cu і Ti одночасно покращують механічні властивості та пластичність. Домішки, такі як Fe, Ni, Co і Cu, повинні знаходитися в межах допустимих меж, в іншому випадку вони спричиняють негативні наслідки. Ці елементи негативно впливають на механічні властивості, утворюючи інтерметалічні фази. Технологія порошкової металургії з подальшою екструзією при $400^\circ C$ була використана для синтезу композитів Mg-xHA (x = 5%, 10%, 15% масовою часткою). Мікроструктурна оцінка методом SEM показала, що з додаванням армування HA зерна матриці були більш рівновісними і мали менші розміри. Армування призвело до підвищення твердості. Максимальні твердості по Віккерсу 610 ± 10 та 623 ± 9 HV були отримані відповідно в поздовжньому та поперечному напрямках з включенням

15% масової частки арматури НА. Порівняно з чистим Mg межа міцності при стисненні для 5% масової частки НА не змінилася, а гранична міцність на розрив зросла на 9%. Крім того, деформація зросла на 70% порівняно з матрицею Mg [109].

Мікрокомпозити на основі магнію Mg- x Al₂O₃ ($x = 5,5\%$ масової частки та 10,7% масової частки) Були синтезовані порошковою металургією в поєднанні з мікрохвильовим спіканням з подальшим екструдюванням при 350 °C. З додаванням 5,5% масової частки та 10,7% масової частки Al₂O₃ до матриці Mg, були отримані більш високі мікротвердості відповідно ~ 50 HV та ~ 53 HV, порівняно з ~ 47 HV у чистому зразку Mg. Додавання 5,5% масової частки та 10,7% масової частки Al₂O₃ до матриці Mg призвело до максимальних значень виходу при розтягуванні та граничних показників міцності ~ 159 МПа та ~ 214 МПа відповідно, порівняно з ~ 117 МПа та ~ 168 МПа для чистого Mg. Збільшення вмісту Al₂O₃ в матриці Mg призвело до поліпшення мікротвердості, межі міцності на розрив та граничної міцності на розрив за рахунок пластичності. Було виявлено, що мінімальна пластичність становить ~ 2,8% з включенням 10,7% масової частки Al₂O₃ до матриці Mg [110]. Мікрокомпозити Mg- x Ti ($x = 5,6, 9,6\%$ масової частки) виготовляли з використанням осадження розпаденого розплаву в поєднанні з гарячим пресуванням. Додавання 5,6 % масової частки Ti до матриці Mg призвело до максимальної межі міцності на розрив ~ 163 МПа та максимальної пластичності ~ 11% порівняно з ~ 100 МПа та ~ 8% відповідно для чистого Mg але подальше збільшення вмісту Ti призвів до дещо нижчих значень. При 9,6% масової частки Ti гранична межа міцності на розрив значно зросла до ~ 239 МПа, але була нижчою, ніж ~ 258 МПа для чистого Mg. З додаванням 5,6 мас.% Ti пластичність композиту Mg-5,6Ti зросла на ~ 3%, а подальше додавання дещо зменшило пластичність [111].

Подальші дослідження композитів на основі Mg разом з Al, Ca, Zn, Ni, Se, Ag, Cu і Ti продовжуються і сьогодні, так як дані композити мають потенціал подолати швидку та неконтрольовану деградацію при збереженні механічної міцності. Численні дослідження показали, що металеві та керамічні

армування (наприклад: Ti, Zr, Ca, Sc, Y, Gd, Dy, Nd, Ce Si, Mn, Zn, HA, FA, TiO₂, MgO, ZnO, ZrO₂, TiB₂ і Al₂O₃) можуть сильно вплинути на механічні властивості та корозійну стійкість біокомпозитів на основі Mg. Серед сучасних технологій виготовлення металургія порошку та осадження розпаденого розплаву є перспективними підходами до розробки біокомпозитів на основі магнію. Обробка та термічна обробка та методи пластичної деформації також мають значний вплив на механічні властивості. Відповідний процес та оптимальні параметри обробки можуть значно покращити механічну поведінку матеріалів на основі Mg. Рідкоземельні елементи можна використовувати для поліпшення механічних властивостей та опірності повзучості. Інші підкріплення мікронного розміру, такі як TiB₂, MgO, TiO₂, FA та Zn, потенційно можуть бути використані для поліпшення механічних властивостей. Стійкість до гальванічної корозії матеріалів на основі Mg може бути підвищена шляхом легування елементів, які мають потенціал електрода, подібного до потенціалу Mg, таких як Y, Nd і Ce, та елементів з відносно високою розчинністю в Mg, таких як Sc, Gd, Dy, Ca і Zn мають потенціал для підвищення корозійної стійкості композиційних матеріалів на основі Mg [112].

1.4. Покриття – види, техніки: загальний опис

Легування та обробка деформацією значно покращує корозійну стійкість магнію, але даний вид модифікації може не відповідати вимогам практичного застосування матеріалів, що розкладаються біологічним шляхом [113]. Тому одним зі шляхів подолання проблеми неконтрольованої деградації є формування бар'єрного покриття на поверхні. На даний момент використовується безліч видів покриттів, серед них: електрохімічне гальванічне або безелектронне, конверсійне, покриття за рахунок анодування [114,115].

Хімічна конверсійна обробка є ефективним, порівняно недорогим і легкопроводжуваним методом, який на даний час поширений у промислових методах. У процесах конверсійного покриття, матеріали, що обробляються, занурюють у розчин, котрий реагує з поверхнею, що змінює концентрацію

іонів металу та рН на межі поділу метал-розчин. Для Mg номінальне значення рН від нейтрального до кислого, при якому Mg розчиняється та не може пасивувати. Локальна зміна складу викликає випадання осаду з розчину на поверхню субстрату, утворюючи покриття в результаті чого, покриття скріплюється з металевою поверхнею. На якість конверсійних покриттів на сплавах Mg впливає багато факторів, включаючи склад субстрату зі сплаву Mg, попередню хімічну обробку, склад конвертованих електролітів, подальшу обробку та робочі параметри, такі як температура, рН, час занурення та ін. Однією з найбільших проблем використання даного методу являється проблема виробництва бездефектних покриттів з рівномірним покриттям [116].

Гальванічне покриття – це осадження металевого покриття на об'єкт шляхом нанесення на нього негативного заряду зануренням у розчин, що містить сіль металу. Сіль металу містить позитивно заряджені іони металу, які притягуються до негативно зарядженого об'єкту і «відновлюються» до металевої форми на поверхні об'єкту. Іншими словами, гальванічне покриття – це процес покриття металевого предмету тонким шаром іншого металу за допомогою електролізу.

Безелектронне покриття або хімічний метод осадження, хімічна реакція між іонами металів та відновними агентами на активній поверхні. Для безелектронного покриття поверхню матеріалу поміщають у розчин, після чого здійснюється хімічна реакція, яка призводить до відкладення металу на поверхні матеріалу. Цей процес відбувається шляхом реакції між іонами металу в розчині та поверхнею матеріалу при цьому електрони можуть утворювати рівномірний товстий шар або тонку плівку на поверхнях. В результаті безелектронного покриття можна отримати різноманітні характеристики покриття, такі як товщина, мікроструктура, мікротвердість тощо. [117].

У випадках використання гальванічних та безелектронних покриттів основною недоліком є низька зносостійкість та довговічність покриття, за рахунок утворення нерівномірного та обмеженого по товщині шару.

Методика анодування матеріалу – це процес електролітичної пасивації, який використовується для збільшення товщини шару природного оксиду на поверхні металевих деталей. Підвищення напруги у розчині супроводжується рядом електродних приводів до пропорційного зростання струму, згідно законам Ома. Зокрема, у системі відбувається виділення газу у вигляді кисню та/або окису металу. Однак за межами певної критичної напруги – анодна поверхня [118]. Анодування передбачає електролітичний процес, в якому поверхня металу стає анодом у розчині солей, а сам процес відбувається при кімнатній температурі та зазвичай проводиться в рідких електролітах при цьому саме окиснення металу відбувається на поверхні.

1.4.1. Плазмова електролітична оксидація – короткий опис, застосування

Плазмова електролітична оксидація (ПЕО), також відоме як електролітичне плазмове окислення (ЕПО) або окислення мікродугами (МАО) подібна до процесу анодування, але використовує більш високі потенціали в результаті яких утворюється плазма, що змінює структуру оксидного шару. Під час даної обробки поверхні анодною плазмою, утворюється покриття з оксиду кераміки основною задачею якого є покращення властивостей корозійної стійкості [114]. У цьому процесі метал використовується як катод, а сам процес зазвичай відбувається за підвищених температур і може бути виконаний в газовій або рідкій фазі.

ПЕО – це електрохімічна обробка поверхні, яка працює вище так званої діелектричної напруги пробую, що призводить до численних короткоживучих плазмових мікророзрядів на поверхні металу. Це явище проявляється у вигляді спалахів під час початкової стадії, які в свою чергу переходять у мікродуги, а з часом у дуги [119]. В результаті складної комбінації електрохімічних, плазмохімічних та реакцій окислення утворюється добре зчеплене і товсте оксидне покриття. Яке, як правило, демонструє тришарову структуру, що містить верхню пористу область, проміжний компактний шар і тонкий бар'єрний шар [120].

Змінюючи режими струму між змінним і постійним, однополярним і біполярним, процес ПЕО може модифікувати поверхню в значній мірі. Основні параметри, такі як щільність електричного струму, інтенсивність електричної напруги, імпульсні коливання та робочий цикл, впливають на процедуру ПЕО та властивості покриття. Ці параметри також визначають розвинутий пробій напруги, локальне плавлення та окислення підкладки, процеси гартування та рекристалізації, що суттєво впливає на мікроструктуру та властивості покриття. У процесі ПЕО використовуються напруги від 95 до 750 В разом із електричним живленням змінного або постійного струму між катодом і анодом. Після замикання електричного кола, металева підкладка виступає як робочий електрод (анод), а протиелектрод (катод) зазвичай виготовлений з нержавіючої сталі або графіту. Обидва електроди занурені в слабкий лужний електроліт і після підключення до зовнішнього джерела електроенергії починається процес нанесення покриття.

Під час проведення процесу ПЕО на аноді відбувається електрохімічне виділення кисню та реакції окислення металу. За допомогою сильного електричного поля формується кисень, а аніони кисню мігрують до анода, де утворюють оксид металу на підкладці. Результат може бути розчиненням поверхні або утворенням плівки анодного оксиду, залежно від складу електроліту та хімічної активності підкладки. Під час процесу також відбувається виділення водню та відновлення катіонів на поверхні катода [121].

Технологія ПЕО для сплавів Mg має багато переваг: широкий спектр властивостей покриття, включаючи хорошу зносостійкість, корозійну стійкість, відсутність погіршення механічних властивостей матеріалу підкладки через незначне надходження тепла, між покриттям і основою вимірюється висока міцність металургійного зчеплення, існує можливість обробки деталей зі складною геометричною формою або великими розмірами, обладнання просте і зручне в експлуатації, вартість його низька, оскільки вона не потребує вакуумних чи газозахисних умов, техніка є екологічно чистою,

оскільки використовуються лужні електроліти, що відповідає вимогам екологічно чистої технології модифікації поверхні [122].

Крім того, ПЕО-покриття товщі, щільніші та міцніші за інші модифікаційні поверхні, що в свою чергу покращує корозійний опір, електричний опір та утворює міцну зв'язку з підкладкою [123,124].

Дослідження показують, що склад електроліту та електричних параметрів є одним з основних параметрів, котрі впливають на ПЕО-покриття [125,126].

1.4.2 Розчини електролітів для ПЕО – опис та проблеми.

Склад, природа (сильний або слабкий) та концентрація електролітів є важливими факторами, що визначають утворення покриття в процесі ПЕО. Зазвичай у процесі ПЕО використовують лужні та слабкі електроліти. Електроліти забезпечують рух електричних зарядів, які утворюють ланцюг та регулюють електричну провідність. Старіння електролітів є важливим фактором у процесі ПЕО. Значення рН електролітів також впливає на мікроструктуру та властивості утвореного покриття [127].

Зазвичай ПЕО проводиться з використанням фосфатних, силікатних та фосфатно-силікатних електролітів, які утворюють покриття з підвищеною корозійною стійкістю та біологічною активністю на поверхні [128,129]. Найбільша товщина покриттів виявляється у фосфатних електролітах, на другому місці - у силікатних, а на третьому - у змішаних електролітних системах.

Фосфатні електроліти містять в своєму складі фосфатні іони такі як H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} або PO_4^{3-} і зазвичай мають рН від 3 до 6. Вони мають свої переваги, а саме за їх допомогою утворюється товще покриття котре має кращу корозійну стійкість, . Але разом з тим, утворення нерівномірних пор та висока шорсткість поверхні є одним з основних недоліків покриттів при плазмової електролітичної оксидації в фосфатних розчинах. Використання силікатних розчинів навпаки допомагає утворити покриття з великою кількістю рівномірно розподілених пор та відносно щільною і гладкою

поверхнею [130]. Також до переваг використання силікатних розчинів можна віднести рівномірність покриття з прийнятною товщиною без накопичення залишкової напруги, що допомагає запобігти розтріскуванню шару покриття [125].

Однак, варто зазначити, що ПЕО-покриття, отримане в електролітах з однаковими хімічним складом, але різною концентрацією, може мати відмінні характеристики.

Додавання різних добавок є важливим елементом для поліпшення властивостей ПЕО-покриттів. На основі проведених досліджень було встановлено, що оксиди або графіт, додані до електроліту у вигляді добавок, здатні поліпшити фізико-механічні властивості ПЕО покриттів. Крім того, додавання таких добавок до основи призводить до створення меншої кількості дефектів та тріщин у покритті. З іншого боку, було встановлено, що всі зразки, в яких додавалися вказані добавки, мають більш гладку поверхню покриття, що може негативно вплинути на клітинну адгезію [131].

Таким чином, сплави магнію є потенційними кандидатами для створення тимчасових ортопедичних конструкцій, проте забезпечення контролю деградації є основною проблемою їх широкого застосування. Серед усіх видів контролю корозії магнію, формування захисної поверхні є найбільш перспективним через можливість контролю хімічного складу, відсутність токсичних домішок і відтворюваність технології. Плазмова електролітична оксидація є найбільш поширеним методом створення покриттів на поверхні металевих конструкцій, проте питання оптимізації хімічного складу електроліту і біологічна відповідь на нові покриття залишаються відкритими.

Основні результати цього розділу опубліковані в працях [132–134].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2. Модифікація імплантатів, з використанням плазмової електролітичної оксидації в кальцій-фосфатних розчинах.

2.1 Матеріали

Модифіковані імплантати були одержані у співпраці з кафедрою неорганічної та аналітичної хімії та електрохімії Сілезького технологічного університету (Глівіце, Сілезія, Польща). Для модифікації поверхні був використаний чистий Mg (99,99%) придбаний у Polmag (Кендзежин-Козле, Польща) та Na_2SiO_3 , NH_4F , NaOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ придбані у Sigma–Aldrich (Сент-Луїс, Місурі, США). Зразки магнію розміром 10 мм × 10 мм × 10 мм були відполіровані за допомогою шліфувального паперу (Hermes BW114) з зернистістю 400, 1000, 1200 і 1500 та очищені за допомогою ультразвуку та промиті дистильованою водою. Хімічний склад електроліту представлений в таблиці 2.1.

Електроліт	Концентрація компонентів електроліту; г/дм ³				Анодуюча напруга, В
	Na_2SiO_3	NH_4F	NaOH	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	
C1	10	5	10	-	200
C1	10	5	10	-	250
C2	10	5	-	10	250
C2	10	5	-	10	300

Табл. 2.1 – Хімічний склад ванн для анодування та параметри анодування ПЕО процес.

Плазмову електрооксидацію проводили у 200 мл розчину електроліту з температурою 15 °С (рис. 2.1).

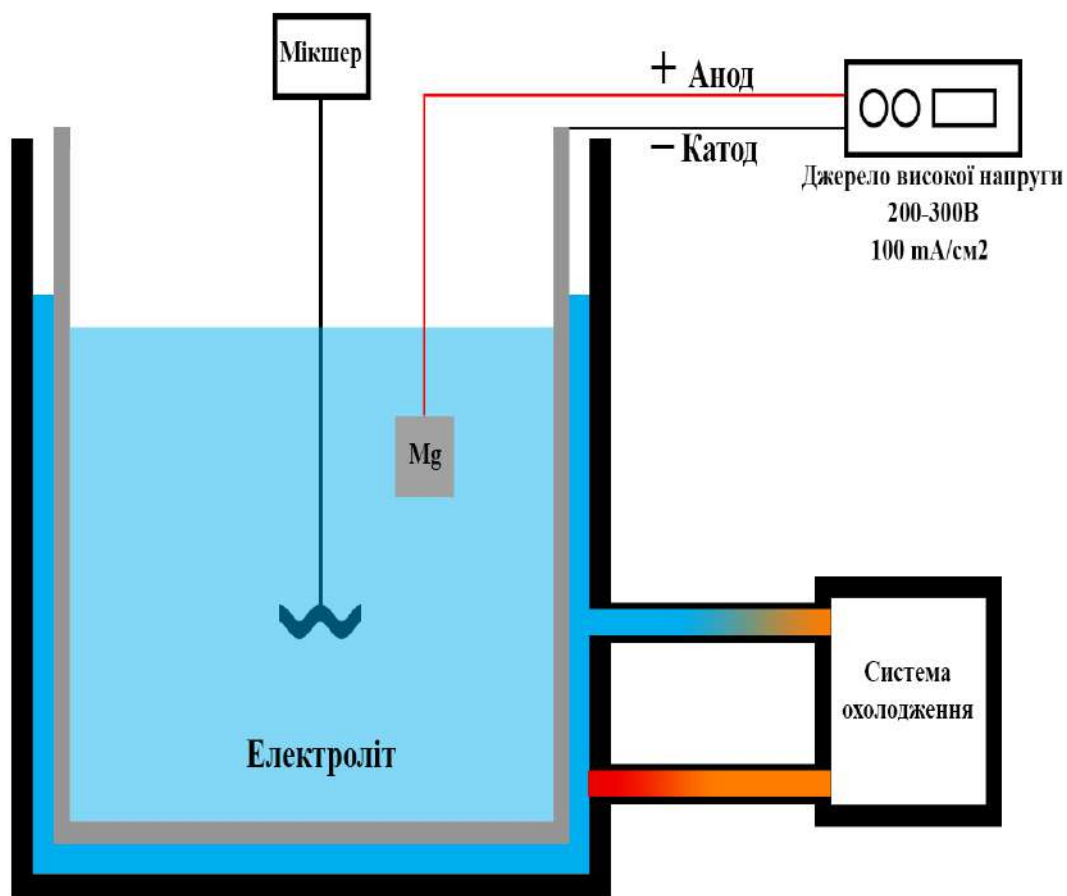


Рис. 2.1 – Схема плазмової електролітичної оксидації

За допомогою джерела високої напруги (PWR 800H, Кікусуї, Японія) при імпульсному тоці протягом 10 хв кінцева напруга доводилась до 200 В, 250 В та 300 В (рис. 2.2). Площа модифікованої поверхні складала 6 см². Після ПЕО зразки були промиті дистильованою та деіонізованою водою протягом 5 хвилин.

Після цього зразки сушилися в термостаті (J. P. Selecta Incubat, Medlab-Products SP. Z O.O, Raszyn, Poland) протягом 24-ох годин при температурі 50 °С. Модифіковані зразки зберігалися в шафі-ексикаторі з підсушуючим гелем (EKS B 11, WSL Sp. z o.o., Poland) при температурі 23 °С та відносній вологості повітря 40 %.

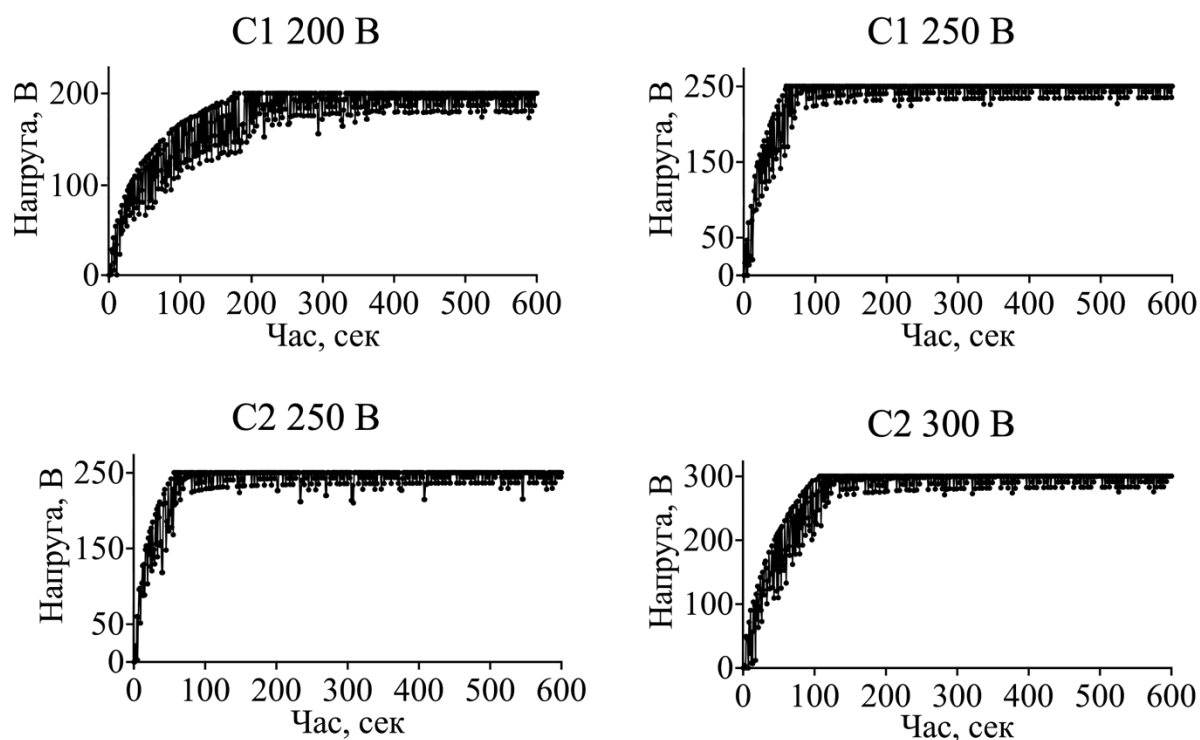


Рис. 2.2 – Графіки підвищення напруги до вказаних пікових значень

2.2 Дослідження структури та властивостей матеріалів

2.2.1 Сканувальна електронна мікроскопія

Визначення особливостей рельєфу поверхні та пористості поверхні зразка проводили за допомогою сканувального мікроскопу (SEO-SEM Inspect S50-B (FEI, Брно, Чехія)) при збільшенні від 300 до 20 000 раз. Перед дослідженням зразки піддослідної групи піддались напиленню тонким провідним шаром, щоб зняти заряд та екранувати падаючий пучок, тим самим уникнути ефект «зарядки» зразку. Розподіл пористості поверхні та розмір пор проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Trial Version Image-Pro 10.0.7. З кожної групи зразків, було відібрано по три зображення. На завантажених зображеннях, ми визначили площу зображення та площу поверхні з рельєфними змінами. Наступним етапом, ми підраховували загальну кількість пор, кратерів та мікротріщин, розподілили на групи за площею та визначили їх кількість в кожній групі.

2.2.2 Рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія

Для оцінки елементного складу поверхні зразків використовували енергодисперсійний рентгенівський спектрометр (AZtecOne з детектором X-Max N20 (Oxford Instruments Абінгдон, Великобританія). За рахунок збудження атомів піддослідного зразка, котрі в подальшому випромінювали характерне для кожного хімічного елементу рентгенівське випромінення, ми дослідили енергетичний спектр за площею, а за допомогою EDX-картування ми змогли охарактеризувати якісний та кількісний склад зразка в атомарних долях.

2.2.3 Дослідження поперечного перерізу

Структуру та товщину ПЕО покриття визначали за допомогою дослідження поперечного перерізу. Модифіковані зразки заливали в епоксидну смолу (Eposir F 740 + Iрох EN 2260) та розміщували в вакуумній установці на 3 хвилини. Після цього зразки висушували при кімнатній температурі протягом 24 годин та шліфували шліфувальною машиною (Einhell TH-US 400, 1440 об/хв) з використанням абразивного паперу (Hermes BW114) з зернистістю 400, 1000, 1200 і 1500. Морфологію та хімічний склад структур оксидного шару досліджували за допомогою сканувальної електронної мікроскопії (SEO-SEM Inspect S50-B, FEI, Брно, Чехія) у парі з енергодисперсійним рентгенівським спектрометром (AZtecOne з X-MaxN20 (Oxford Instruments plc, Абінгдон, Великобританія)). Проводили оцінку структури покриття, зв'язку з основним субстратом та розподіл елементів по площі покриття.

2.2.4 Дослідження шорсткості поверхні та профілю зносу

Дослідження були проведені за допомогою приладу для визначення шорсткості поверхні методом тактильного стилуса (Surftest SJ-301, Mitutoyo, Kawasaki, Kanagawa, Japan) на довжині 10 мм. Під час досліджень були виміряні наступні параметри: середнє арифметичне суми значень профілю шорсткості (R_a) та середньої висоти вершин та впадин (R_z).

2.2.5 Дослідження гідрофобності та гідрофільності поверхні

Дані дослідження були проведені за допомогою відеовимірювача оптичного контактного кута (OCA 15 EC, Series GM-10-473 V5.0, Data Physics, Фільдерштадт, Німеччина). На досліджуваній поверхні були використані цифрові обробки зображень краплі деіонізованої води об'ємом 0,5 мкл. Середні значення контактного кута визначали шляхом вимірювання 5 різних точок.

2.2.6 Дослідження фотолюмінісценції Mg зразків

Для досліджень фотолюмінісценції магнію був використований метод спектроскопії. Зразки магнію піддавались світловому випромінюванню при різних довжинах хвиль, з контролем температури та ступіню вакууму, а потім досліджувались спектри світла, що випромінювались матеріалом. Спектри фотолюмінісценції (ФЛ) модифікованих, за допомогою ПЕО, зразків вимірювали в діапазоні 300–900 нм волоконним спектрометром Ocean Optics (HR4000, Ларго, Флорида, США). ФЛ збуджували Nd:YAG-лазером (266 нм, 20 мВт, CNPlaser, Чанчунь, Китай).

2.2.7 Тест на деградацію з SBF (in-vitro)

Визначення швидкості деградації in vitro проводили за допомогою розчину SBF, який готували шляхом розчинення NaHCO_3 , KCl , $\text{K}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 та Na_2SO_4 у дистильованій воді, рН якої доводили до 7,40 за допомогою трис (гідроксиметил) амінометану та 1М CHCl при 37 °С. При цьому розчин мав наступний іонний склад: 142,0 ммоль/л Na^+ , 5,0 ммоль/л K^+ , 1,5 ммоль/л Mg^{2+} , 2,5 ммоль/л Ca^{2+} , 147,8 ммоль/л Cl^- , 4,2 ммоль/л HCO_3^- , 1,0 ммоль/л HPO_4^{2-} , 0,5 ммоль/л SO_4^{2-} .

Зразки, перед дослідженням, зважувалися за допомогою лабораторних електронних вагів AS 220.R2. та занурювалися в 50 мл розчину SBF (рН $7,4 \pm 0,02$) на 3, 7, 14, 21 та 63 дні при температурі 37 °С. Кожні 2 дні проводилась заміна розчину. Після закінчення кожного періоду зразки промивали дистильованою водою, висушувалися до постійної ваги та проводився

контрольний замір ваги. Швидкість деградації зразків проводили розрахунком втрати ваги за формулою:

$$\omega(\%) = \left(m_0 - \frac{m_1}{m_0}\right) \times 100$$

m_0 – вага до занурення;

m_1 – вага після занурення.

2.3 Дослідження біологічних властивостей матеріалу

2.3.1 Аналіз антимікробної активності *in vitro*

Антибактеріальну активність зразків оцінювали на основі інгібування бактеріальної адгезії. В якості цільових бактерій використовували надані бактерії (*S. aureus*) Національної колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології та вірусології НАНУ, Київ, Україна). Штам бактерій вирощували в пробірці, що містить триптичний соєвий бульйон (TSB) при 37 °C протягом ночі. Стерильне середовище засівали штамом бактерії до концентрації 10⁸ денситометром DEN-1B (Biosan SIA, Рига, Латвія) і доводили до кінцевої щільності 1×10⁶ колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл. Після отримання 2 мл суспензії бактерій поміщали на зразки (зразки, оброблені ПЕО, і зразки без покриття) та інкубували в статичних умовах при 37 °C протягом 2, 4, 6 та 24 год. Контролем служили лише культуральний бульйон та суспензія бактерій у початковій концентрації за відсутності зразків. У кожен момент часу зразки видаляли та обережно тричі промивали 2,0 мл стерильним фосфатно-буферним сольовим розчином (PBS; pH = 7,4) для видалення неприкріплених бактеріальних клітин та розміщували в стерильних пластикових пробірках з 1,0 мл стерильного PBS. Після цього проводили ультразвукову обробку зразків в ультразвуковій ванні (B3500S-MT, Branson Ultrasonics Co., Шанхай, Китай) протягом 1 хвилини для видалення прилиплих бактерій. Всього 10 мкл аліквоти з кожної пробірки переносили на агарові чашки з агаром Мюллера-Хінтона і розповсюджували за допомогою техніки смужкових пластин. Після

нічної інкубації при 37 °С проводили підрахунок тих, хто вижив. Усі експерименти проводили в асептичних умовах у трьох примірниках.

2.3.2 Визначення токсичності та біосумісності з використанням культур клітин

Для оцінки токсичності та біосумісності були використані U2OS клітин. Епітеліальні клітини остеосаркоми кістки людини (лінія U2OS) вирощували в стандартних умовах: зволожений 5% CO₂, при температура повітря 37 °С, середовище оновлювали кожні 2–3 дні в колбах для культури тканин. При цьому була використана модифікована поживна суміш Дульбекко Eagle F-12 (DMEM/F-12) з L-глутаміном, що містить 100 одиниць/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл, амфотерицину, 10% бичачої сироватка та 1,0 нг/мл bFGF. Модифіковані зразки Mg стерилізували в 70% етанолі протягом ночі та розміщували в 24-лунковий культуральний планшет. Зразки занурювали в DMEM на ніч для вирівнювання рН, клітини висівали на кожен зразок і в лунки без зразків (як позитивний контроль) при щільності клітин 2×10^4 клітин на лунку. Після цього був використаний колориметричний аналіз Alamar blue, в якому резаурин є синім барвником який відновлюється до рожевого забарвлення резорурфіну лише життєздатними мітохондріями, що є показником життєздатності клітин. Колориметричний аналіз Alamar Blue проводився через 1, 3 і 5 днів після посіву клітин. Як негативний контроль до середовища без клітин додавали розчин Alamar Blue. В якості позитивного контролю розчин Alamar Blue додавали до середовища у лунки, які містили клітини без зразків. Планшети інкубували протягом 4 годин при 37°C у темряві. Поглинання вимірювали за допомогою планшетного зчитувача Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) на довжинах хвиль 570 і 595 нм. Всі експерименти повторювали 3 рази. Відсоток зменшення Alamar Blue був виконаний у вигляді рівняння згідно з протоколом виробника.

2.4 Дослідження взаємодії елементів сполучної тканини з поверхнею імплантатів

Визначення особливостей взаємодії елементів сполучної тканини з поверхнею імплантатів проводили на 60-ох 6-місячних білих лабораторних щурах-самцях з середньою вагою 250–350 грам.

Під час проведення досліджень усі тварини перебували в однакових умовах, за сталої температури 22 °С з урахуванням світлового циклу без обмежень в їжі та воді. Утримування тварин та експерименти проводилися згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), «Етичних принципів та вказівок для експериментів на тваринах», 3-є видання (Швейцарія, 2005 р.), Гельсінською декларацією Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000), типових положень з питань етики МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р., Директиви 2010/63/ЄС Європейського парламенту та Ради «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» (2010). Процедури були затверджені комісією з питань дотримання біоетики при проведенні експериментальних та клінічних досліджень ННМІ Сумського державного університету.

Основним підґрунтям відбору зразків для подальшого вивчення на щурах були результати досліджень тесту на деградацію та визначення токсичності за допомогою культур клітин, а також аналізу антимікробних властивостей поверхні. З кожної з груп С1 та С2 були відібрані зразки котрі показали найкращі результати під час досліджень.

Для *in-vivo* експерименту тварини були поділені на 3 групи залежно від виду зразків по 20 тварин у кожній, з яких 2 дослідних з використанням модифікованих зразків Mg за допомогою ПЕО у розчинах С1 250 В та С2 300 В та група порівняння з немодифікованими зразками Mg. Тварин

виводили з експерименту на 7-му та 31-шу добу. Знеболення тварин проводилось за допомогою внутрішньо-м'язової ін'єкції – 7 мг/кг кетаміну (АТ «Фармак», Україна) та 10 мг/кг ксилазину (Alfasan International B.V., Нідерланди). Після гоління міжлопаткової ділянки в асептичних умовах проводили розтин шкіри довжиною 1 см. Імплантат розміщували в підшкірну-жирову клітковину. Рану зашивали двома шарами розсмоктувальних швів (Vicryl 4/0, Ethicon).

2.4.1. Гістологічне дослідження зрізу імплантат-тканина

По закінченню терміну імплантації та виведення щурів з експерименту, для подальшого гістологічного дослідження, провели відбір гістологічних зразків, а саме: тканину, утворену в місці імплантації, печінку і нирки. Гістологічне дослідження було проведено на базі Наукового центру патоморфологічних досліджень кафедри патологічної анатомії Навчально-наукового медичного інституту СумДУ. Відібраний матеріал було зафіксовано у 10 % розчині нейтрального формаліну (рН – 7,2) протягом 24 годин. Для гістологічного дослідження ми створили зрізи товщиною 5 мкм із залитих парафіном блоків тканин і нанесли їх на SuperFrost (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) мікроскопічні предметні скельця, які піддавали стандартній депарафінізації ксилолом і регідратації при зниженні концентрації етанолу. Потім препарати фарбували гематоксиліном та еозином за стандартними методами для візуальної оцінки гістологічних препаратів.

2.4.2. Оцінювання гістологічних зразків

Усі дослідження проводили на мікроскопі Carl Zeiss Primo Star з цифровою камерою Zeiss AxioCam ERc 5s та програмним забезпеченням ZEN 2 (blue edition) (Oberkochen, Germany). Усі морфометричні параметри були оцінені в 10 полях зору при збільшенні $\times 100$. Під час оцінювання враховувались наступні параметри: біодеградація, біосумісність, імуногенність, біостимуляція, токсичність.

2.4.3 Імуногістохімічне дослідження

Для імуногістохімічного (ІГХ) дослідження були використані зрізи товщиною в 4 мкм. Тканини були депарафіновані та гідратовані. Активність ендогенної пероксидази блокували за допомогою 3% метанолу в перекису водню. Після чого провели відновлення антигену на водяній бані при температурі 98 °С з використанням Tris EDTA або цитратного буфера (pH 6,0) з подальшою первинною інкубацією антитіл. Після промивання мічені полімерні вторинні антитіла (Envision Detection System, Agilent, США) додавали до зрізів на слайдах. Активність пероксидази була виявлена за допомогою діамінобензидину (ДАБ) — рідина тетрагідрохлориду плюс субстрат Chromogen System (Agilent). Реакцію зупиняли дистильованою водою. Зрізи забарвлювали гематоксиліном і фіксували в середовищі Річарда-Аллана (Richard–Allan Scientific Mounting Medium, ThermoFisher).

Для оцінки можливих механізмів впливу Mg-імплантатів на навколишні тканини оцінювали експресію наступних біомаркерів:

- Мієлопероксидаза (MPO, Agilent, polyclonal) як маркера PMN;
- CD68 (Agilent, CloneKP1) та CD163 (Cell Marque, Клон MRQ-26) для розшифровки реакції M1 і M2 макрофагів;
- Альфа-гладком'язовий актин (α -SMA; Agilent, клон 1A4) застосовували для ідентифікації міофібробластів як ключових клітин грануляційної тканини.

2.4.4 Оцінка клітинних механізмів реакції на Mg-імплант

Щоб виявити потенційні механізми запальної реакції, індукованої Mg-імплантатами, різні імунні клітини, включаючи поліморфноядерні лейкоцити (PMN, MPO+ клітини) і M1/M2 макрофаги (CD68+ і CD163+ клітини відповідно), які сповільнюють запалення, візуалізували за допомогою імуногістохімії. Кількість MPO+, CD68+, CD163+ та α -SMA-позитивних

клітин розраховували на поле зору при збільшенні $\times 400$ двома незалежними спостерігачами.

2.5 Статистичний аналіз

Результати представлені як середнє значення ознаки (M) та стандартне відхилення (SD) для кожної вибірки або як відсоток збільшення порівняно з контролем. Номінальні дані представлені у відсотках. Перевірку гіпотези про нормальність розподілу досліджуваної вибірки проводили згідно критерію Колмогорова-Смірнова. Порівняння груп проводили з використанням дисперсійного аналізу (ANOVA) для нормального розподілення, або за допомогою критерію Краскела – Уолліса. Результати всіх використовуваних методів вважали статистично значущими з ймовірністю похибки $p < 0,05$ (менше ніж 5 %). Одержані цифрові показники проведених досліджень обробляли на персональному комп'ютері у середовищі програми Graph Pad® 8.0 та за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2016 на базі операційної системи Windows 11.

Основні результати цього розділу опубліковані в працях [135–139].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Дослідження фізико-хімічних та структурних властивостей імплантатів Mg модифікованих ПЕО

3.1.1 Сканувальна електронна мікроскопія

Після плазмового електролітичного окислення поверхня магнієвих сплавів мала типову пористу структуру. ПЕО в електроліті С1 утворює субмікронні пори розміром до 0,5 мкм. Є поодинокі пори діаметром від 1,0 до 5,0 мкм, але суттєвого впливу на загальну пористість вони не мають (рис. 3.1).

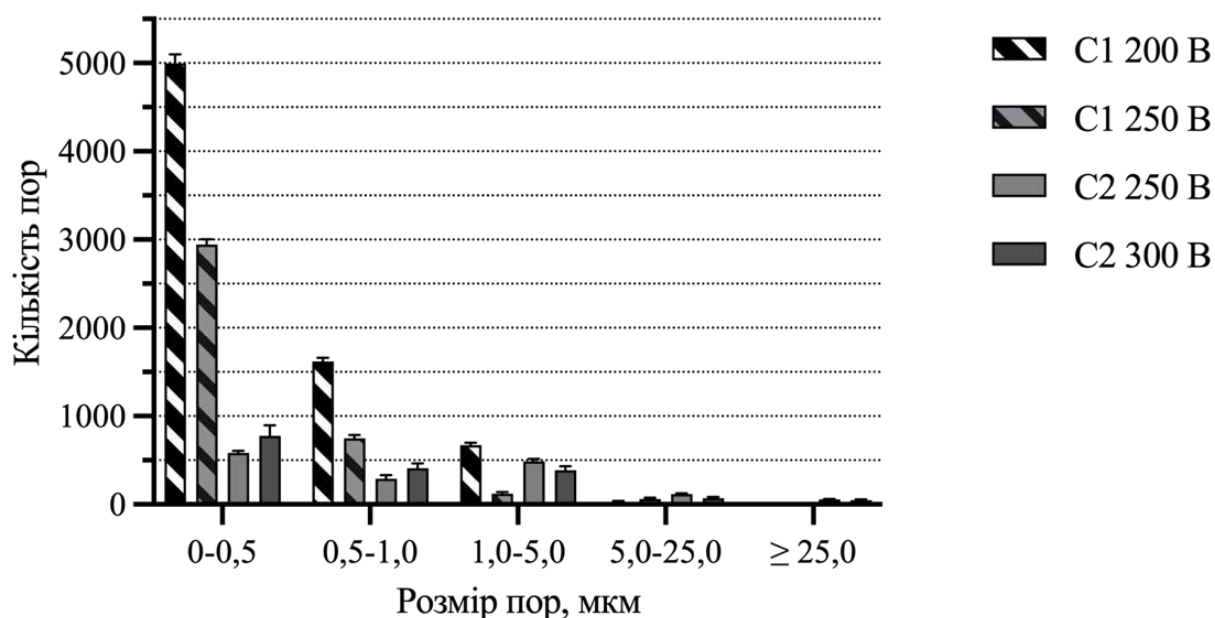


Рисунок 3.1 – Розподіл пор за кількістю та розміром на модифікованій поверхні.

Підвищення напруги ПЕО з 200 до 250 В зменшило площу пор, з 21 % до 9 %. ПЕО в електроліті С2 забезпечила утворення пор із середнім діаметром від 1 до 5 мкм та поодинокими порами розміром до 25,0 мкм (рис. 3.2). Площа пор в покриттях С2 коливалась від 15 % (250 В) до 12 % (300 В).

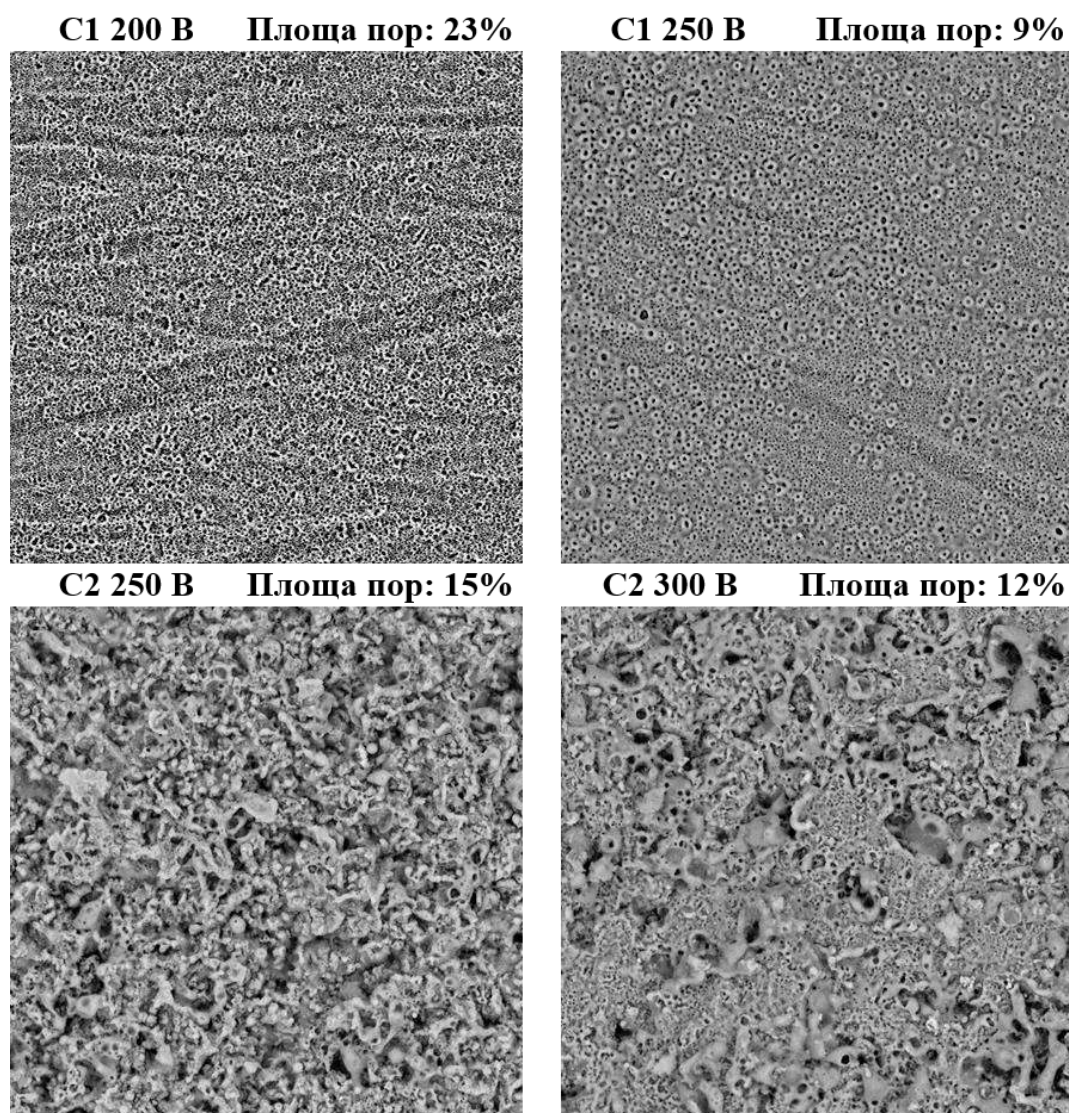


Рисунок 3.2 – SEM зображення та площа пор на поверхні зразків Mg після обробки ПЕО

3.1.2 Рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія

Mg, O, Si, F були основними елементами, ідентифікованими на енергодисперсійних спектрах в обох покриттях електролітного типу (Рис. 3.3, Табл. 3.1). Спостерігається чітке включення Si в усі досліджені оксидні покриття та покращує механічні властивості та корозійну стійкість. Вища концентрація Si була виявлена для електроліту типу C2. Також було помічено, що зі збільшенням напруги анодування в оксидне покриття включалося більше Si. Велика присутність O підтвердила оксидний характер поверхневих шарів. Низька концентрація Ca та Na свідчить про відсутність впливу домішок у хімічному складі покриттів. Включення Ca в покриття типу C2 було однаково

малим, і напруга анодування не впливала на концентрацію Ca в оксидному покритті. Це можна пояснити утворенням фториду кальцію під час тривалої обробки ПЕО, що забезпечує додатковий захист від процесів окислення. Проте кількість введеного фтору була значно вищою (0,31–0,43 ат. співвідношення) для поверхні типу C2, тоді як для зразків, оброблених електролітом типу C1, вміст фтору був нижче 0,1 ат. співвідношення.

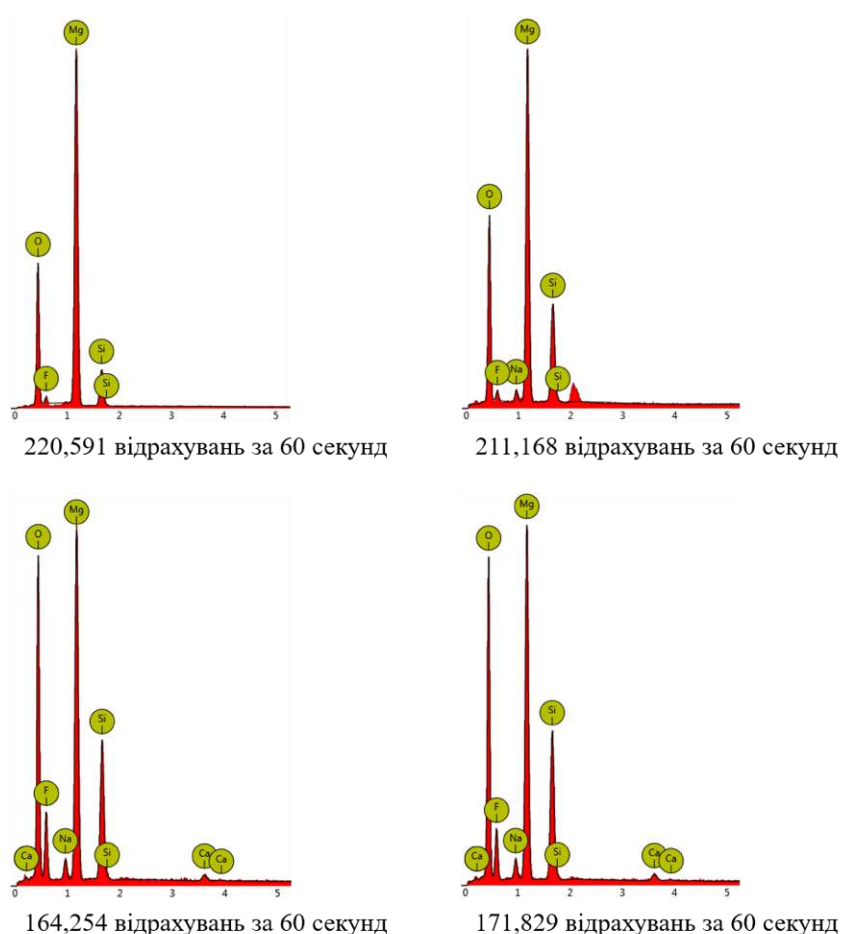


Рисунок 3.3 – Аналіз EDX зразків Mg після обробки ПЕО.

Показник співвідношення елементів описує рівень інкорпорування сполук до покриття модифікованих зразків. При збільшенні напруги до 250 В кількість Si збільшується у 2 рази в оксидному шарі C1. Тоді як у поверхні обох типів зразків C2 не виявлено залежності хімічного складу від величини напруги. Показник F/Mg має низьке значення для поверхні зразків типу C1, що говорить про низький рівень включення F. Концентрація F значно

збільшується при використанні електроліту для зразків С2 і не залежить від прикладеної напруги (Табл 3.1).

Зразок	Напруга анодування, В	Виявлені елементи	Si/Mg співвідношення	F/Mg співвідношення	Ca/Mg співвідношення
С1	200	O, Mg, F, Si	0,26±0,02	0,06±0,01	-
	250	O, Mg, F, Si, Na	0,52±0,05	0,08±0,01	-
С2	250	O, Mg, F, Si, Na, Ca	0,54±0,04	0,43±0,03	0,03±0,01
	300	O, Mg, F, Si, Na, Ca	0,60±0,05	0,31±0,02	0,03±0,01

Таблиця 3.1 – Аналіз EDX зразків Mg після процесу ПЕО.

3.1.3 Дослідження поперечного перерізу

Утворення стабільного оксидного шару є основним параметром, який впливає на стійкість до деградації, біосумісність та клінічні результати (рис. 3.4).

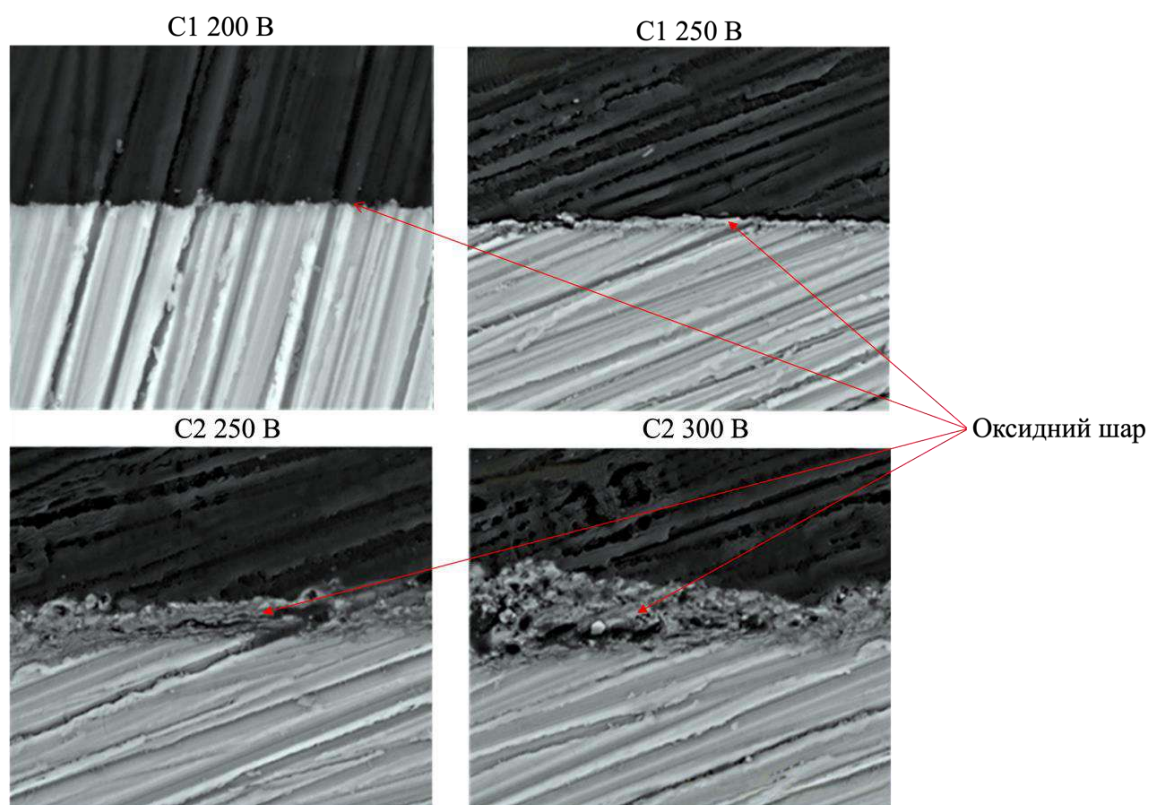


Рисунок 3.4 – Аналіз поперечного перерізу зразків Mg після процесу ПЕО.

Електроліт С1 в обох режимах напруги генерував тонкий оксидний шар товщиною від $2,06 \pm 0,7$ до $2,09 \pm 0,38$ мкм. Електроліт на основі гідроксиду кальцію (С2) призвів до різкого збільшення товщини оксидного шару, який становив $14,52 \pm 1,8$ мкм при напрузі 300 В.

Картографування поперечного перерізу зразків модифікованих у розчині С1 показало утворення пористих оксидних покриттів котрі складаються із суміші елементів, що виділяються з електролітів, таких як О, Si, F та Na, а також елементів, що походять із підкладки (Mg) (рис. 3.5).

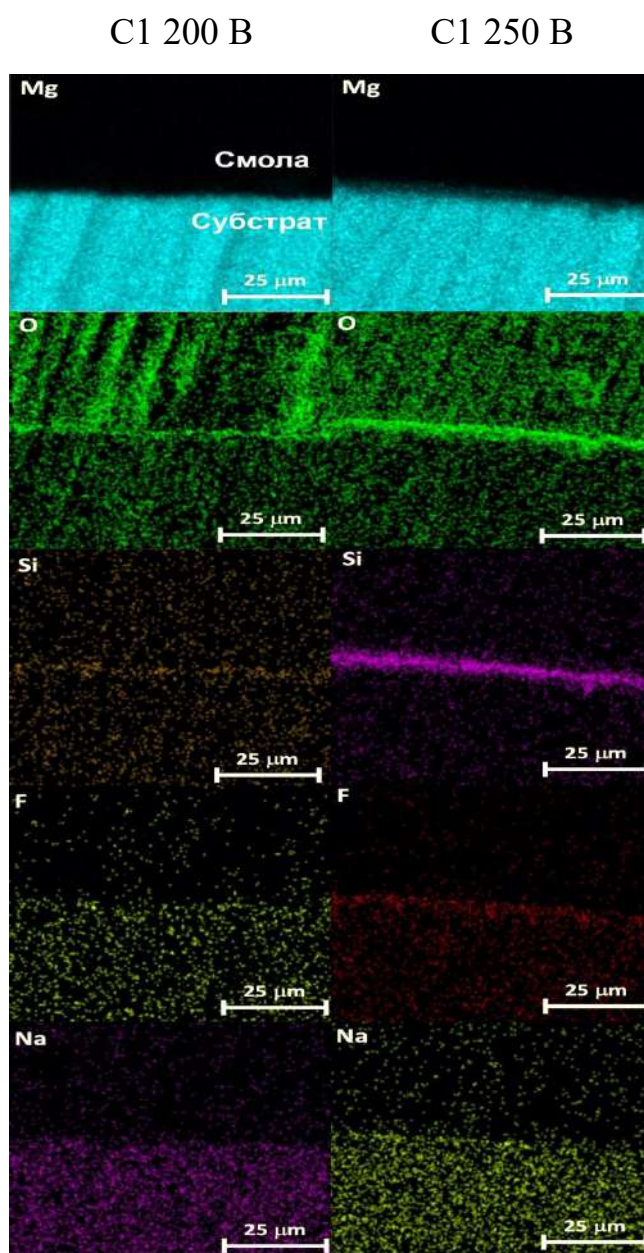


Рисунок 3.5 – Розподіл елементів зразку та покриття, виявлених за допомогою енерго-дисперсійної спектроскопії на поперечних перетинах анодованих Mg зразків.

Це твердження підтверджується лініями EDX, виконаними на поперечному перерізі зразків C1 200 В та C1 250 В. Дане зображення також демонструє, що всі виявлені елементи рівномірно розподіляються по покриттю.

EDX поперечного перерізу зразків C2 250 В та C2 300 В продемонстрували спільні риси шарів зразків типу C1 та C2 (рис. 3.6). Хімічні елементи, як і в першому випадку зберегли свій рівномірний розподіл. Відсутність сторонніх хімічних елементів в зразках модифікованих в обох типах електроліту доводять чистоту використовуємих матеріалів.

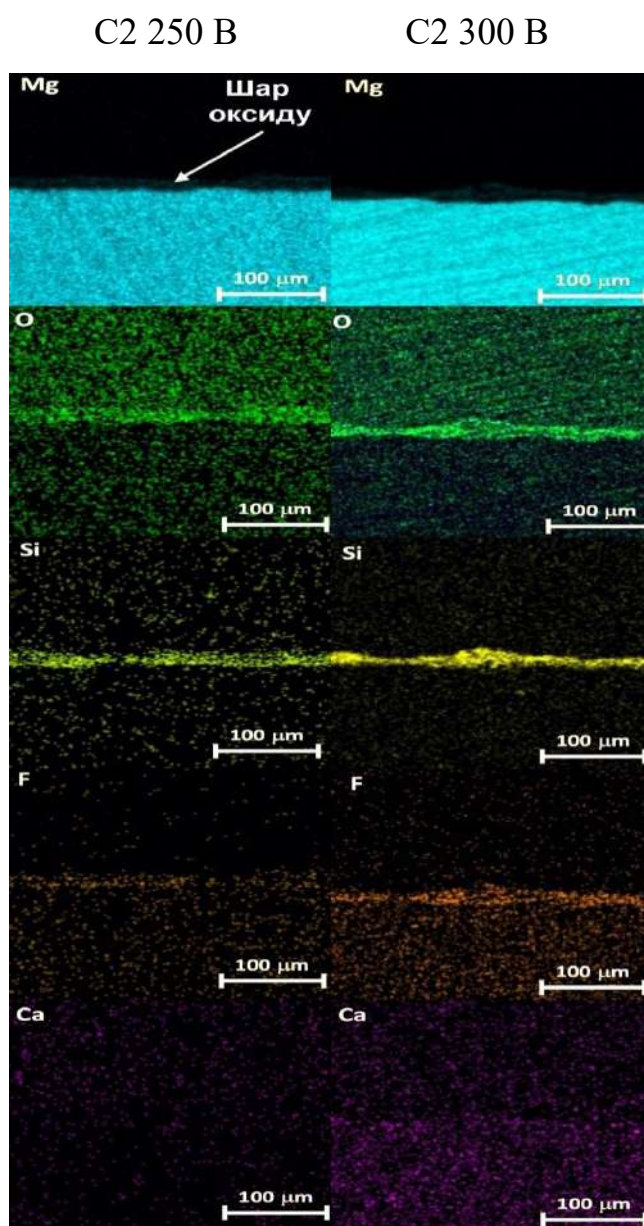


Рисунок 3.6 – Розподіл елементів зразку та покриття, виявлених за допомогою енерго-дисперсійної спектроскопії на поперечних перетинах анодованих Mg зразків.

Також, за допомогою даних досліджень було підтверджено існування прямої залежності між величиною прикладеної напруги, типом електроліту та шорсткістю. Товщина отриманих покриттів і параметри шорсткості Ra і Rz зростали зі збільшенням напруги особливо у зразків групи C2.

3.1.4 Дослідження шорсткості поверхні та профілю зносу

Покриття ПЕО, отриманого за допомогою електроліту, що містить Ca(OH)₂, показало тенденцію збільшення шорсткості поверхні зі збільшенням прикладеної напруги у порівнянні з електролітом C1. Значення параметрів шорсткості наведені в табл. 3.2. Згідно з цими даними, шорсткість поверхні корелювала зі значеннями контактного кута для покриттів типу C2.

Зразок	Напруга анодування, В	Ra	Rz
C1	200	0,43 ± 0,02	3,02 ± 0,09
	250	0,39 ± 0,01	2,83 ± 0,13
C2	250	1,17 ± 0,08	11,6 ± 1,24
	300	2,10 ± 0,15	13,1 ± 1,13

Таблиця 3.2 – Аналіз EDX зразків Mg після процесу ПЕО.

Менші значення контактного кута сприяли вищим значенням текстурної поверхні. Такий високий показник шорсткості обумовлений дугою на поверхні, що призводить до появи розрядних каналів і більших кратерів. Виражена мезопориста структура поверхні призводить до збільшення загальної площі поверхні. Це, у свою чергу, може сприяти кращій адгезії біологічних структур до модифікованих поверхонь, що є критично важливим з декількох причин, а саме: фіксація імплантату, запобігання вторинному інфікуванню, збереження природніх структур навколишніх тканин, комфорту пацієнта після імплантації, кращої інтеграції з навколишніми тканинами. Тож адгезія біологічних структур в імплантології є критичним аспектом для успішного лікування та забезпечення якісних результатів для пацієнта.

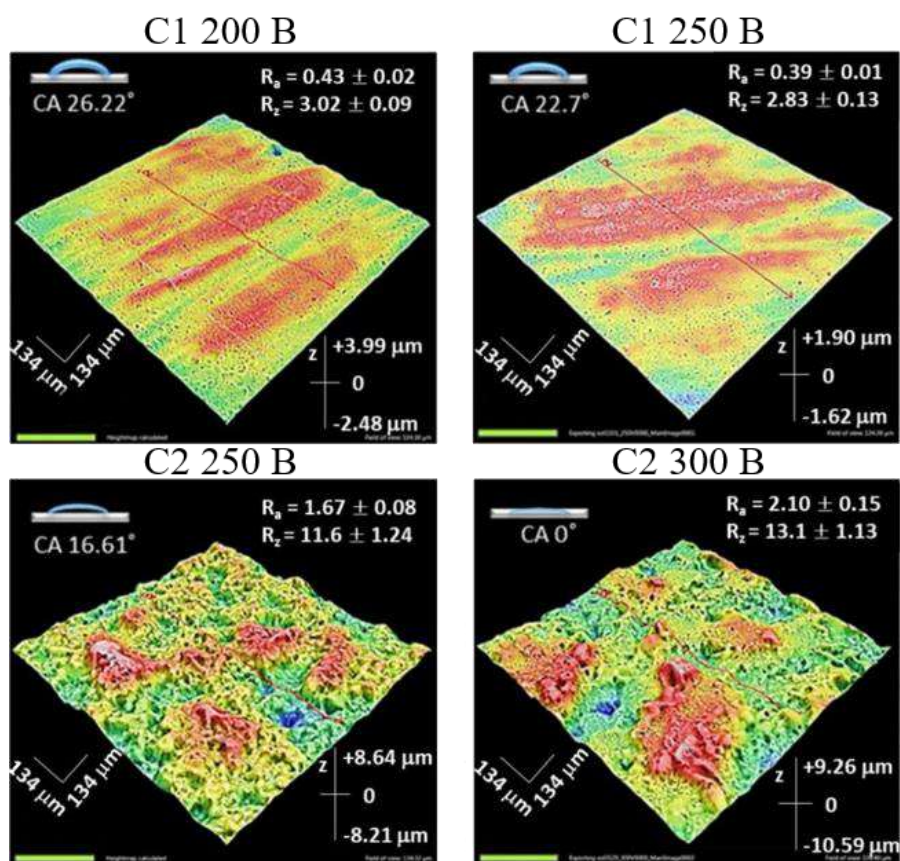


Рисунок 3.7 – 3D топографічні карти зразків анодованого магнію, а також шорсткість поверхні та параметри контактного кута покриттів.

3.1.5 Дослідження гідрофобності та гідрофільності поверхні

Іншою важливою особливістю покриттів, що містять Са, було явне підвищення гідрофільності (рис. 3.8). Змочуваність є важливою характеристикою поверхні, яка сприяє адгезії клітин у біомедичних застосуваннях. Гідрофільна поверхня підтримує осадження та адгезію білків. Контактний кут поверхні C1 200 В і C1 250 В становив $26,22^\circ$ і $22,7^\circ$, відповідно, що означає, що поверхні мали гідрофільну властивість. Додавання $\text{Ca}(\text{OH})_2$ до електроліту зменшило значення контактного кута. Зменшення становило приблизно 30% для покриття C2 250 В. Крім того, поверхня C2 300 В мала найнижчий контактний кут (0°) і була високо гідрофільною.

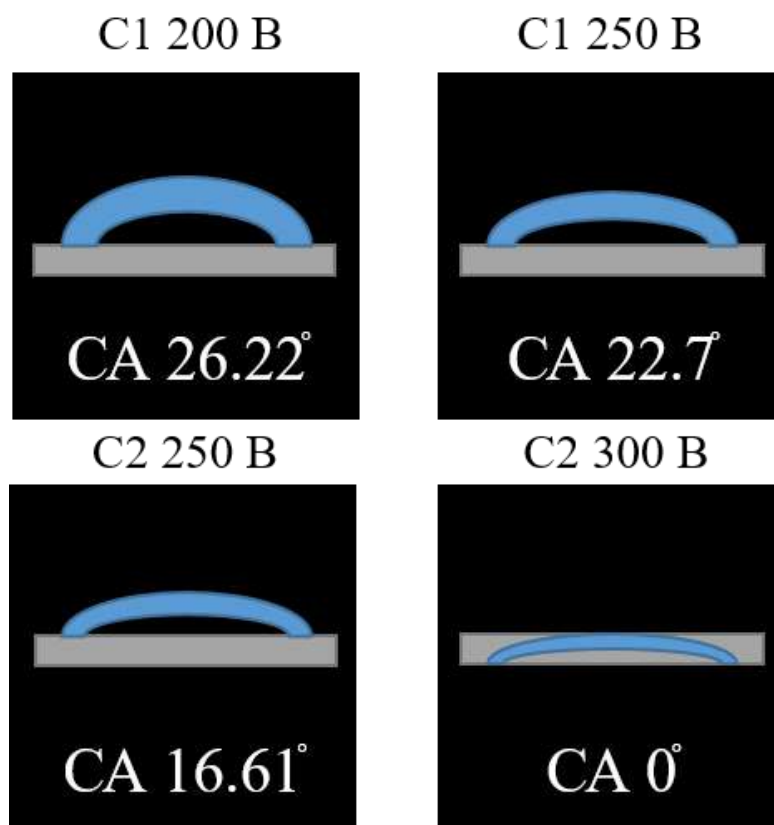


Рисунок 3.8 – Параметри контактного кута покриттів.

3.1.6 Дослідження фотолюмінесценції Mg зразків

Зразки Mg ПЕО показали чотири характерні піки випромінювання з центром на 360–380, 450, 500 і 660 нм. Наноструктури MgO показали випромінювання в діапазоні UV-Vis-NIR. Спостережуване випромінювання можна пояснити структурними дефектами. Піки ФЛ, що спостерігаються в діапазоні 380–520 нм, пов'язані з F/F+-центрами (іони/атоми лугу) та вакансіями кисню. Спостережуване випромінювання ФЛ у діапазоні 600–800 нм пояснюється дефектами структури поверхні, такими як кисневі вакансії та проміжні вузли.

Отримані результати ФЛ (рис. 3.9) показали, що процес ПЕО в електроліті C1 утворив менше структурних дефектів, порівняно зі зразками, модифікованими в електроліті C2.

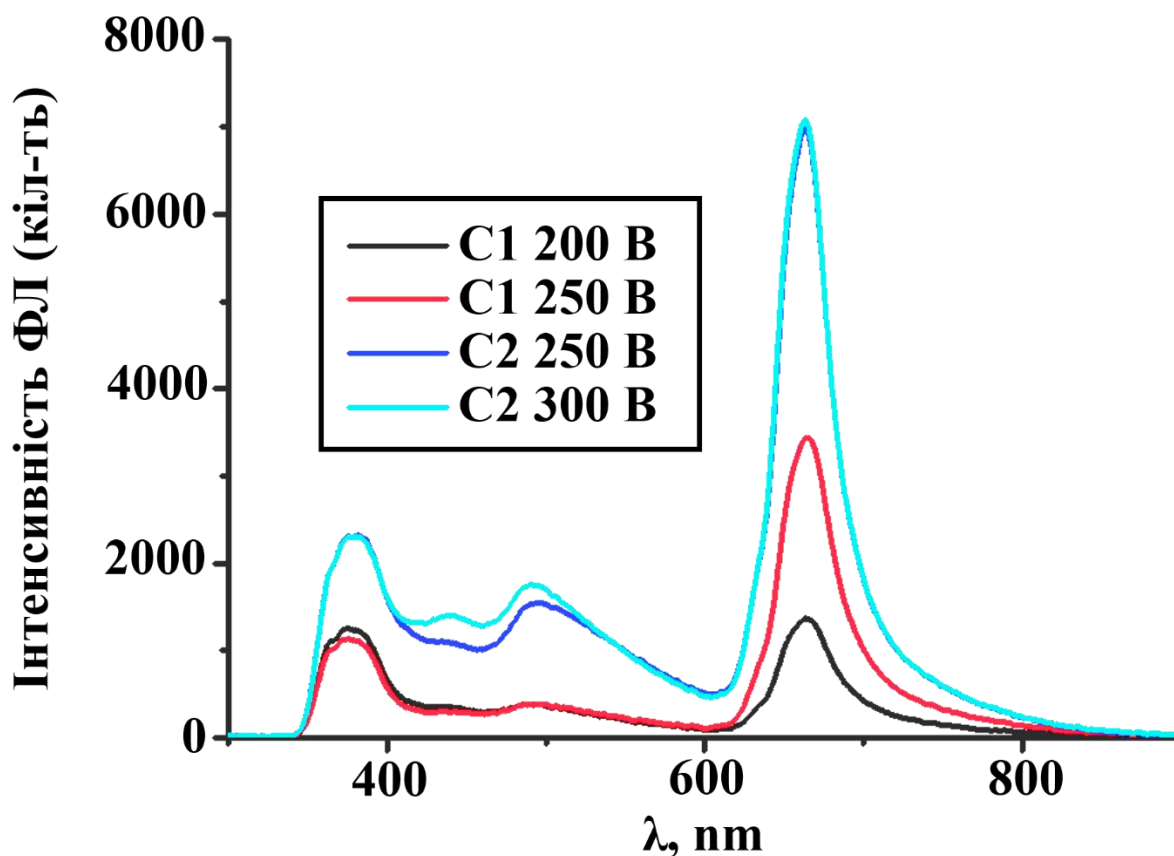


Рисунок 3.9 – Фотолюмінесценція анодованих Mg зразків.

Збільшення напруги призвело до значного збільшення піку при 660 нм для покриттів типу C1 і незначного збільшення інтенсивності піку при 450–520 нм для покриттів типу C2. Проведення кореляції даних ФЛ з результатами SEM та EDX. Показало, що $\text{Ca}(\text{OH})_2$ є важливою сполукою для окислення та модифікації поверхні Mg імплантатів, оброблених методом ПЕО.

Додавання іонів Ca^{2+} призвело до більш інтенсивного окислення поверхні Mg і зростання оксидного шару з більшою активною площею поверхні. Тому концентрація дефектів і більша площа поверхні можуть пояснити більш інтенсивне випромінювання ФЛ для покриттів типу C2.

3.1.7 Тест на деградацію з SBF

Тривале занурення в розчин SBF характеризує стабільність поверхні та її здатність викликати осадження відкладень фосфату кальцію. Результати

втрати ваги немодифікованого Mg та зразків із модифікованою поверхнею за допомогою ПЕО C1-C2 показані на рис. 3.10.

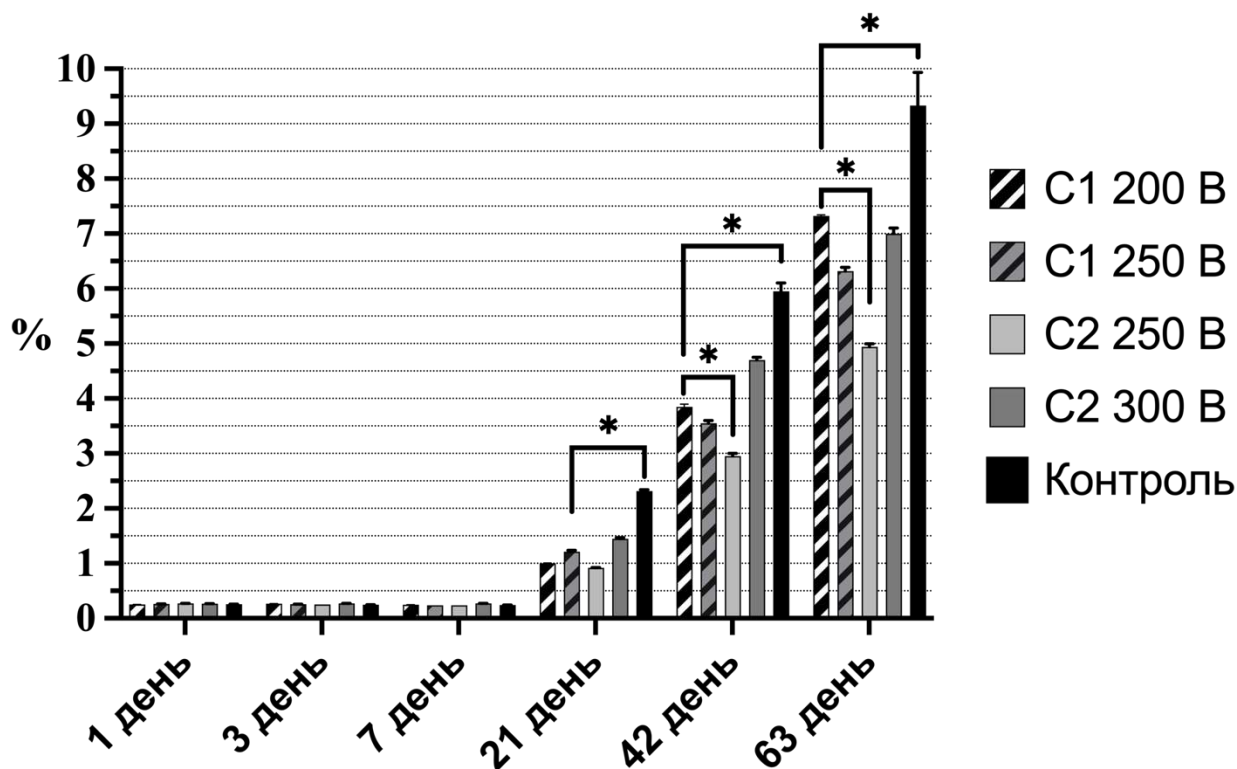
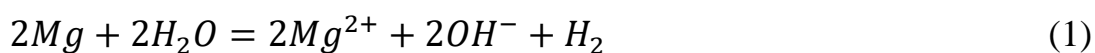


Рисунок 3.10 – Втрата ваги (у %) контрольних та анодованих Mg зразків, * $p < 0,05$

До сьомого дня тесту на занурення втрата ваги для всіх досліджуваних зразків (контрольних та оброблених ПЕО) була незначною, менше 0,5 %, а ступінь деградації зразків була однаковою.

Загалом, Mg можна окислювати в середовищі SBF, вивільняючи водень і осаджуючи $Mg(OH)_2$ на поверхні зразка (див. рівняння (1) і (2)). У міру зневоднення $Mg(OH)_2$, відповідно до рівняння (3), об'єм попередньо нанесеного гідроксидного шару має тенденцію до усадки, що призводить до відшарування на поверхні Mg. Швидкість втрати маси для чистого Mg (контроль) є низькою через утворення шару MgO та розчинення магнію:



Через 21 день випробування зануренням було виявлено чітке збільшення деградації зразків. Однак, контрольні зразки Mg зазнали більших втрат ваги та видимих процесів руйнування, що підтверджується рис. 3.11 для зразків немодифікованого Mg.

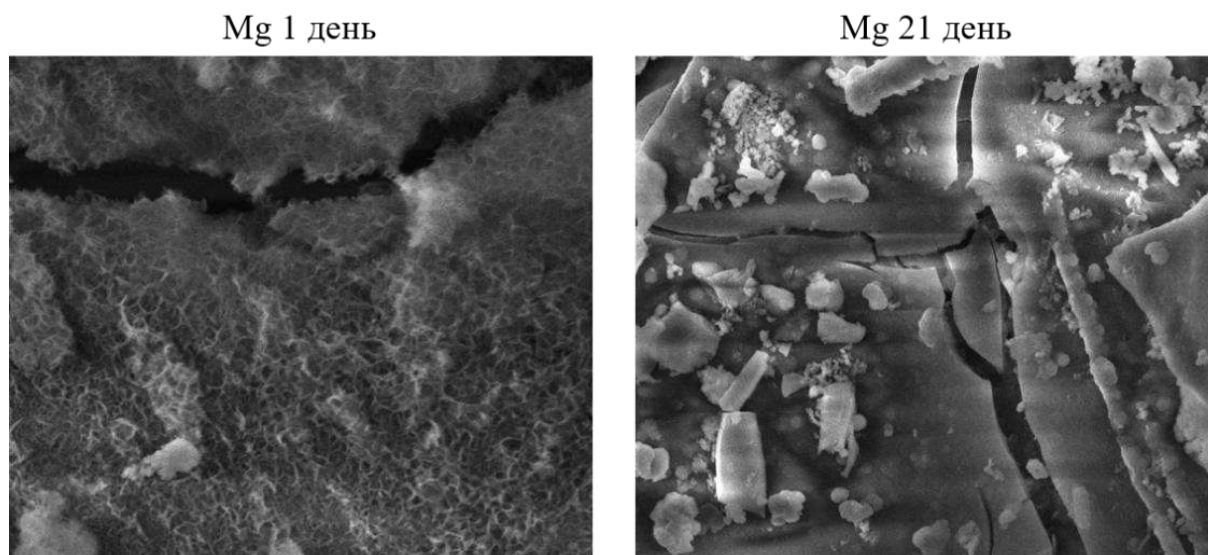


Рисунок 3.11 – Зображення SEM відібраних зразків магнію без модифікації поверхні після занурення в розчин SBF.

MgO, основний компонент ПЕО покриття, не є стабільним у водному середовищі і сприяє реакції, показаній у рівнянні (3), що йде у несприятливому напрямку, а саме усадки гідроксидного шару, що призводить до відшарування на поверхні зразка.

Зразки, котрі були модифіковані у розчині С1 також зазнали деградації за рахунок прихованих закритих пор, які поступово піддавалися впливу електроліту протягом часу занурення (рис. 3.12).

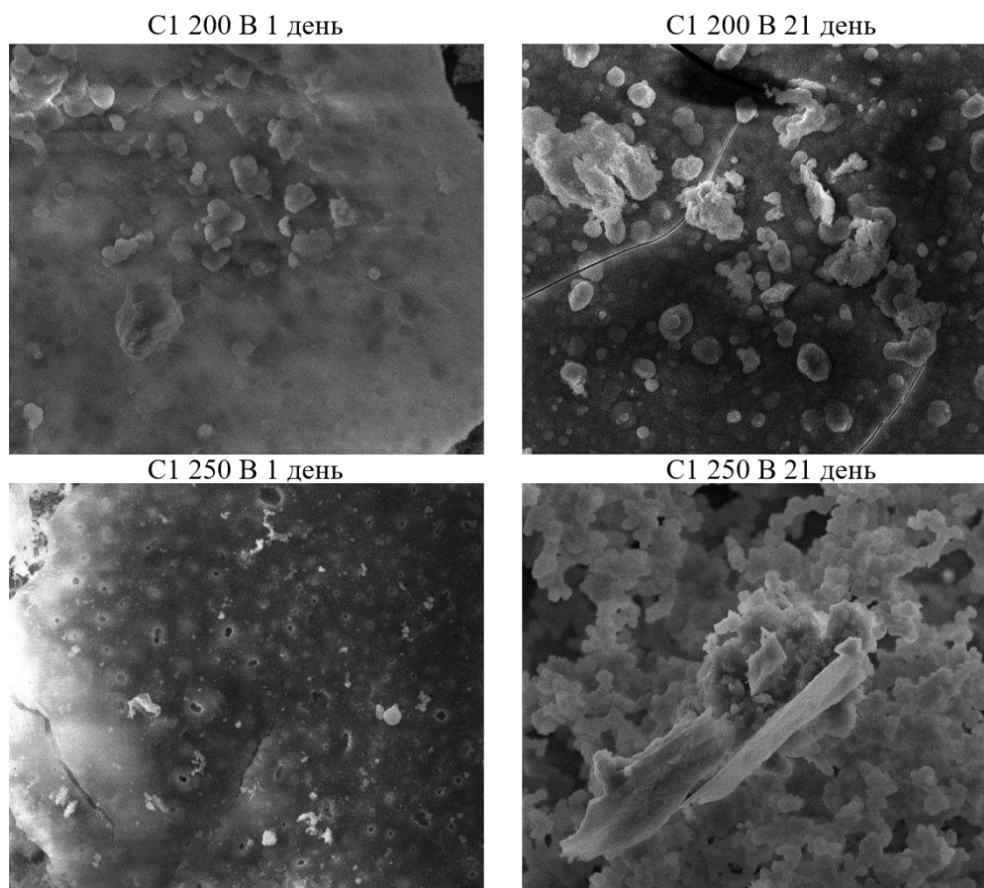


Рисунок 3.12 – Зображення SEM відібраних зразків C1 200 В та C1 250 В поверхні після занурення в розчин SBF.

Покриття C2 250 В продемонструвало найкращу корозійну стійкість порівняно з іншими ПЕО покриттями (рис. 3.13). В результаті занурення на 42 і 63 дні C2 250 В показав найнижчі значення втрати ваги ($2,85 \pm 0,084\%$ і $4,88 \pm 0,098\%$ відповідно). Слід зазначити, що за 63 дні занурення втрата маси чистого Mg була майже в 2 рази більшою.

Оскільки фосфат кальцію з розчину SBF може утворюватися як на покритті, так і на поверхні металу одночасно, ми припускаємо, що ці осади є сполуками Ca-P. Поверхня поступово ущільнюється від осадів і скупчення продуктів корозії.

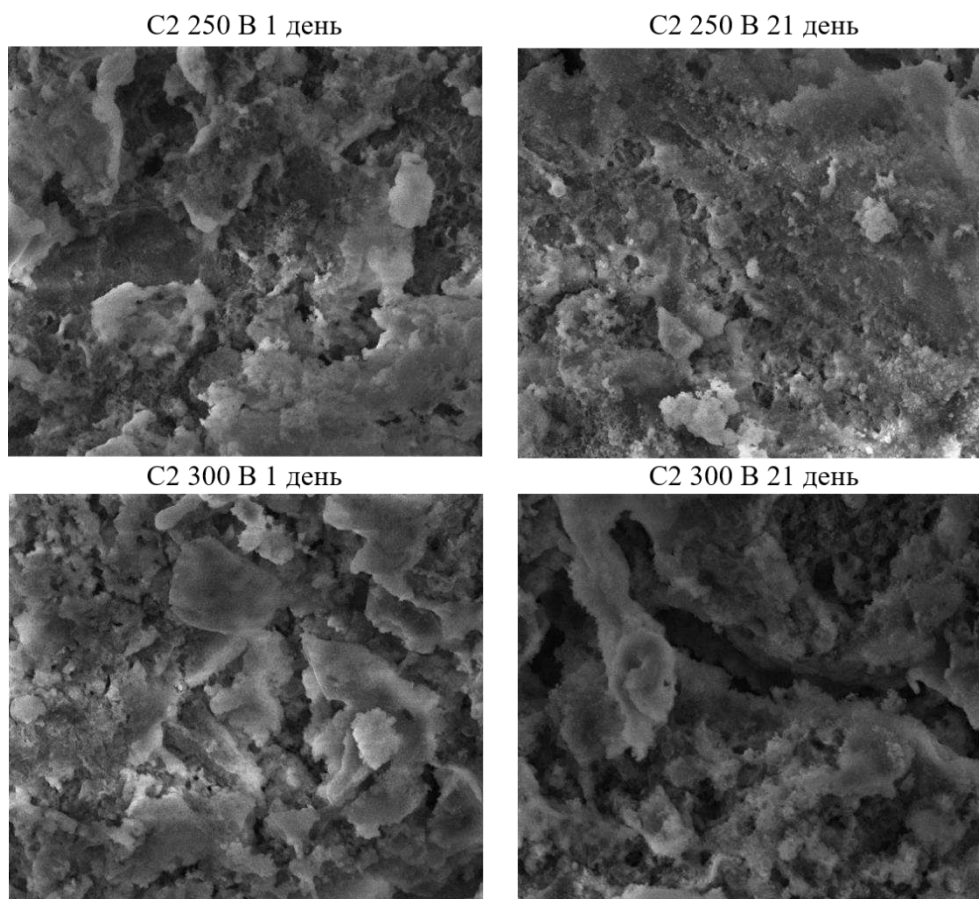


Рисунок 3.13 – Зображення SEM відібраних зразків C2 250 В та C2 300 В поверхні після занурення в розчин SBF.

Аналіз EDX, проведений через різні проміжки часу під час тесту, підтвердив осадження іонів Ca^{2+} та HPO_4^{2-} як на поверхні контрольного зразка, так і на отриманих покриттях (рис. 3.14). Покриття з оксиду ПЕО, створені електролітом типу C2, демонстрували вище співвідношення Ca/P в порівнянні з поверхнями, отриманими з використанням електроліту типу C1. Найбільші відмінності були помітні протягом першого тижня тесту. Після 63 днів випробування зануренням співвідношення Ca/P для всіх зразків типу C1 та одного зразка типу C2, анодованого при напрузі 250 В, було подібним. Для цього інтервалу часу співвідношення Ca/P для зразка C2 300 В було найвищим і досягло 1,19. Концентрація Si і F поступово зменшувалася з часом занурення в SBF.

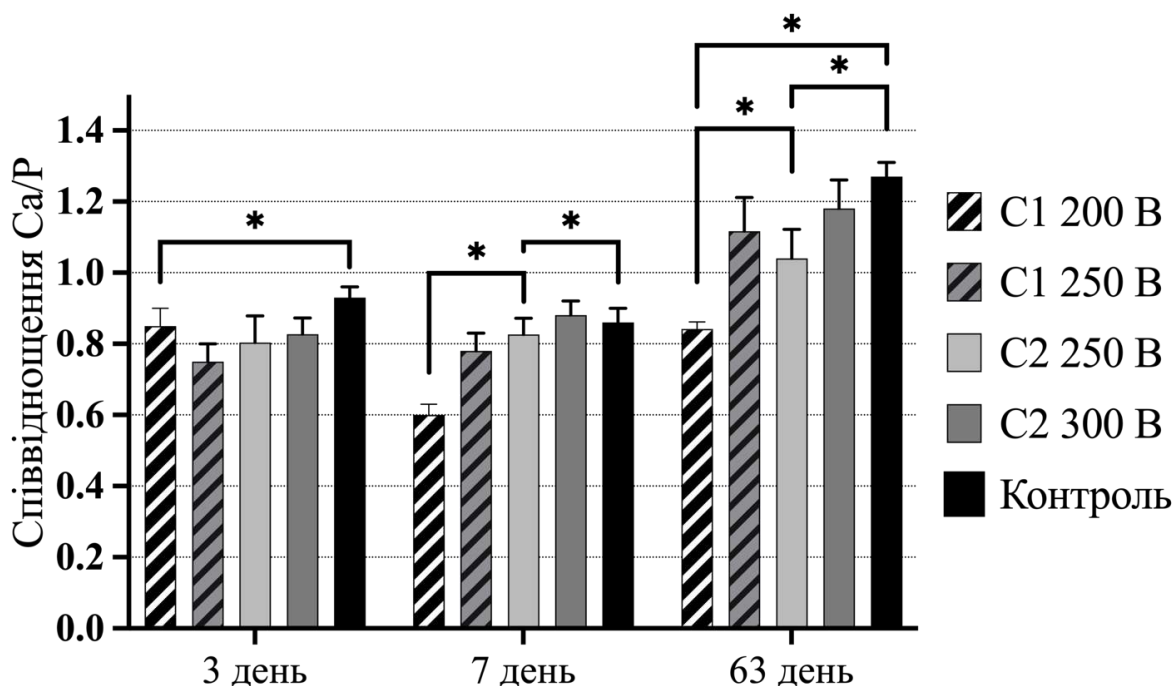


Рисунок 3.14 – Атомне співвідношення Са/Р на анодованих зразках Mg під час тривалого випробування зануренням, * $p < 0,05$.

3.2 Дослідження біологічних властивостей імплантатів Mg модифікованих ПЕО

3.2.1 Аналіз антимікробної активності *in vitro*

Антибактеріальну активність зразків оцінювали за допомогою тесту, що залежить від часу, з використанням *S. aureus*. На рис. 3.15 показано кількість бактеріальних клітин, що адгезувались на поверхні зразків після різного часу. У кожен момент часу ріст бактерій на поверхні покриттів типу С1 зменшувався. Результати показали, що до 24 години популяції бактерій на покриттях типу С1 постійно збільшувалися, але були значно нижчими, ніж у контрольних зразках.

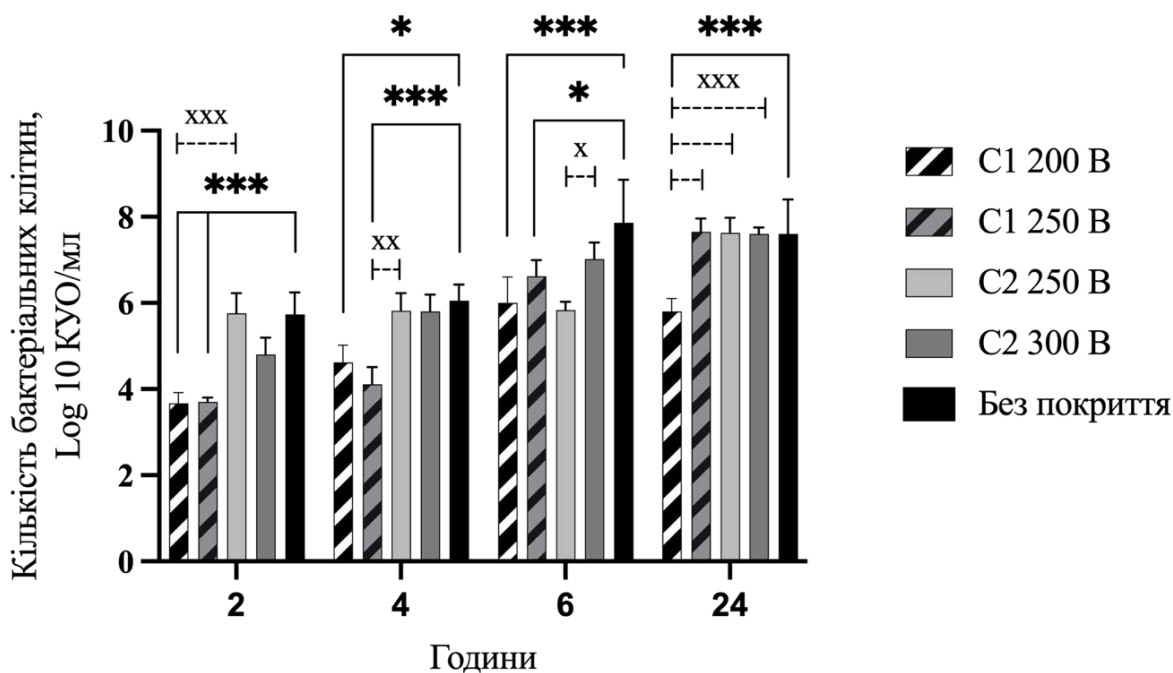


Рисунок 3.15 – Зростання та зменшення *S. aureus* на поверхнях зразків через різні проміжки часу; вказана значна різниця між контрольними та обробленими зразками (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$) і між різними обробленими зразками (x $p < 0,05$; xx $p < 0,005$; xxx $p < 0,0005$).

Таким чином, початкова кількість бактерій становила приблизно 3,5 \log_{10} КУО/мл для зразків, оброблених ПЕО C1 200 В і C1 250 В. Через 4 години зростання *S. aureus* досягало для цих зразків 4,69 \log_{10} КУО/мл і 4,00 \log_{10} КУО/мл відповідно. На покриттях типу C2 зростання бактерій збільшувалось поступово і швидше. Таким чином, обидва зразки C2 250 В і C2 300 В продемонстрували збільшення кількості бактерій до 5,70 \log_{10} КУО/мл. Після 6 годин інкубації колонії досягли 6,00 \log_{10} КУО/мл для C1 200 В і 6,7 \log_{10} КУО/мл для зразків C2 250 В, але все ще були значно нижчими, ніж для контрольних зразків. В іншому випадку через 24 години лише зразок C1 200 В виявив зниження росту порівняно з усіма іншими обробленими ПЕО та контрольними зразками ($p < 0,0005$). Що стосується інших досліджуваних зразків (оброблених ПЕО та контрольних), то на даний момент експерименту не спостерігалось зменшення кількості бактеріальних клітин.

Здатність запобігати вторинній інфекції через антиадгезійну поведінку є життєво важливою для характеристик поверхні біоматеріалу. На підставі результатів аналізу антимікробної активності припускається, що покриття типу С1 на магнієвих сплавах можуть бути прийнятними для медичного застосування, оскільки їх поверхні не сприяли початковій бактеріальній адгезії. Незважаючи на те, що утворення біоплівки *S. aureus* збільшувалася під час інкубації, була підтверджена значна відмінність між зразками типу С1 і контрольними в КУО/зразок. Більше того, результати показали більш високе інгібування бактеріальної адгезії для покриттів типу С1, ніж для покриттів типу С2. Накопичення бактерій збільшується зі збільшенням шорсткості поверхні. Бактеріальні клітини воліли прикріплюватися до більш розвинених поверхонь, оскільки неправильні структури, порівняні з розміром бактерій, забезпечували більшу поверхню та сприятливі місця для колонізації та утворення біоплівки.

3.2.2 Визначення токсичності та біосумісності з використанням культур клітин

Контрольні зразки магнію без модифікованої поверхні показали негативні результати адгезії клітин U2OS та зниження значень резазурину протягом всього періоду дослідження. Даний результат може свідчити про наявність продуктів корозії на поверхні зразка в наслідок неконтрольованої деградації чистого магнію. Вони можуть змінювати рН середовища та впливати на метаболізм клітин, що в свою чергу призводить до підвищення рівня токсичності зразків, невідповідної біосумісності та створення несприятливих умов для клітинної адгезії [140]. Усі модифіковані ПЕО зразки продемонстрували адекватну адгезію клітин із задовільним зниженням з $45,6 \pm 6,6$ до $53,2 \pm 8,1$ % резазурину без істотної різниці між піддослідними групами С1 та С2 (рис. 3.16). На третій і п'ятий дні спостерігалася значна клітинна проліферація на покриттях типу С2 250 В та С2 300 В до $83,8 \pm 7,4$ %. На відміну від покриттів типу С2, клітини на зразках С1 200 В та С1 250 В на третій день дослідження проліферували, але мали менші значення редукції

резазурину. На п'ятий день значення резазурину у зразках модифікованих у розчині С1 значно зменшилося, швидкість проліферації на цьому терміні все ще перевищувала значення для контрольних зразків, але була нижчою, ніж у покриттів типу С2.

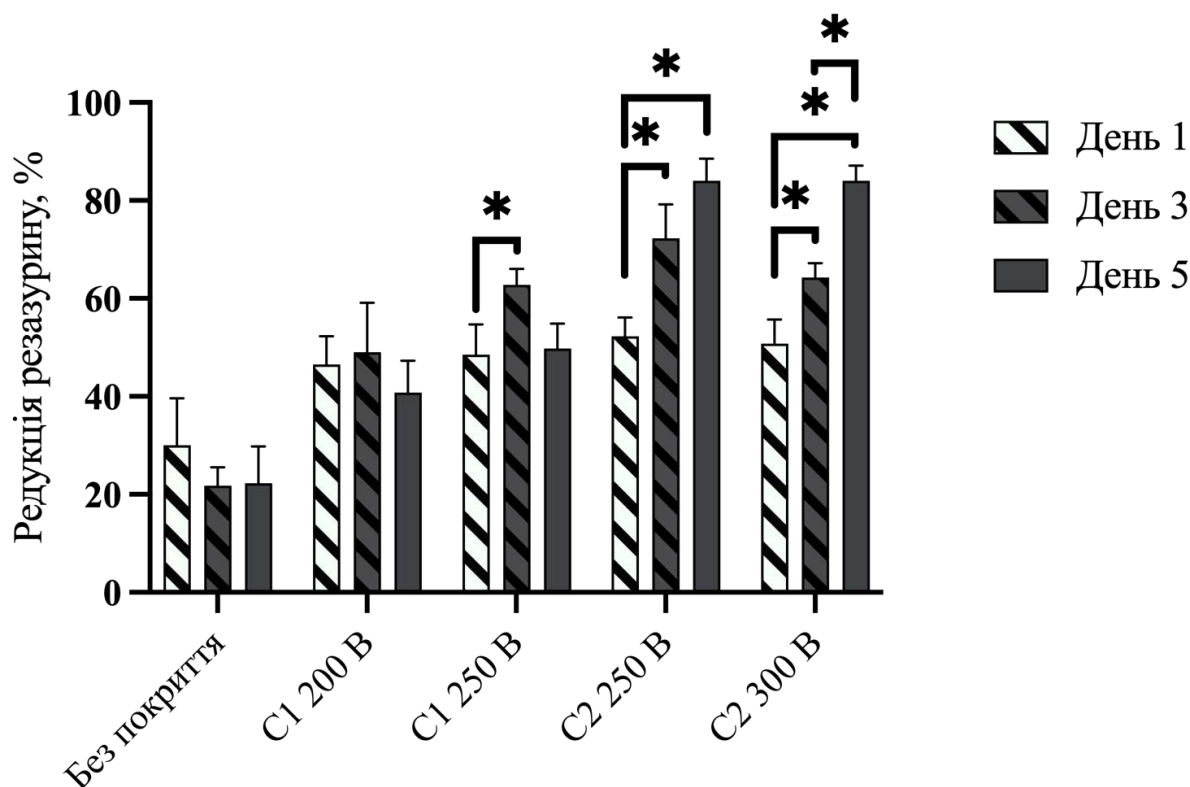


Рисунок 3.16 – Життєздатність клітин U2OS протягом 5 днів спільного культивування зі зразками Mg (без покриття та обробленими ПЕО).

Достовірна різниця (* $p < 0,05$).

Швидкість корозії покриттів або наявність структурних дефектів призводили до порушення прикріплення клітини та впливали на рівень токсичності.

3.3 Дослідження взаємодії елементів сполучної тканини з поверхнею імплантатів

3.3.1 Морфологічна характеристика взаємодії сполучної тканини з поверхнею імплантата С1 250 В після 1 тижня імплантації

Під час гістологічного дослідження біопсійного матеріалу, отриманого на 7-му добу імплантації зразків С1 250 В, було виявлено виражені запальні та деструктивно-некротичні зміни у прилеглих до імплантату ділянках тканин. Контактні ділянки були представлені некротизованими тканинами, обмеженими грануляційною та ніжною дозріваючою сполучною тканиною по периферії. У прилеглій фіброзно-жировій тканині була виявлена інтенсивна змішано-клітинна запальна інфільтрація, представлена як гранулоцитами, так і агранулоцитарними лейкоцитами (лімфоцити та макрофаги) (рис. 3.17).

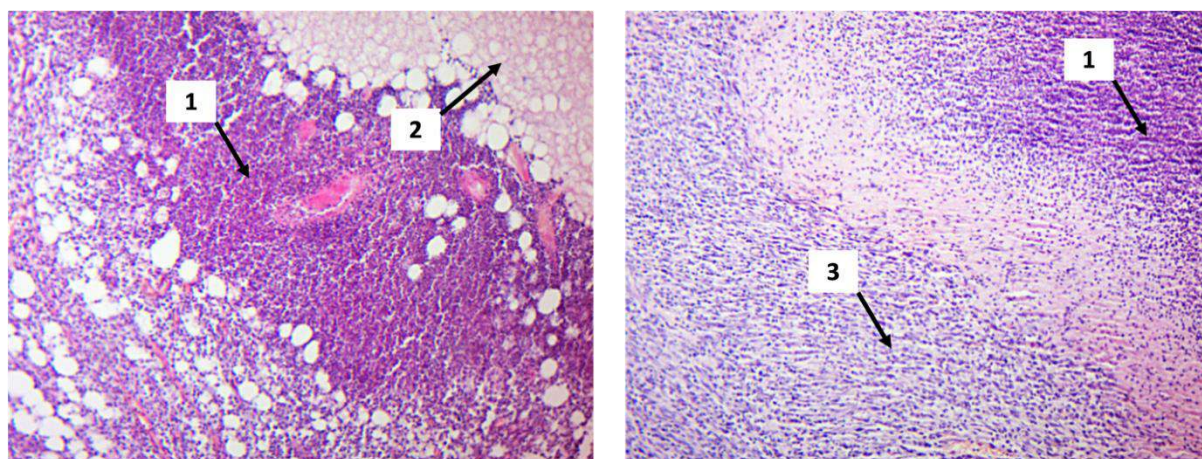


Рисунок 3.17 – Зона імплантації зразків С1 250 В у щурів через 7 днів спостереження: 1 – інтенсивна запальна інфільтрація; 2 – порожнисте утворення на місці імплантату (деструктивно-некротичні зміни); 3 – грануляційна тканина. Зabarвлення гематоксилін та еозин.

Збільшення $\times 100$.

Серед запального інфільтрату та вогнищ некрозу візуалізувалися залишки збереженої сполучної тканини та ділянки крововиливів. Вираженого токсичного впливу піддавалися не тільки прилеглі до імплантату тканини, але й інші органи.

Під час досліджень тканин печінки через 7 днів експерименту, було виявлено виражені патологічні зміни. У тканині печінки були присутні ознаки токсичного гепатиту: виражена перипортальна запальна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, яка помітна на гістологічному знімку як збірні форми в навколпечінкових просторах, жирова дистрофія гепатоцитів, набряк, вогнища некрозу, крововиливи, явища судинного застою та васкуліту (Рис. 3.18).

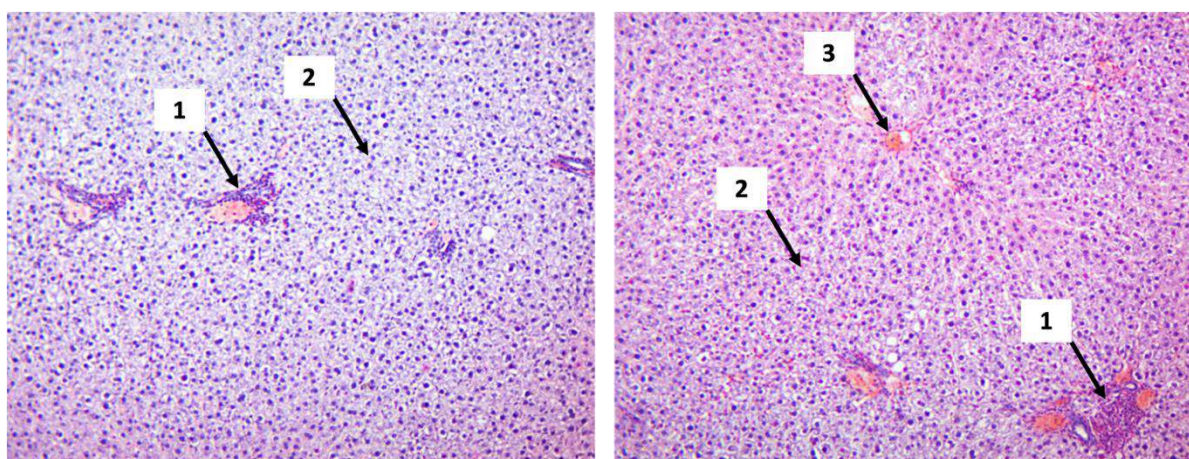


Рисунок 3.18 – Тканина печінки після імплантації зразків С1 250 В у щурів через 7 днів спостереження: 1 – перипортальна запальна інфільтрація; 2 – гепатоцити з вираженими дистрофічними змінами (жирова дистрофія); 3 – повнокрів'я судин. Зabarвлення гематоксилін та еозин. Збільшення $\times 100$.

Схожі зміни спостерігалися й у нирках (Рис. 3.19). На фоні токсичного впливу у паренхімі нирок виявлено ознаки токсичного тубуло-інтерстиційного нефриту. Серед відносно інтактних клубочків виявлено каналці нирок з дистрофічними змінами нефротелію, у більшій мірі у вигляді білкової дистрофії, частина з яких була некротизована або перебувала у стані апоптозу.

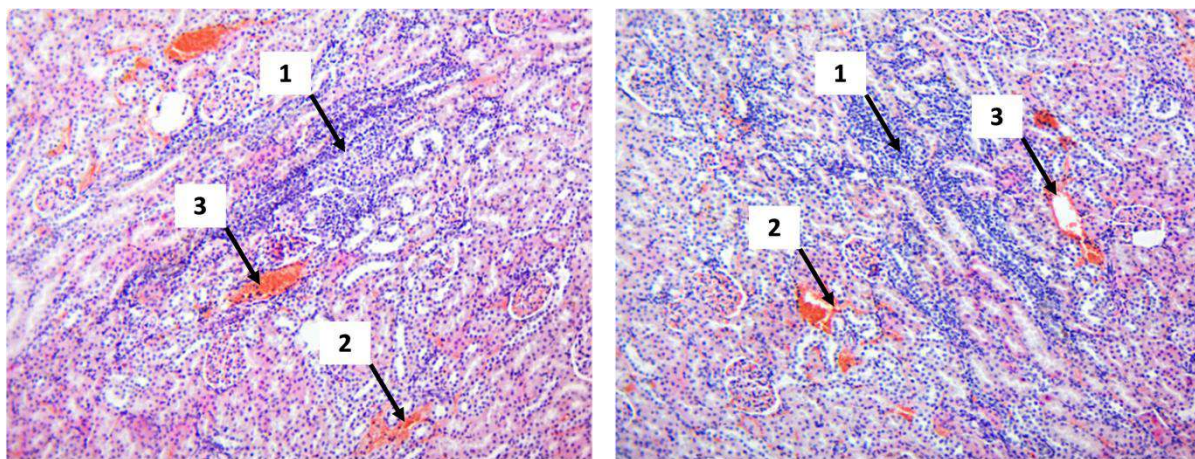


Рисунок 3.19 – Тканина нирок після імплантації зразків С1 250 В у щурів через 7 діб спостереження: 1 – запальна інфільтрація; 2 – крововиливи; 3 – повнокрів'я судин. Забарвлення гематоксилін та еозин. Збільшення $\times 100$.

Інтерстицій нирок був інтенсивно інфільтрований лейкоцитами, переважно лімфоцитарно-гістіоцитарного характеру, набряклий та з масивними крововиливами. У судинах нирок виявлено застій та вогнища васкуліту. Тварини зі зразками С1 250 В під час подальшого дослідження загинули у період з 9-ої по 11-ту добу.

3.3.2 Морфологічна характеристика взаємодії сполучної тканини з поверхнею імплантату С2 300 В після 7-ми та 31-ої доби імплантації.

Гістологічні дослідження тканин з ділянки імплантації зразків С2 300 В проведені через 7 діб після початку експерименту показали, що серед фіброзно-жирової тканини було виявлено вогнищеву лімфо-гістіоцитарну інфільтрацію, окремі ділянки розростання грануляційної тканини та дрібні перифокальні крововиливи (Рис. 3.20). Вказані зміни могли виникнути внаслідок пошкодження під час імплантації. Також було відзначено формування кон'юнктивального мішку навколо матеріалу імплантату.

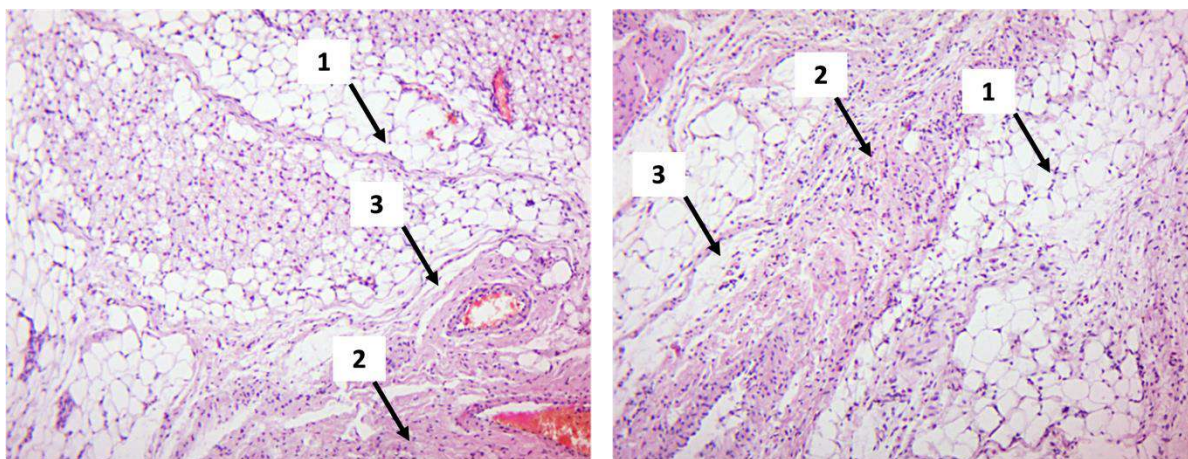


Рисунок 3.20 – Зона імплантації зразків С2 300 В у щурів через 7 днів спостереження: 1 – жирова тканина; 2 – фіброзна тканина; 3 – слабовиражений набряк. Забарвлення гематоксилін та еозин.
Збільшення $\times 100$.

Біопсійний матеріал отриманий на 31-й день експерименту показав невеликі ділянки розростання сполучної тканини та окремі вогнища грануляційної тканини на завершальному етапі дозрівання. Також серед сполучної тканини було візуалізовано групи імуніцитів, представлених лімфоцитами та окремими гістоцитами (Рис. 3.21). Гострої запальної реакції (нейтрофільно-еозинофільної) або несумісності тканин з матеріалом імплантату не спостерігалось.

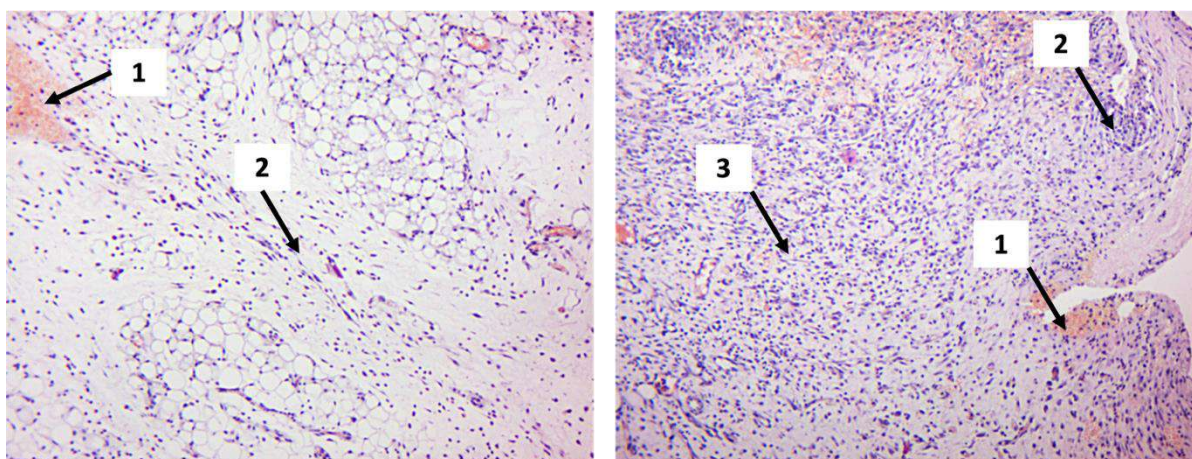


Рисунок 3.21 – Зона імплантації зразків С2 300 В у щурів через 31-ну добу спостереження: 1 – крововиливи; 2 – запальна інфільтрація; 3 – грануляційна тканина. Забарвлення гематоксилін та еозин.
Збільшення $\times 100$.

Досліджуючи ймовірність токсичного впливу під час деградації імплантованого матеріалу, нами було досліджено тканини печінки та нирок. Дослідження показали, що підшкірна імплантація зразків С2 300 В на 7-му та 31-шу добу не викликала явних патологічних змін в досліджуваних органах.

Морфологічні особливості тканин печінки експериментальних щурів майже не відрізнялися від норми. Печінкова тканина була представлена часточками радіально-балочного типу з міжчасточковими синусоїдними капілярами (рис. 3.22). Гепатоцити, багатогранної форми, розташовані в балках двома рядами та містили ніжно-зернисту еозинофільну цитоплазму, центрально розташоване ядро шаровидної форми з кількома ядерцями. Діаметр гепатоцитів відповідав віковій групі щура. Пухка сполучнотканинна строма складалася з фіброblastів з поодинокими макрофагами та лімфоцитами. Гепатоцити периферичної зони часточок та субкапсулярно розташовані клітини мали овальну форму. У міжчасточковому просторі відзначалися жовчні капіляри з переходом у холангіоли. Синусоїдні капіляри печінки піддослідних щурів мали радіальний характер і розміри у відповідності до вікової групи.

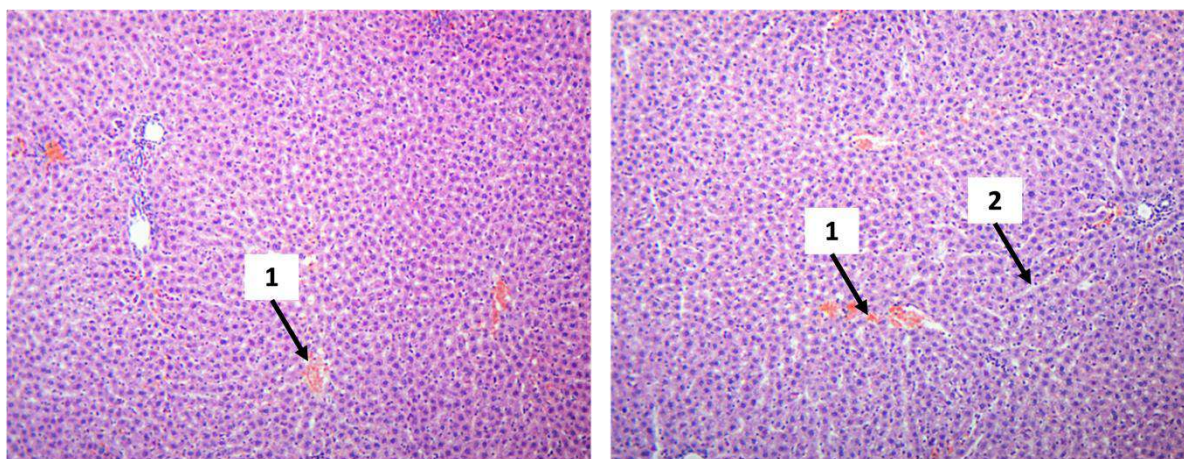


Рисунок 3.22 – Тканина печінки після імплантації зразків С2 300 В у щурів через 7 днів спостереження: 1 – повнокрів'я судин; 2 – слабовиражений набряк. Забарвлення гематоксилін та еозин. Збільшення $\times 100$.

Лише у деяких біоптатах виявлено вогнищеву лімфоцитарну інфільтрацію у ділянці портальних трактів та незначний набряк на 31-шу добу спостереження (рис. 3.23).

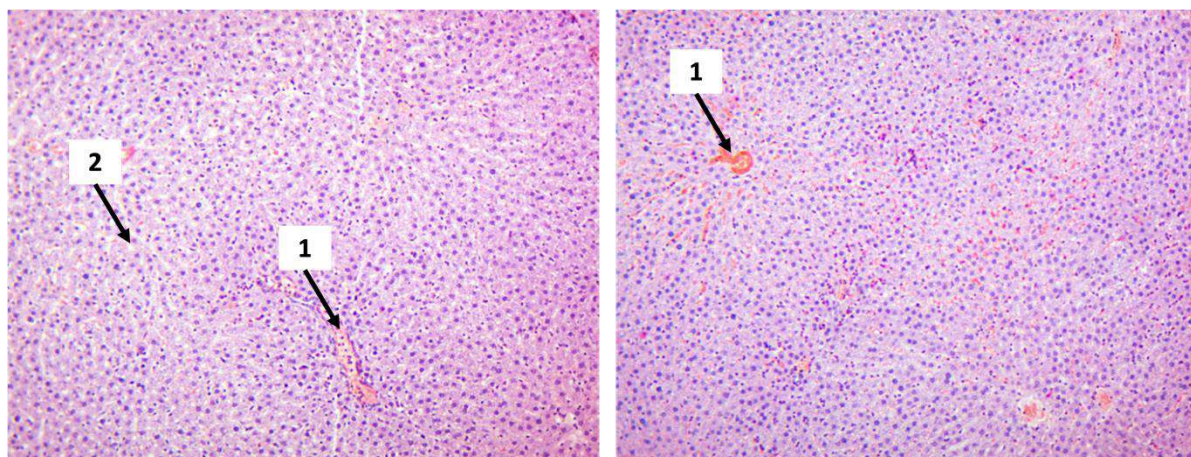


Рисунок 3.23 – Тканина печінки після імплантації зразків С2 300 В у щурів через 31-ну добу спостереження: 1 – повнокрів'я судин; 2 – слабовиражений набряк. Забарвлення гематоксилін та еозин.

Збільшення $\times 100$.

Гістологічне дослідження нирок на 7-му добу показало, типову морфологічну організацію тканини (рис. 3.24). Паренхіма органу представлена клубочками та проксимальними й дистальними нирковими канальцями. Кіркова речовина представлена нирковими тільцями (клубочками) та проксимальними звивистими канальцями без патологічних змін. Ниркові тільця, округлої форми утворені судинними клубочками та капсулами. Мозкова речовина, представлена пірамідою, котра складається з двох шарів та соска. Зовнішній шар, а саме проксимальні, дистальні та збірні канальці без змін.

Середній розмір капілярів канальців, клубочків нефрону та самого нефрону з капсулою мали стандартні розміри у відповідності до вікової групи.

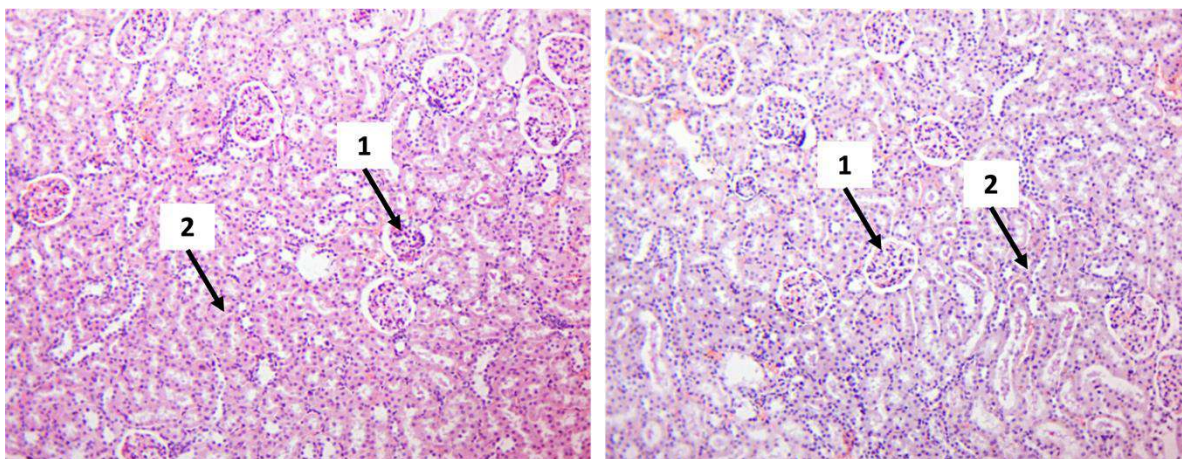


Рисунок 3.24 – Тканина нирки після імплантації зразків С2 300 В у щурів через 7-м діб спостереження: 1 – клубочки нирок; 2 – каналці нирок. Забарвлення гематоксилін та еозин. Збільшення $\times 100$.

Дослідження на 31-шу добу довело відсутність токсичного впливу на ниркову нирковій тканину щурів, котра могла б призвести до патологічних змін після імплантації зразків С2 300 В (рис. 3.25).

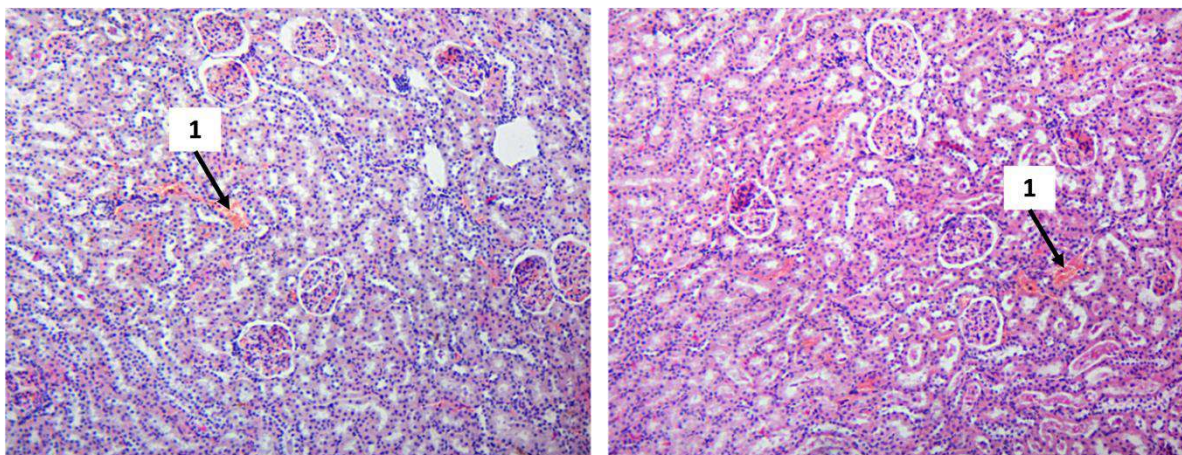


Рисунок 3.25 – Тканина нирки після імплантації зразків С2 300 В у щурів через 31-ну добу спостереження: 1 – повнокрів'я судин. Забарвлення гематоксилін та еозин. Збільшення $\times 100$.

Все вищезазначене вказує на відсутність місцевого, загального прозапального та токсичного впливу імплантованого зразку С2 300 В у щурів як через тиждень (часткова резорбція), так і через місяць спостереження (повна резорбція імплантату).

Група порівняння з немодифікованими зразками Mg загинули в перші дні експериментальних досліджень.

3.3.3 Імунгістохімічне дослідження

Під час імуногістохімічних досліджень піддослідних зразків було встановлено наявність запальних реакцій в прилеглих тканинах навколо імплантованих зразків в обох типах, проте також відзначалася суттєва відмінність в тяжкості реакцій.

Зразки C1 250 В продемонстрували поширеність нейтрофільної інфільтрації, що корелює з кількістю МРО-позитивних клітин (рис. 3.26).

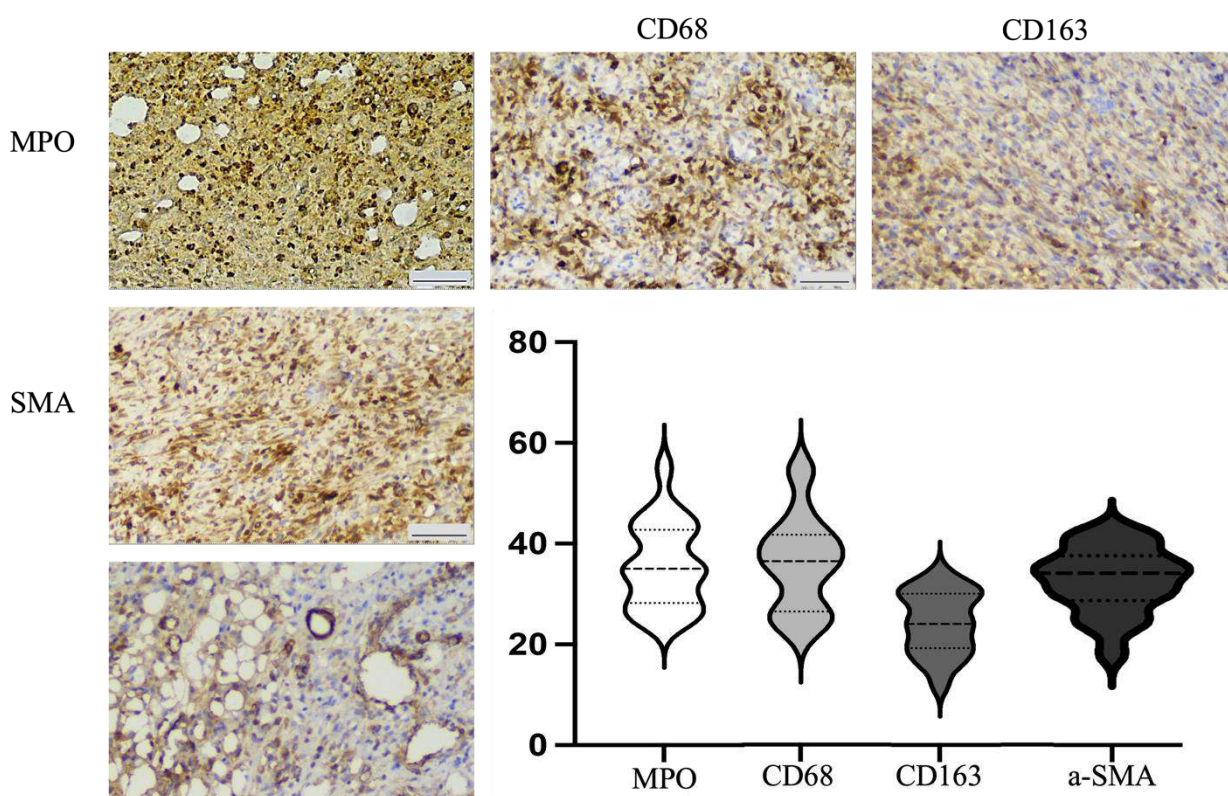


Рисунок 3.26 – Характеристики імунних клітин після імплантації зразків C1 250 В.

Така відповідь супроводжувалася переважанням CD68+ макрофагів, які містять надмірну вагу розсіяних CD163+ клітин ($P < 0,001$). Ці ознаки могли відобразити змінене вирішення запалення, яке підтримувалося слабким

утворенням грануляційної тканини та низькою кількістю дезорганізованих α -SMA-позитивних міофібробластів.

Оцінка реакції м'яких тканин після імплантації зразків C2 300 В виявила значно нижчу кількість клітин MPO+ ($P < 0,001$) і CD68+ ($P = 0,017$), тоді як кількість макрофагів CD163+ збільшилася ($P < 0,001$). Застосування модифікованих зразків C2 300В продемонструвало зниження кількості MPO+ і прозапальних CD68+ клітин. У той же час відзначалася велика щільність α -SMA+ клітин, кількість яких була значно вищою у порівнянні з C1 250 В ($P < 0,001$) (рис. 3.27).

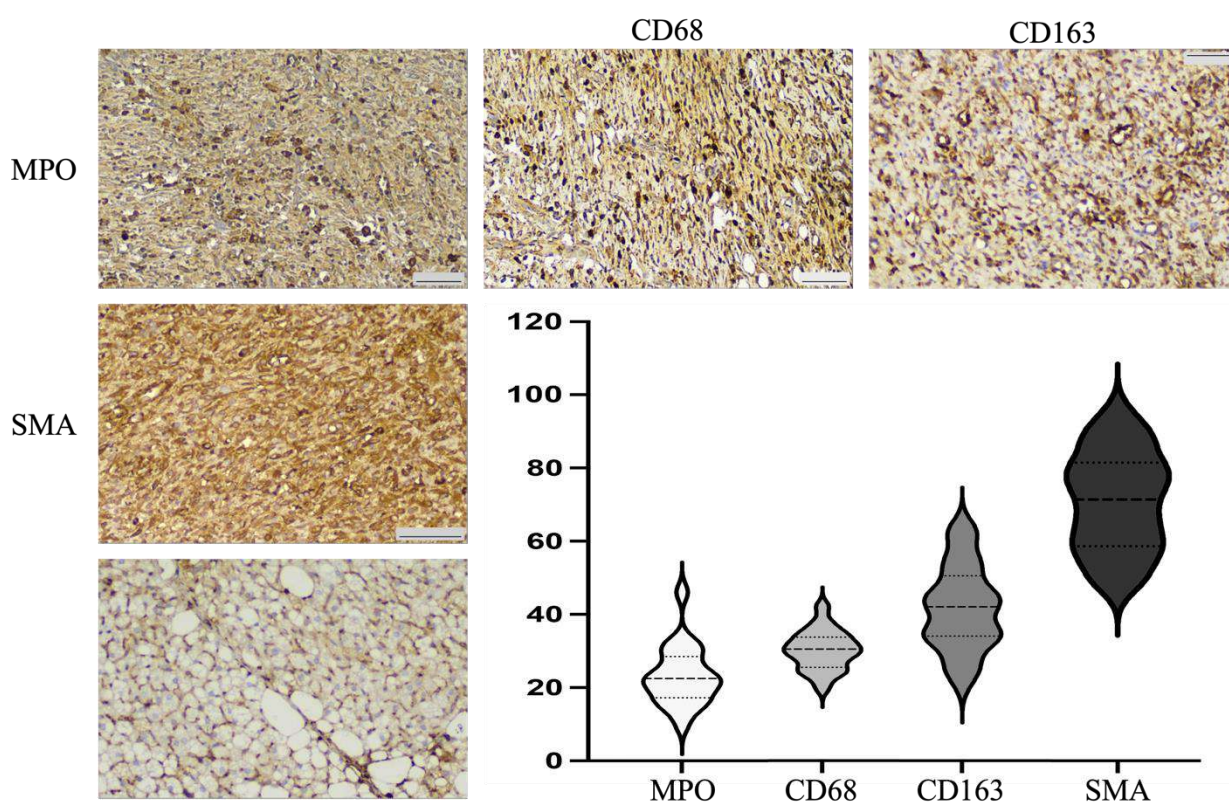


Рисунок 3.27 – Характеристики імунних клітин імплантації зразків C2 300 В.

Також було виявлено велику кількість α -SMA-позитивних клітин. Результати цих досліджень корелювало з добре відомим фактом, що перицити мікросудин є джерелом лінії міофібробластів в умовах відновлення. Застосування модифікованих зразків C2 300 В асоціювалося з поляризацією M2-макрофагів із високою кількістю α -SMA+ клітин.

Основні результати цього розділу опубліковані в працях [141–145].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Реконструкція дефектів кісткових тканин після травм, дефектів після видалення пухлин чи в наслідок руйнування тканин під час інфекційних захворювань становить серйозну проблему для лікарів [146]. Щоб подолати цю проблему, в останні роки проводяться дослідження по створенню біосумісних імплантатів, котрі будуть виконувати роль тимчасових несучих конструкцій, до моменту часткового або повного відновлення пошкодженої кісткової тканини [147,148]. Біодеградуючі полімерні матеріали вивчаються в якості кісткових каркасів та володіють остеоіндуктивними властивостями та біосумістю. Але низька механічна міцність, нестабільна швидкість деградації та імунна відповідь на продукти деградації матеріалу обмежують їх використання в клінічній практиці [149]. Титан є найбільш часто використовуємым металом в імплантології, але даний матеріал потребує повторного хірургічного втручання, що призводить до додаткових страждань пацієнта та можливого інфікування хірургічної області у 33 % випадків [150].

Біодеградуючі метали, маючи в своєму арсеналі чудові біодеградуючі, механічні, остеогенні, біосумісні та антибактеріальні властивості, широко досліджуються для вирішення проблем в імплантології [151]. Магній почали використовувати в медицині з 19-го сторіччя. Він є важливим компонентом людського організму та приймає участь більш ніж у 300 клітинних ферментативних реакціях, мітохондріальній активності, трансляції білків, синтезі ДНК та проліферації клітин. У здорової людини близько 60 % магнію знаходиться в кістковій тканині [152]. Завдяки своїм механічним властивостям, модулю пружності та біобезпеці Mg використовувався на початку 20-го сторіччя, поки його не замінили титаном [153,154].

Дослідження біодеградуємих матеріалів Mg усуває необхідність в повторних операцій по видаленню імплантованого матеріалу та нівелює ризик виникнення супутніх захворювань викликаних оперативними втручаннями.

Магній піддається корозії у фізіологічному середовищі та виділяє іони Mg, H₂ та OH⁻ [148]. Під час досліджень *in vitro* було сказано, що іони Mg позитивно впливають на клітини кісток, підсилюють проліферацію, міграцію, активність лужної фосфатази, підвищують здатність до диференціації остеобластів людини та проліферації стромальних клітин кісткового мозку [155,156]. Концентрація іонів Mg в тканині від 2,5 до 10 ммоль/л позитивно впливають на проліферацію та диференціацію стромальних клітин кісткового мозку [81]. Але більш високі концентрації призводили до зниження здатності до мінералізації та матричним відкладенням стромальних клітин [157,158]. Це пов'язано з високою локальною концентрацією Mg, котра призводила до конкуренції між іонами кальцію та магнію за носії іонів та інгібуванням експресії кальцій-чутливих рецепторів і як наслідок до зниження внутріклітинної концентрації кальцію [157,159].

Дослідження по імплантації Mg не показали негативних наслідків на макроорганізм. Резорбція магнію призводила до підвищених показників концентрацій Mg лише локально та не мала токсичного впливу за рахунок здатності клітин витримувати 16-ти кратне перевищення фізіологічної норми [149]. Дослідження також показали відсутність ефекту накопичення у лімфатичних вузлах та відсутність ризику для здоров'я після імплантації щурам з хронічною нирковою недостатністю [160,161]. Результати досліджень *in vivo* на кроликах показали відсутність впливу на серце, печінку, нирки, селезінку та не викликали кількісних змін у сироватці крові [162,163]. Також, у пацієнтів, котрі перенесли коригуючі ортопедичні операції з використанням магнієвих гвинтів не спостерігались прояви алергічних реакцій, дисфункції печінки і нирок чи підвищення рівня Mg в сироватці крові [164].

На нашу думку, імплантати з магнію є найбільш перспективними кандидатами на роль біодеградуючих імплантатів у тимчасових несучих конструкціях. Незважаючи на велику кількість досліджень, одним з невирішених питань залишається контроль швидкості деградації магнієвих імплантатів.

Під час написання дисертаційної роботи, нами було виготовлені зразки магнію з модифікованою поверхнею, за допомогою плазмової електролітичної оксидації. ПЕО модифікація була обрана за рахунок низки переваг, поміж інших методів модифікацій поверхонь, а саме відсутності погіршень механічних властивостей магнію після модифікації, хорошу корозійну стійкість та екологічність [122].

Отримані зразки мали на своїй поверхні типову пористу структуру з субмікронними порами розмірами до 0,5 мкм та поодинокими порами діаметром від 1 до 5 мкм для розчину С1 та поверхню з розмірами пор від 1 до 5 мкм та поодинокими до 25 мкм у зразків модифікованих у розчині С2. Даний тип структури збільшує активну площу поверхні імплантату. За рахунок пор морфологія поверхні набуває розвиненої структури та збільшується кількість сайтів-зв'язування для адгезії клітино-специфічних структур [165]. Але збільшення загальної площі відкритих пор на модифікованій поверхні може призвести до погіршення корозійної стійкості зразків за рахунок прямої дії на підкладку магнію [166]. На ряду з погіршенням корозійних властивостей зменшується і механічна міцність імплантату. Отже, необхідно дотримуватись балансу між пористістю та корозійною стійкістю і механічною міцністю [167]. Тому, опираючись на дані дослідження, під час модифікації поверхні, за рахунок зміни напруги в бік збільшення, нам вдалося скорегувати площу пористості та зменшити її відсоток відносно загальної поверхні. Відтак, зразок С1 модифікований ПЕО з напругою у 200 В мав площу пор 21 % від загальної поверхні, в той час як зразок С1 при збільшенні напруги до 250 В показав значно нижчі показники які дорівнювали 9 %. У зразків С2 площа пор коливалась від 15 % при напрузі 250 В та 12 % при 300 В відповідно (рис. 4.1).

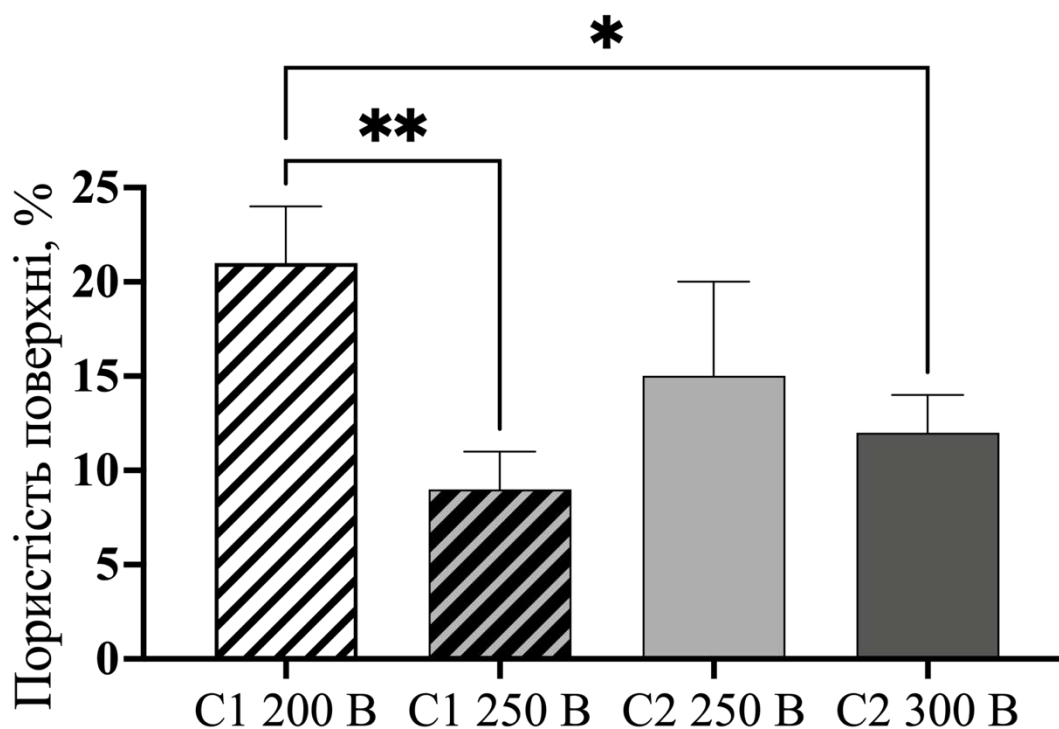


Рисунок 4.1 – Площа пор на поверхні зразків Mg в залежності від напруги під час ПЕО, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

А. Косіjan та ін. стверджують, що ПЕО обробка поверхні магнієвих зразків суттєво зменшує вміст вуглецю та утворює шар MgO, за рахунок чого покращуються корозійна стійкість при збереженні біосумісності у порівнянні з немодифікованим магнієм [168]. Це твердження узгоджується з результатами нашого аналізу зразків за допомогою дослідження поперечного перерізу за допомогою SEM та EDX картографування. Під час дослідження було підтверджено наявність оксидного шару товщиною від $2,06 \pm 0,7$ до $2,09 \pm 0,38$ мкм для зразків C1 та $14,52 \pm 1,8$ мкм у зразків C2.

Дослідження J. Chen та ін. показують, що збільшення шорсткості поверхні магнію пришвидшують швидкість деградації зразків. Також було доведено, що шорсткість не впливає на цитотоксичність в цілому, проте гладка поверхня має негативний характер на адгезію клітин. Судячи з цього, помірно шорстка поверхня демонструє найбільш оптимальні властивості та баланс між корозійною стійкістю та цитосумісністю [169]. Проведені дослідження зразків C1 200 В та 250 В разом з C2 250 В та 300 В підтверджують наявність помірно шорсткої поверхні. Діапазони шорсткості коливалися від 0,39 до 0,43 мкм для

розчину C1 та від 1,17 до 2,10 мкм у розчині C2. Визначені характеристики поверхні мали оптимальні значення Ra та Rz про що в подальшому свідчили тести на біодеградацію та адгезії біологічних структур. Шорсткість поверхні в мікрометровому та субмікрометровому масштабі посилюють диференціювання остаобластів на поверхні та збільшують контакт між кістковою тканиною та імплантатом. Проте низька змочуваність поверхні, може уповільнювати взаємодію [170].

Як стверджують Н. Wong та ін., гідрофільність поверхні імплантатів для відновлення кістки сприяє адгезії та проліферації кісткових клітин, сприяючи подальшому відновленню кісткової тканини [171]. Дослідження отриманих нами зразків показало високогідрофільні властивості для модифікованих поверхонь типу C1 200 В, C1 250 В та C2 250 В. В той час як зразок C2 300 В показав супергідрофільні властивості з кутом контакту 0° . Подальші дослідження підтвердили твердження Н. Wong та ін. щодо адгезії клітин на гідрофільних поверхнях, проте продемонстрували відсутність значущої різниці між високогідрофільними та супергідрофільної покриттями.

Тривають дискусії щодо впливу модифікацій під час плазмової електролітичної оксидації на механічні властивості магнію. Y. Xia та ін. зазначають, що межа міцності та відносне подовження сплаву Mg-4,0Zn-0,2Ca до та після модифікації ПЕО залишилися незмінними [172]. Але, в той же час D. Lee та ін. зазначали погіршення властивостей розтягування для сплаву AZ91D після обробки ПЕО [173]. Незважаючи на результати дослідження авторів, вважається, що розтріскування покриття після модифікації поверхні може вплинути на механічні властивості магнію та його корозійну стійкість. T. Smith стверджував, що зниження міцності металевих підкладок з пористими покриттями є результатом мікрodefектів [174]. Дослідження отриманих зразків шляхом фотолюмінесценції дозволило нам зрозуміти, що використання розчин C2 призводить до утворення більшої кількості структурних дефектів на поверхні у порівнянні зі зразками модифікованими у розчині C1, а підвищення напруги модифікації тільки

збільшує кількість дефектів, що відображаються піками ФЛ у діапазоні від 600 до 800 нм.

Подальші дослідження стійкості до корозії у розчині SBF показали, що швидкість деградації немодифікованих зразків значно вища у порівнянні зі зразками С1 та С2 при довгостроковому зануренні. Найкращі результати по стійкості до деградації показав зразок С2 250 В, в той час як С2 300 В, який мав найбільшу товщину оксидного шару, у порівнянні з іншими зразками, не мав суттєвих переваг, а його відсоток деградації був більшим у порівнянні зі зразком С1 250 В. Дані результати можуть слугувати підтвердженням слів Т. Smith про погіршення фізичних властивостей матеріалу в разі наявності структурних дефектів, в тому числі і стійкості до корозії.

Проаналізувавши результати сканувальної електронної мікроскопії, поперечного перерізу, дослідження фотолюмінесценції та тесту на деградацію можемо зробити припущення, що наявність структурних дефектів на поверхні та загальна пористість поверхні мають вирішальне значення для корозійної стійкості.

Наступним етапом наших досліджень було визначення антибактеріальних властивостей отриманих зразків. Інфекційні ускладнення під час використання імплантатів використання у клінічній практиці є тяжким ускладненням [175]. Зі слів В. Wang та ін., поверхня імплантату є сприятливою для бактеріальної адгезії, колонізації та утворення біоплівки, за рахунок відсутності у імплантату антибактеріальних властивостей, що може призвести до бактеріального інфікування [176]. Під час нашого дослідження, ми виявили, що зразки типу С1 мають здатність до запобігання приєднання вторинної інфекції на початковій стадії імплантації за рахунок наявності антиадгезивних властивостей. Так, утворення біоплівки *S. Aureus* з часом інкубації збільшувалась, проте була наявна велика різниця між зразками С1 та немодифікованим магнієм. Більше того, дослідження показали наявність різниці антиадгезивних властивостей поміж модифікованих зразків на користь типу С1. Також було доведено наявність кореляційних зв'язків між структурою поверхні та антиадгезивних властивостей. При збільшенні

шорсткості та гідрофільності поверхні підвищувалась кількість бактерій за рахунок більш сприятливих умов для колонізації та утворення біоплівки.

Поряд з антибактеріальними характеристиками зразки можуть мати і цитотоксичний ефект, що призведе до місцевої токсичності імплантованого матеріалу та порушення процесів імплантації. Під час визначення токсичності та біосумісності за допомогою культур клітин, контрольні зразки без модифікованої поверхні показали негативні результати адгезії та зниження редукції резазурину протягом всього часу дослідження. Поміж неконтрольованої деградації чистого магнію та зміни рН середовища, N. Wang та ін. стверджують, що магній у великих концентраціях, більше 200 мкг/мл мають токсичний вплив на клітини, в той час як концентрації 100 мкг/мл та нижче підвищували життєздатність клітин аж до 109% в порівнянні з групою негативного контролю [177]. Дані дослідження пояснюють синусоподібний графік для зразків типу С1. По мірі деградації поверхні кількість магнію, котра вивільнялася, сприяла проліферації клітин на 3-тю добу досліджень, але все ж таки мала менші значення у порівнянні зі зразками С2. На 5-ту добу досліджень концентрація магнію у зразках С1 могла досягти критичних значень, більше 200 мкг/мл, в наслідок чого клітинна проліферація зменшилась, на відміну від зразків типу С2, де все ще зберігалися допустимі рівні концентрацій Mg. Слід зазначити, навіть за таких умов, всі типи модифікованих зразків продемонстрували адекватну адгезію та проліферацію клітин та мали значно кращі показники у порівнянні з немодифікованим магнієм.

Під час *in vivo* досліджень на лабораторних щурах, відібрані зразки С1 250 В та С2 300 В показали протилежні результати. Уже на 7-му добу експерименту зразки С1 250 В продемонстрували запальні та деструктивно-некротичні зміни в оточуючих тканинах, обмежених сполучною тканиною. А у прилеглий фіброзно-жировій тканині була виявлена інтенсивно-змішано-клітинна запальна інфільтрація. В цей час зразки С3 300 В у фіброзно-жировій тканині вогнищеву лімфо-гістіоцитарну інфільтрацію,

незначне розростання грануляційної тканини та незначні крововиливи, що можна пояснити наслідками пошкоджень тканин під час імплантації.

Токсичного впливу зразків С1 250 В зазнали не тільки прилеглі тканини але і органи. Так, в печінці піддослідного щура з імплантованим зразком С1 250 В були наявні ознаки токсичного гепатиту. Нирки мали подібні ураження за рахунок токсичного впливу, відмічалися ознаки токсичного тубуло-інтерстиційного нефриту. На відміну від зразків 1-ої групи, зразки С2 300 В були позбавлені токсичного впливу на органи-мішені щурів. Також слід зазначити, що щури групи порівняння загинули в перші дні досліджень, а тварини з 1-ої групи, загинули до настання 2-го терміну забору гістологічного матеріалу на 31-шу добу експерименту.

Тканини щурів другої групи С2 300 В на 31-шу добу не проявляли жодної запальної реакції та несумісності тканин на поділі тканина-імплантат. Гістологічні дослідження нирок та печінки піддослідних щурів показали відсутність патологічних змін та морфологічно майже не відрізнялись від норми.

Інші вчені, такі як W. Ma та ін. стверджують, що під час їх експерименту *in vivo* токсичний вплив був відсутній не тільки для зразків модифікованих шляхом плазмової електролітичної оксидації але і для зрізків не модифікованого магнію. Твердження про відсутність токсичного впливу чистого магнію в області імплантації та на досліджувані органи, такі як нирки, печінка, серце у порівнянь з отриманими нами результатами досліджень можуть бути наслідком різниці співвідношення розмірів, площі та ваги імплантату до макроорганізму, місця імплантації та моделі тварини, а саме використання кроликів [178].

Під час оцінки результатів ІГХ було встановлена наявність запальних реакцій в обох групах зразків, проте тяжкість цих реакцій суттєво відрізнялася. Зразки С1 250 В продемонстрували більші значення мієлопероксидази у порівнянні зі зразками С2 300 В, що може свідчити про антибактеріальні властивості зразків за рахунок утворення оксидативних сполук, включаючи гіпохлоритну кислоту, яка є потужним антимікробним агентом. Також

відзначалася перевага CD68+ макрофагів котрі виробляють та вивільняють протизапальні фактори, такі як цитокіни (наприклад, інтерлейкін-10), які сприяють контролю запалення і знижують його інтенсивність. Це допомагає відновленню тканин та розвитку загоюючого середовища, а можливість продукування факторів росту епідермальних клітин та фібробластового фактору росту вказують на позитивну клітинну проліферацію, міграцію та ремоделювання тканин.

На відміну від зразків першого типу, зразки C2 300 В асоціювалися з поляризацією M2-макрофагів і підвищеною кількістю α -SMA+ клітин. Альтернативно активовані макрофаги мають можливість не тільки продукувати інтерлейкін-10 (IL-10), а й бета-трансформуючий фактор росту (TGF- β), що в свою чергу сприяє зниженню запалення та модулює відповідь імунної системи, сприяючи відновленню тканин. При цьому продукція васкулярного ендотеліального фактору росту (VEGF) CD163-позитивними M2 макрофагами сприяє регенерації тканин та розвитку нових кровоносних судин, а також можливість виробляти матричні металопротеази, які розщеплюють екстрацелюлярну матрицю та сприяють розпаду рубців.

Збільшення альфа-гладкого м'язового актиніну, у порівнянні зі зразками C1 200 В, свідчить про регуляцію запального процесу внаслідок впливу на активацію та міграцію запальних клітин, а також на синтез запальних медіаторів та активації фібробластів, що відповідають за синтез колагену та інших компонентів екстрацелюлярного матриксу. Це сприяє формуванню нової екстрацелюлярної матриці та зміцненню ранової тканини.

Опираючись на результати досліджень Z. Zheng та ін., та аналіз отримані нами результатів можемо зробити висновки, що магній має вплив на імунну систему, спонукаючи її до поляризації макрофагів до стадії M2 і інгібуючи їх перехід до стадії M1, а середовище, збагачене магнієм, помітно зменшує запальні процеси та додатково оптимізує відновлення тканин сприяючи проліферації клітин, остеогенезу та неоваскуляризації [179].

Основні результати цього розділу опубліковані в працях [142,143,145,180].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені теоретичні узагальнення та нові результати, які вирішують наукову задачу, суть якої полягає у створенні нової поверхні біодеградуючих металевих імплантатів, встановлення їх фізико-хімічних властивостей, оцінки біосумісності та взаємодію сполучної тканини з модифікованою поверхнею.

1. Під час досліджень створена технологія модифікації поверхонь біодеградуючих металевих зразків за допомогою плазмової електролітичної оксидації. Визначення структурних та фізико-хімічних особливостей поверхні продемонструвало здатність отримати оксидний шар товщиною від $2,06 \pm 0,7$ до $14,52 \pm 1,8$ мкм з рівномірним розподілом пор. Дослідження поверхні дало зрозуміти, що підвищення напруги під час ПЕО зменшує загальну пористість поверхні та підвищує гідрофільні властивості. Так з підвищенням напруги на 50 В у випадку використання електроліту С1 загальна пористість зменшилась з 21 % до 9 %. В цей же час зразки модифіковані в електроліті С2 зменшили свою пористість з 15 % до 12 % та продемонстрували супергідрофільну поверхню, значення якої досягли 0° .

2. Детальний аналіз отриманих результатів на визначення токсичності та біосумісності з використанням культур клітин показали адекватну клітинну адгезію без істотної різниці між зразками С1 та С2, на відміну від контрольної групи, котрі продемонстрували відсутність прикріплення клітин U2OS до поверхні. На 3-5 день досліджень з використанням культур клітин, була встановлена позитивна динаміка клітинної проліферації для зразків типу С2, значення якої доходили до $83,8 \pm 7,4$ %, в той час як зразки типу С1 демонстрували менші значення редукції резазурину. В ході експерименту, на 5 день, було встановлено, що зразки типу С1 мають нижчі показники проліферації клітин у порівнянні зі зразками С2, але перевищували значення для контрольної групи ($p < 0,05$).

3. Порівняльний аналіз отриманих зразків показав, що покриття типу С2 забезпечувало поступове та швидше зростання кількості бактерій на поверхні ніж на покриттях типу С1, але в той же час значення були нижчими в

середньому на 25,8% ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контрольною групою. Так зразок С1 200 В після 24 годин інкубації продемонстрував зниження росту колоній у порівнянні з іншими модифікованими за допомогою ПЕО та контрольними зразками ($p < 0,0005$).

4. Модифіковані зразки, на відміну від контрольної групи, мали значно нижчий відсоток корозії в умовах тесту з SBF. Так, починаючи з 21 дня тесту була відмічена суттєва різниця в ступені деградації між модифікованими зразками та групою контролю, що проявлялася у відсотку втрати ваги та мали достовірні значення ($p < 0,05$). Також в ході експерименту було встановлено, що найнижчі значення втрати ваги $2,85 \pm 0,084 \%$ на 42 день і $4,88 \pm 0,098 \%$ на 63 день були у зразків С2 250 В. Слід відмітити, що втрата ваги чистого магнію, на 63 день досліджень майже у 2 рази перевищувала показники експериментальних груп.

5. На 7 день досліджень після підшкірної імплантації відмічається наявність виражених запальних та деструктивно-некротичних змін у прилеглих до імплантату тканин з ділянками крововиливів для зразків типу С1 250 В (з переважанням нейтрофільної інфільтрації у вигляді CD68+ макрофагів, які містили розсіяні CD163+ клітини ($P < 0,001$)). Також токсичного впливу зазнали і органи-мішені, такі як печінка та нирки. При цьому зразки С2 300 В мали лише окремі ділянки розростання грануляційної тканини та дрібні перифокальні крововиливи, що може бути наслідками механічних пошкоджень в ході імплантацій. А аналіз реакції тканин після імплантації зразків виявив значно нижчу кількість клітин MPO+ ($P < 0,001$) і CD68+ ($P = 0,017$), в той час як кількість макрофагів CD163+ збільшилася ($P < 0,001$). Отриманий матеріал на 31-добу досліджень демонстрував незначні ділянки розростання сполучної тканини та окремі вогнища грануляційної тканини на завершальному етапі дозрівання. Запальних реакцій навколо імплантату не спостерігалось, як і наявності токсичного впливу на печінку та нирки.

6. Узагальнення результатів досліджень з використанням різних методів, включаючи структурний, фізико-хімічний та біологічний аналіз, а також вивчення ефективності використання зразків з модифікованим

покриттям, розроблених за допомогою ПЕО, продемонстрував очевидну перевагу зразків типу C2 300 В, які отримані в електроліті $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{NH}_4\text{F} + \text{Ca}(\text{OH})_2$. Застосовуючи різні параметри та електроліти під час плазмової електролітичної оксидації, можна отримати імплантати призначені для використання в якості тимчасових металоконструкцій з контрольованим часом деградації. Дані зразки мають пористу поверхню, виражену гідрофільність та антибактеріальні властивості, а стимуляція проліферацій клітин і активна поверхня для взаємодії з клітинами дає необхідні дані для розробки нових імплантатів для медичного використання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fu R, Feng Y, Bertrand D, Du T, Liu Y, Willie BM, et al. Enhancing the Efficiency of Distraction Osteogenesis through Rate-Varying Distraction: A Computational Study. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Oct 29;22(21):11734. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11734>
2. Fu R, Feng Y, Liu Y, Willie BM, Yang H. The combined effects of dynamization time and degree on bone healing. *J Orthop Res* [Internet]. 2022 Mar 3;40(3):634–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.25060>
3. Shuai C, Li S, Peng S, Feng P, Lai Y, Gao C. Biodegradable metallic bone implants. *Mater Chem Front* [Internet]. 2019;3(4):544–62. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8QM00507A>
4. Tucker A. Management of common upper limb fractures in adults. *Surg* [Internet]. 2022 Mar;40(3):184–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931921002696>
5. Fu R, Feng Y, Liu Y, Yang H. Mechanical regulation of bone regeneration during distraction osteogenesis. *Med Nov Technol Devices* [Internet]. 2021 Sep;11:100077. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590093521000217>
6. Fu R, Bertrand D, Wang J, Kavaseri K, Feng Y, Du T, et al. In vivo and in silico monitoring bone regeneration during distraction osteogenesis of the mouse femur. *Comput Methods Programs Biomed* [Internet]. 2022 Apr;216:106679. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169260722000645>
7. Stiffler KS. Internal fracture fixation. *Clin Tech Small Anim Pract* [Internet]. 2004 Aug;19(3):105–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096286704000532>
8. Manam NS, Harun WSW, Shri DNA, Ghani SAC, Kurniawan T, Ismail MH, et al. Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review. *J Alloys Compd* [Internet]. 2017 Apr;701:698–715. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092583881730230X>

9. Okazaki Y, Katsuda S ichi. Biological Safety Evaluation and Surface Modification of Biocompatible Ti–15Zr–4Nb Alloy. *Materials (Basel)* [Internet]. 2021 Feb 4;14(4):731. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/4/731>
10. Iatecola A, Longhitano GA, Antunes LHM, Jardini AL, Miguel E de C, Béréš M, et al. Osseointegration Improvement of Co-Cr-Mo Alloy Produced by Additive Manufacturing. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 May 14;13(5):724. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/5/724>
11. Hasiak M, Sobieszczkańska B, Łaszcz A, Biały M, Chęcmanowski J, Zatoński T, et al. Production, Mechanical Properties and Biomedical Characterization of ZrTi-Based Bulk Metallic Glasses in Comparison with 316L Stainless Steel and Ti6Al4V Alloy. *Materials (Basel)* [Internet]. 2021 Dec 29;15(1):252. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/1/252>
12. Kabir H, Munir K, Wen C, Li Y. Recent research and progress of biodegradable zinc alloys and composites for biomedical applications: Biomechanical and biocorrosion perspectives. *Bioact Mater* [Internet]. 2021 Mar;6(3):836–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X20302334>
13. Wang J, Xu J, Hopkins C, Chow DH, Qin L. Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics—A General Review and Perspectives. *Adv Sci* [Internet]. 2020 Apr 28;7(8):1902443. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.201902443>
14. Witte F, Hort N, Vogt C, Cohen S, Kainer KU, Willumeit R, et al. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater Sci* [Internet]. 2008 Oct;12(5–6):63–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028609000357>
15. Jang HY, Shin JY, Oh SH, Byun JH, Lee JH. PCL/HA Hybrid Microspheres for Effective Osteogenic Differentiation and Bone Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng* [Internet]. 2020 Sep 14;6(9):5172–80. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.0c00550>
16. Yifeng Z, Xu J, Ruan YC. Implant-derived magnesium induces local neuronal

- production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nat Med* [Internet]. 2016;22:1160–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.4162?spm=smwp.content.content.2.1536710400036hOtrcXw>
17. Yan W, Lian YJ, Zhang ZY, Zeng MQ, Zhang ZQ, Yin ZZ, et al. In vitro degradation of pure magnesium—the synergetic influences of glucose and albumin. *Bioact Mater* [Internet]. 2020 Jun;5(2):318–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X20300384>
 18. Zhang ZQ, Wang L, Zeng MQ, Zeng RC, Kannan MB, Lin CG, et al. Biodegradation behavior of micro-arc oxidation coating on magnesium alloy—from a protein perspective. *Bioact Mater* [Internet]. 2020 Jun;5(2):398–409. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X20300451>
 19. Chen Y, Dou J, Yu H, Chen C. Degradable magnesium-based alloys for biomedical applications: The role of critical alloying elements. *J Biomater Appl* [Internet]. 2019 May 9;33(10):1348–72. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0885328219834656>
 20. Zhang E, Shen F. Blood compatibility of a ferulic acid (FA)-eluting PHBHHx system for biodegradable magnesium stent application. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2015 Jul;52:37–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115002362>
 21. Zhao D, Witte F, Lu F, Wang J, Li J, Qin L. Current status on clinical applications of magnesium-based orthopaedic implants: A review from clinical translational perspective. *Biomaterials* [Internet]. 2017 Jan;112:287–302. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961216305580>
 22. SALLEH EM, ZUHAILAWATI H, RAMAKRISHNAN S. Synthesis of biodegradable Mg-Zn alloy by mechanical alloying: Statistical prediction of elastic modulus and mass loss using fractional factorial design. *Trans Nonferrous Met Soc China* [Internet]. 2018 Apr;28(4):687–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1003632618647016>

23. Homayun B, Afshar A. Microstructure, mechanical properties, corrosion behavior and cytotoxicity of Mg–Zn–Al–Ca alloys as biodegradable materials. *J Alloys Compd* [Internet]. 2014 Sep;607:1–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092583881400872X>
24. Zeng R, Dietzel W, Witte F, Hort N, Blawert C. Progress and Challenge for Magnesium Alloys as Biomaterials. *Adv Eng Mater* [Internet]. 2008 Aug;10(8):B3–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adem.200800035>
25. Salahshoor M, Guo Y. Biodegradable Orthopedic Magnesium-Calcium (MgCa) Alloys, Processing, and Corrosion Performance. *Materials* (Basel) [Internet]. 2012 Jan 9;5(12):135–55. Available from: <http://www.mdpi.com/1996-1944/5/1/135>
26. Vojtěch D, Kubásek J, Šerák J, Novák P. Mechanical and corrosion properties of newly developed biodegradable Zn-based alloys for bone fixation. *Acta Biomater* [Internet]. 2011 Sep;7(9):3515–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111002017>
27. Xiong X, Yang Y, Li J, Li M, Peng J, Wen C, et al. Research on the microstructure and properties of a multi-pass friction stir processed 6061Al coating for AZ31 Mg alloy. *J Magnes Alloy* [Internet]. 2019 Dec;7(4):696–706. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213956719300751>
28. Mhaede M, Pastorek F, Hadzima B. Influence of shot peening on corrosion properties of biocompatible magnesium alloy AZ31 coated by dicalcium phosphate dihydrate (DCPD). *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2014 Jun;39:330–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493114001489>
29. Guo Y, Zhang Y, Li Z, Wei S, Zhang T, Yang L, et al. Microstructure and properties of in-situ synthesized ZrC-Al₃Zr reinforced composite coating on AZ91D magnesium alloy by laser cladding. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2018 Jan;334:471–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897217312240>

30. Mao L, Yuan G, Niu J, Zong Y, Ding W. In vitro degradation behavior and biocompatibility of Mg–Nd–Zn–Zr alloy by hydrofluoric acid treatment. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2013 Jan;33(1):242–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493112004134>
31. Xue D, Yun Y, Schulz MJ, Shanov V. Corrosion protection of biodegradable magnesium implants using anodization. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2011 Mar;31(2):215–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493110002122>
32. Yang X, Li M, Lin X, Tan L, Lan G, Li L, et al. Enhanced in vitro biocompatibility/bioactivity of biodegradable Mg–Zn–Zr alloy by micro-arc oxidation coating contained Mg₂SiO₄. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2013 Oct;233:65–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897213001473>
33. Wang S, Liu X, Yin X, Du N. Influence of electrolyte components on the microstructure and growth mechanism of plasma electrolytic oxidation coatings on 1060 aluminum alloy. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2020 Jan;381:125214. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897219312046>
34. Li Y, Shi Y. Microhardness, wear resistance, and corrosion resistance of AlxCrFeCoNiCu high-entropy alloy coatings on aluminum by laser cladding. *Opt Laser Technol* [Internet]. 2021 Feb;134:106632. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0030399220312652>
35. Egorkin VS, Gnedenkov SV, Sinebryukhov SL, Vyaliy IE, Gnedenkov AS, Chizhikov RG. Increasing thickness and protective properties of PEO-coatings on aluminum alloy. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2018 Jan;334:29–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897217311623>
36. Westerman RW, Scammell BE. Principles of bone and joint injuries and their healing. *Surg* [Internet]. 2012 Feb;30(2):54–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931911002444>
37. Liu C, Wan P, Tan LL, Wang K, Yang K. Preclinical investigation of an

- innovative magnesium-based bone graft substitute for potential orthopaedic applications. *J Orthop Transl* [Internet]. 2014 Jul;2(3):139–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214031X14000497>
38. Lee JY, Han G, Kim YC, Byun JY, Jang J il, Seok HK, et al. Effects of impurities on the biodegradation behavior of pure magnesium. *Met Mater Int* [Internet]. 2009 Dec 26;15(6):955–61. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12540-009-0955-1>
 39. World Health Organization. Global status report on road safety 2018. 2018;424. Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1164010/retrieve>
 40. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. Tanner KE, Dalby MJ, editors. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med* [Internet]. 2010 Dec 29;224(12):1329–43. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1243/09544119JEIM770>
 41. Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury*. 2011;42(SUPPL. 2).
 42. Van Der Stok J, Van Lieshout EMM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands - A systematic literature review. *Acta Biomater*. 2011;7(2):739–50.
 43. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. 61010-1 © Iec2001. 2014;2014:13.
 44. Svedman C, Möller H, Gruvberger B, Gustavsson CG, Dahlin J, Persson L, et al. Implants and contact allergy: are sensitizing metals released as haptens from coronary stents? *Contact Dermatitis* [Internet]. 2014 Aug;71(2):92–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cod.12242>
 45. Service USPH, Services H. ICCVAM Test Method Evaluation Report on Using the Murine Local Lymph Node Assay for Testing Pesticide Formulations , Metals , Substances in Aqueous Solutions , and Other Products Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative

- Methods . Natl Inst Environ Heal Sci Natl Institutes Heal US Public Heal Serv
Dep Heal Hum Serv. 2010;NIH Public(10).
46. Moran CJ, Ramesh A, Brama PAJ, O'Byrne JM, O'Brien FJ, Levingstone TJ. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J Exp Orthop* [Internet]. 2016 Dec 6;3(1):1. Available from: <http://www.jeo-esska.com/content/3/1/1>
 47. Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, Wimmer MA, Holinka M. Osteolysis around total knee arthroplasty: A review of pathogenetic mechanisms. *Acta Biomater* [Internet]. 2013 Sep;9(9):8046–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113002377>
 48. Annangi B, Bonassi S, Marcos R, Hernández A. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mutat Res Mutat Res* [Internet]. 2016 Oct;770:140–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574216300187>
 49. Administration USF& D. Biological Responses to Metal Implants. 2019;149. Available from: <https://www.fda.gov/media/131150/download>
 50. OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test [Internet]. OECD; 2020. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en
 51. OECD. Test No. 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene [Internet]. OECD; 2016. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-490-in-vitro-mammalian-cell-gene-mutation-tests-using-the-thymidine-kinase-gene_9789264264908-en
 52. OECD. Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test [Internet]. OECD; 2016. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosomal-aberration-test_9789264264649-en

53. OECD. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test [Internet]. OECD; 2016. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en
54. Standardization IO for. Tests for systemic toxicity. Biol Eval Med devices. 2006;Part 11(ISO 10993-11:2006).
55. USP. Pyrogen Test. United States Pharmacop (Rockville, Maryland). 2017;
56. Kamrani S, Fleck C. Biodegradable magnesium alloys as temporary orthopaedic implants: a review. *BioMetals* [Internet]. 2019 Apr 18;32(2):185–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10534-019-00170-y>
57. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials* [Internet]. 2006 Mar;27(9):1728–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205009014>
58. Walker J, Shadanbaz S, Woodfield TBF, Staiger MP, Dias GJ. Magnesium biomaterials for orthopedic application: A review from a biological perspective. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* [Internet]. 2014 Aug;102(6):1316–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.33113>
59. Song GL. Corrosion of Magnesium Alloys. Woodhead Publ Cambridge, UK. 2011;
60. Bostman OM. Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants. *J Bone Jt Surg - Ser B* [Internet]. 1991 Jul;73(4):679–82. Available from: <https://online.boneandjoint.org.uk/doi/10.1302/0301-620X.73B4.1649195>
61. Cheung HY, Lau KT, Lu TP, Hui D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Compos Part B Eng* [Internet]. 2007 Apr;38(3):291–300. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359836806001235>
62. Neves NM, Kouyumdzhiev A, Reis RL. The morphology, mechanical properties and ageing behavior of porous injection molded starch-based blends

- for tissue engineering scaffolding. *Mater Sci Eng C*. 2005;25(2):195–200.
63. Moravej M, Mantovani D. Biodegradable Metals for Cardiovascular Stent Application: Interests and New Opportunities. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2011 Jun 29;12(7):4250–70. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/7/4250>
64. Liu Y, Zheng Y, Chen X, Yang J, Pan H, Chen D, et al. Fundamental Theory of Biodegradable Metals—Definition, Criteria, and Design. *Adv Funct Mater* [Internet]. 2019 May 25;29(18):1805402. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adfm.201805402>
65. Pogorielov M, Husak E, Solodivnik A, Zhdanov S. Magnesium-based biodegradable alloys: Degradation, application, and alloying elements. *Interv Med Appl Sci* [Internet]. 2017 Mar;9(1):27–38. Available from: <https://akjournals.com/doi/10.1556/1646.9.2017.1.04>
66. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* [Internet]. 2007 Aug;32(8–9):762–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670007000664>
67. Li H, Zheng Y, Qin L. Progress of biodegradable metals. *Prog Nat Sci Mater Int* [Internet]. 2014 Oct;24(5):414–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007114001178>
68. Peuster M. A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal---results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart* [Internet]. 2001 Nov 1;86(5):563–9. Available from: <https://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/heart.86.5.563>
69. Zhu D, Su Y, Young ML, Ma J, Zheng Y, Tang L. Biological Responses and Mechanisms of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Zn and Mg Biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 2017 Aug 23;9(33):27453–61. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.7b06654>
70. Ma J, Zhao N, Zhu D. Endothelial Cellular Responses to Biodegradable Metal Zinc. *ACS Biomater Sci Eng* [Internet]. 2015 Nov 9;1(11):1174–82. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.5b00319>

71. Murni NS, Dambatta MS, Yeap SK, Froemming GRA, Hermawan H. Cytotoxicity evaluation of biodegradable Zn–3Mg alloy toward normal human osteoblast cells. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2015 Apr;49:560–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115000661>
72. Sanchez AHM, Luthringer BJC, Feyerabend F, Willumeit R. Mg and Mg alloys: How comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review. *Acta Biomater* [Internet]. 2015 Feb;13:16–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706114005510>
73. Al Alawi AM, Majoni SW, Falhammar H. Magnesium and Human Health: Perspectives and Research Directions. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2018;2018:1–17. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ije/2018/9041694/>
74. Romani AMP. Cellular magnesium homeostasis. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2011 Aug;512(1):1–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986111001822>
75. de Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiol Rev* [Internet]. 2015 Jan;95(1):1–46. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00012.2014>
76. Jahnen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clin Kidney J* [Internet]. 2012 Feb 1;5(Suppl 1):i3–14. Available from: <https://academic.oup.com/ckj/article-lookup/doi/10.1093/ndtplus/sfr163>
77. Razzaque M. Magnesium: Are We Consuming Enough? *Nutrients* [Internet]. 2018 Dec 2;10(12):1863. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/12/1863>
78. Yamanaka R, Shindo Y, Oka K. Magnesium Is a Key Player in Neuronal Maturation and Neuropathology. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jul 12;20(14):3439. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/14/3439>
79. Hänzi AC, Gerber I, Schinhammer M, Löffler JF, Uggowitzer PJ. On the in vitro and in vivo degradation performance and biological response of new

- biodegradable Mg–Y–Zn alloys☆. *Acta Biomater* [Internet]. 2010 May;6(5):1824–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706109004437>
80. Wolf F. Chemistry and biochemistry of magnesium. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2003 Feb 6;24(1–3):3–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299702000870>
81. Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A, Sfeir C. Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomater* [Internet]. 2014 Jun;10(6):2834–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706114000543>
82. Ciosek Ź, Kot K, Kosik-Bogacka D, Łanocha-Arendarczyk N, Rotter I. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules* [Internet]. 2021 Mar 28;11(4):506. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/4/506>
83. Belluci MM, de Molon RS, Rossa Jr C, Tetradis S, Giro G, Cerri PS, et al. Severe magnesium deficiency compromises systemic bone mineral density and aggravates inflammatory bone resorption. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2020 Mar;77:108301. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095528631930587X>
84. Xie H, Cui Z, Wang L, Xia Z, Hu Y, Xian L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. *Nat Med* [Internet]. 2014 Nov 5;20(11):1270–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.3668>
85. Zhai Z, Qu X, Li H, Yang K, Wan P, Tan L, et al. The effect of metallic magnesium degradation products on osteoclast-induced osteolysis and attenuation of NF-κB and NFATc1 signaling. *Biomaterials* [Internet]. 2014 Aug;35(24):6299–310. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214004426>
86. Li Z, Meyers CA, Chang L, Lee S, Li Z, Tomlinson R, et al. Fracture repair

- requires TrkA signaling by skeletal sensory nerves. *J Clin Invest* [Internet]. 2019 Oct 22;129(12):5137–50. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/128428>
87. Zhang Y, Xu J, Ruan YC, Yu MK, O’Laughlin M, Wise H, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nat Med* [Internet]. 2016 Oct 29;22(10):1160–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.4162>
88. Michailova AP, Belik ME, McCulloch AD. Effects of Magnesium on Cardiac Excitation-Contraction Coupling. *J Am Coll Nutr* [Internet]. 2004 Oct;23(5):514S-517S. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2004.10719392>
89. Teragawa H, Matsuura H, Chayama K, Oshima T. Mechanisms responsible for vasodilation upon magnesium infusion in vivo: clinical evidence. *Magnes Res* [Internet]. 2002 Dec;15(3–4):241–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12635879>
90. Komaki F, Akiyama T, Yamazaki T, Kitagawa H, Nosaka S, Shirai M. Effects of intravenous magnesium infusion on in vivo release of acetylcholine and catecholamine in rat adrenal medulla. *Auton Neurosci* [Internet]. 2013 Oct;177(2):123–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566070213000647>
91. Amin M, Abdel-Fattah M, Zaghoul SS. Magnesium concentration in acute asthmatic children. *Iran J Pediatr* [Internet]. 2012 Dec;22(4):463–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23429727>
92. Gumus A, Hazirolu M, Gunes Y. Association of Serum Magnesium Levels with Frequency of Acute Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Prospective Study. *Pulm Med* [Internet]. 2014;2014:1–5. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/pm/2014/329476/>
93. Hashim Ali Hussein S, Nielsen LP, Konow Bøgebjerg Dolberg M, Dahl R. Serum magnesium and not vitamin D is associated with better QoL in COPD: A cross-sectional study. *Respir Med* [Internet]. 2015 Jun;109(6):727–33. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611115001043>
94. Witte F. Reprint of: The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomater* [Internet]. 2015 Sep;23:S28–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174270611500313X>
 95. Verbrugge J. Le matériel métallique résorbable en chirurgie osseuse. *Press Med* 23. 1934;460–5.
 96. SEELIG MG. A STUDY OF MAGNESIUM WIRE AS AN ABSORBABLE SUTURE AND LIGATURE MATERIAL. *Arch Surg* [Internet]. 1924 Mar 1;8(2):669. Available from: <http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archsurg.1924.01120050210011>
 97. Troitskii V.V. TDN. The resorbing metallic alloy ‘Osteosinthezit’ as material for fastening broken bone. *Khirurgiia* 8. 1944;41–4.
 98. Borodkin V.S., Savitsky .E, Sivash K.M., Stroganov G.B., Terekhova V., Tikhova N.M. VMV. Magnesium-base alloys for use in bone surgery. US Pat No 3687135A. 1972;
 99. Persaud-Sharma D, McGoron A. Biodegradable Magnesium Alloys: A Review of Material Development and Applications. *J Biomimetics, Biomater Tissue Eng* [Internet]. 2012 Feb;12:25–39. Available from: <https://www.scientific.net/JBBTE.12.25>
 100. Song G, Atrens A. Understanding Magnesium Corrosion—A Framework for Improved Alloy Performance. *Adv Eng Mater* [Internet]. 2003 Dec 30;5(12):837–58. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adem.200310405>
 101. Virtanen S. Biodegradable Mg and Mg alloys: Corrosion and biocompatibility. *Mater Sci Eng B* [Internet]. 2011 Dec;176(20):1600–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921510711002364>
 102. Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* [Internet]. 2005 Jun;26(17):3557–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961204008762>

103. Atrens A, Johnston S, Shi Z, Dargusch MS. Viewpoint - Understanding Mg corrosion in the body for biodegradable medical implants. *Scr Mater* [Internet]. 2018 Sep;154:92–100. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359646218303154>
104. Agarwal S, Curtin J, Duffy B, Jaiswal S. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2016 Nov;68:948–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116305902>
105. Zivić F, Grujović N, Manivasagam G, Richard C, Landoulsi J, Petrović V. The potential of magnesium alloys as bioabsorbable / biodegradable implants for biomedical applications. *Tribol Ind* [Internet]. 2014;36(1):67–73. Available from: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84896974238&origin=inward>
106. Sezer N, Evis Z, Kayhan SM, Tahmasebifar A, Koç M. Review of magnesium-based biomaterials and their applications. *J Magnes Alloy* [Internet]. 2018 Mar;6(1):23–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213956718300100>
107. Lee YC, Dahle AK, StJohn DH. Grain Refinement of Magnesium. In: *Essential Readings in Magnesium Technology*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 247–54.
108. Liu SF, Li B, Wang XH, Su W, Han H. Refinement effect of cerium, calcium and strontium in AZ91 magnesium alloy. *J Mater Process Technol*. 2009 Apr;209(8):3999–4004.
109. Campo R del, Savoini B, Muñoz A, Monge MA, Garcés G. Mechanical properties and corrosion behavior of Mg–HAP composites. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Nov;39:238–46.
110. Wong WLE, Karthik S, Gupta M. Development of high performance Mg–Al₂O₃ composites containing Al₂O₃ in submicron length scale using microwave assisted rapid sintering. *Mater Sci Technol*. 2005;21(9):1063–70.
111. Hassan SF, Gupta M. Development of ductile magnesium composite materials using titanium as reinforcement. *J Alloys Compd*. 2002 Oct;345(1–2):246–51.

112. Ali M, Hussein MA, Al-Aqeeli N. Magnesium-based composites and alloys for medical applications: A review of mechanical and corrosion properties. *J Alloys Compd.* 2019 Jul;792:1162–90.
113. Moussa ME, Mohamed HI, Waly MA, Al-Ganainy GS, Ahmed AB, Talaat MS. Comparison study of Sn and Bi addition on microstructure and biodegradation rate of as-cast Mg-4wt% Zn alloy without and with Ca-P coating. *J Alloys Compd* [Internet]. 2019 Jul;792:1239–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925838819312071>
114. Gray JE, Luan B. Protective coatings on magnesium and its alloys — a critical review. *J Alloys Compd.* 2002 Apr;336(1–2):88–113.
115. Chen XB, Birbilis N, Abbott TB. Review of Corrosion-Resistant Conversion Coatings for Magnesium and Its Alloys. *CORROSION.* 2011 Mar;67(3):035005-1-035005–16.
116. Chen XB, Easton MA, Birbilis N, Yang HY, Abbott TB. Corrosion-resistant coatings for magnesium (Mg) alloys. In: *Corrosion Prevention of Magnesium Alloys.* Elsevier; 2013. p. 282–312.
117. Makhlof ASH, Soliman H. Effect of Nano-Additives (Al₂O₃ and NaF) on the Performance of Ceramic Coatings Formed by Microarc Oxidation on Magnesium Alloys. In: *Handbook of Nanoceramic and Nanocomposite Coatings and Materials.* Elsevier; 2015. p. 389–401.
118. Yerokhin AL, Nie X, Leyland A, Matthews A, Dowey SJ. Plasma electrolysis for surface engineering. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 1999 Dec;122(2–3):73–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897299004417>
119. Zhang RF. Film formation in the second step of micro-arc oxidation on magnesium alloys. *Corros Sci* [Internet]. 2010 Apr;52(4):1285–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010938X09006404>
120. Kaseem M, Fatimah S, Nashrah N, Ko YG. Recent progress in surface modification of metals coated by plasma electrolytic oxidation: Principle, structure, and performance. *Prog Mater Sci.* 2021 Apr;117:100735.
121. Sikdar S, Menezes P V., Maccione R, Jacob T, Menezes PL. Plasma

- Electrolytic Oxidation (PEO) Process—Processing, Properties, and Applications. *Nanomaterials* [Internet]. 2021 May 22;11(6):1375. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/6/1375>
122. Wu K, Wang YQ, Zheng MY. Effects of microarc oxidation surface treatment on the mechanical properties of Mg alloy and Mg matrix composites. *Mater Sci Eng A*. 2007 Feb;447(1–2):227–32.
123. Molaeipour P, Allahkaram SR, Akbarzadeh S. Corrosion inhibition of Ti6Al4V alloy by a protective plasma electrolytic oxidation coating modified with boron carbide nanoparticles. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2022 Jan;430:127987. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897221011610>
124. An L, Ma Y, Liu Y, Sun L, Wang S, Wang Z. Effects of additives, voltage and their interactions on PEO coatings formed on magnesium alloys. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2018 Nov;354:226–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897218310041>
125. Narayanan TSNS, Lee MH. Characteristics of microarc oxidation coatings deposited on magnesium using alkaline and acidic electrolytes in a single stage as well as using dual electrolytes in two stages. *J Alloys Compd* [Internet]. 2016 Dec;687:720–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925838816319077>
126. Einkhah F, Lee KM, Sani MAF, Yoo B, Shin DH. Structure and corrosion behavior of oxide layer with Zr compounds on AZ31 Mg alloy processed by two-step plasma electrolytic oxidation. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2014 Jan;238:75–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897213009766>
127. Rogov AB, Shayapov VR. The role of cathodic current in PEO of aluminum: Influence of cationic electrolyte composition on the transient current-voltage curves and the discharges optical emission spectra. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2017 Feb;394:323–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433216322310>
128. Kaseem M, Fatimah S, Nashrah N, Ko YG. Recent progress in surface

- modification of metals coated by plasma electrolytic oxidation: Principle, structure, and performance. *Prog Mater Sci* [Internet]. 2021 Apr;117:100735. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642520300992>
129. Kaseem M, Ko YG. Morphological modification and corrosion response of MgO and Mg₃(PO₄)₂ composite formed on magnesium alloy. *Compos Part B Eng* [Internet]. 2019 Nov;176:107225. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359836819322541>
130. Seyfoori A, Mirdamadi S, Khavandi A, Raufi ZS. Biodegradation behavior of micro-arc oxidized AZ31 magnesium alloys formed in two different electrolytes. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2012 Nov;261:92–100. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016943321201313X>
131. Zhao J, Xie X, Zhang C. Effect of the graphene oxide additive on the corrosion resistance of the plasma electrolytic oxidation coating of the AZ31 magnesium alloy. *Corros Sci* [Internet]. 2017 Jan;114:146–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010938X16311660>
132. Oleshko O, Deineka V, Husak Y, Korniienko V, Dryhval B, Dudko J, et al. Plasma Electrolytic Oxidation of TiZr Alloy in ZnONPs-Contained Solution: Structural and Biological Assessment. In: *Springer Proc Phys* [Internet]. Springer Proc. Phys; 2020. p. 75–82. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-3996-1_8
133. Husak Y, Dryhval B. Phosphate and Flouride Bath Electrolyte for Lowenergy PEO Coatings on Mg-based Biodegradable Materials. In: *Surfcoat Korea*. Surfcoat Korea; 2021.
134. Dryhval B, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Effect of koh for cell toxicity and antibacterial properties of metal alloys after PEO. In: «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 110.
135. Oleshko O, Kornienko V, Kyrylenko S, Simka W, Husak Y, Oleshko T, et al.

- Physical and Chemical Characterization of the Magnesium Surface Modified by Plasma Electrolytic Oxidation – Influence of Immersion in Simulated Body Fluid. In: 2020 IEEE 10th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2020. p. 02BA11-1-02BA11-4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9309586/>
136. Dryhval B, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Modification of magnesium alloys using plasma electrolytic oxidation in silicate solutions. In: «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 109.
137. Dryhval B, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Plasma electrolytic oxidation for surface modification of pure magnesium. In: «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 111.
138. Oleshko O, Deineka V, Korniienko V, Dudko J, Dryhval B. Effect of CuNPs for cell toxicity and antibacteria properties of metal alloy after PEO. In: Nanomaterials For Biosensor and Biomedical Applications International conference Jurmala, Latvia 2-4 July. Nanomaterials For Biosensor and Biomedical Applications International conference Jurmala, Latvia 2-4 July; 2019. p. 45.
139. Dryhval B, Savchenko A, Oleshko O, Husak Y. Dynamic fluid circulation system for investigation surface adhesive properties. In: ABSTRACT BOOK BIOMEDICAL PERSPECTIVE III International Medical Conference. ABSTRACT BOOK BIOMEDICAL PERSPECTIVE III International Medical Conference; 2021. p. 95.
140. Wang Y, Ouyang Y, Peng X, Mao L, Yuan G, Jiang Y, et al. Effects and Degradable Mg-Nd-Zn-Zr Alloy on Osteoblastic Cell Function. *Int J Immunopathol Pharmacol* [Internet]. 2012 Jul 1;25(3):597–606. Available

- from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/039463201202500306>
141. Husak Y, Kornienko V, Simka W, Oleshko O, Oleshko T, Dryhval B, et al. Structural and Biological Assessment of Mg Alloy Surface after Plasma Electrolytic Oxidation in Different Solutions. In: 2020 IEEE 10th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2020. p. 02BA08-1-02BA08-4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9309693/>
 142. Husak Y, Michalska J, Oleshko O, Kornienko V, Grundsteins K, Dryhval B, et al. Bioactivity Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions. *Molecules* [Internet]. 2021 Apr 6;26(7):2094. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/7/2094>
 143. Dryhval B, Husak Y, Sulaieva O, Deineka V, Pernakov M, Lyndin M, et al. In Vivo Safety of New Coating for Biodegradable Magnesium Implants. *Materials (Basel)* [Internet]. 2023 Aug 24;16(17):5807. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/16/17/5807>
 144. Dryhval B, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Wettability and roughness profile coatings of magnesium obtained by PEO in different solutions. In: *BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists. BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2020. p. 85.*
 145. Husak Y, Kyrylenko S, Kornienko V, Diedkova K, Roshchupkin A, Dryhval B, et al. Biological properties of silicate based peo coatings on the pure Mg. In: 2022 IEEE 12th International Conference “Nanomaterials: Applications & Properties” (IEEE NAP-2022), Kraków, Poland. IEEE; 2022. p. 128.
 146. Stevanovic M, Selakovic D, Vasovic M, Ljubic B, Zivanovic S, Papic M, et al. Comparison of Hydroxyapatite/Poly(lactide-co-glycolide) and Hydroxyapatite/Polyethyleneimine Composite Scaffolds in Bone Regeneration of Swine Mandibular Critical Size Defects: In Vivo Study. *Molecules* [Internet]. 2022 Mar 4;27(5):1694. Available from:

- <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/5/1694>
147. Karadzic I, Vucic V, Jokanovic V, Debeljak-Martacic J, Markovic D, Petrovic S, et al. Effects of novel hydroxyapatite-based 3D biomaterials on proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res Part A* [Internet]. 2015 Jan;103(1):350–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.35180>
 148. Liu L, Shi G, Cui Y, Li H, Li Z, Zeng Q, et al. Individual construction of freeform-fabricated polycaprolactone scaffolds for osteogenesis. *Biomed Eng / Biomed Tech* [Internet]. 2017 Oct 26;62(5). Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bmt-2016-0005/html>
 149. Xia D, Yang F, Zheng Y, Liu Y, Zhou Y. Research status of biodegradable metals designed for oral and maxillofacial applications: A review. *Bioact Mater* [Internet]. 2021 Nov;6(11):4186–208. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X21000153>
 150. Cousin ASS, Bouletreau P, Giai J, Ibrahim B, Louvrier A, Sigaux N. Severity and long-term complications of surgical site infections after orthognathic surgery: a retrospective study. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Jul 21;10(1):12015. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-68968-2>
 151. Zheng YF, Gu XN, Witte F. Biodegradable metals. *Mater Sci Eng R Reports* [Internet]. 2014 Mar;77:1–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X14000023>
 152. Saris NEL, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2000 Apr;294(1–2):1–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898199002582>
 153. Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: A review☆. *Acta Biomater* [Internet]. 2010 May;6(5):1680–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706110000966>
 154. Asgari M, Hang R, Wang C, Yu Z, Li Z, Xiao Y. Biodegradable Metallic Wires in Dental and Orthopedic Applications: A Review. *Metals (Basel)* [Internet]. 2018 Mar 26;8(4):212. Available from: <http://www.mdpi.com/2075->

4701/8/4/212

155. Weng L, Webster TJ. Nanostructured magnesium increases bone cell density. *Nanotechnology* [Internet]. 2012 Dec 7;23(48):485105. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/23/48/485105>
156. Webster T, Weng L. Nanostructured magnesium has fewer detrimental effects on osteoblast function. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2013 May;1773. Available from: <http://www.dovepress.com/nanostructured-magnesium-has-fewer-detrimental-effects-on-osteoblast-f-peer-reviewed-article-IJN>
157. Tsao YT, Shih YY, Liu YA, Liu YS, Lee OK. Knockdown of SLC41A1 magnesium transporter promotes mineralization and attenuates magnesium inhibition during osteogenesis of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2017 Dec 21;8(1):39. Available from: <http://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0497-2>
158. Li Y, Wang J, Yue J, Wang Y, Yang C, Cui Q. High magnesium prevents matrix vesicle-mediated mineralization in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells via mitochondrial pathway and autophagy. *Cell Biol Int* [Internet]. 2018 Feb;42(2):205–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbin.10888>
159. Nakatani S, Mano H, Ryanghyok IM, Shimizu J, Wada M. Excess magnesium inhibits excess calcium-induced matrix-mineralization and production of matrix gla protein (MGP) by ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006 Sep;348(3):1157–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X06017530>
160. Wang J, Xu J, Liu W, Li Y, Qin L. Biodegradable Magnesium (Mg) Implantation Does Not Impose Related Metabolic Disorders in Rats with Chronic Renal Failure. *Sci Rep* [Internet]. 2016 May 23;6(1):26341. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep26341>
161. Torroni A, Xiang C, Witek L, Rodriguez ED, Coelho PG, Gupta N. Biocompatibility and degradation properties of WE43 Mg alloys with and without heat treatment: In vivo evaluation and comparison in a cranial bone sheep model. *J Cranio-Maxillofacial Surg* [Internet]. 2017 Dec;45(12):2075–

83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010518217303256>
162. Amukarimi S, Mozafari M. Biodegradable Magnesium Biomaterials—Road to the Clinic. *Bioengineering* [Internet]. 2022 Mar 5;9(3):107. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-5354/9/3/107>
163. He Y, Tao H, Zhang Y, Jiang Y, Zhang S, Zhao C, et al. Biocompatibility of bio-Mg-Zn alloy within bone with heart, liver, kidney and spleen. *Sci Bull* [Internet]. 2009 Feb 12;54(3):484–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11434-009-0080-z>
164. Luthringer BJC, Feyerabend F, Willumeit-Römer R. Magnesium-based implants: a mini-review. *Magnes Res* [Internet]. 2014 Oct;27(4):142–54. Available from: <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/mrh.2015.0375>
165. Zadpoor AA. Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry. *Biomater Sci* [Internet]. 2015;3(2):231–45. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4BM00291A>
166. Bobe K, Willbold E, Morgenthal I, Andersen O, Studnitzky T, Nellesen J, et al. In vitro and in vivo evaluation of biodegradable, open-porous scaffolds made of sintered magnesium W4 short fibres. *Acta Biomater* [Internet]. 2013 Nov;9(10):8611–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113001657>
167. Dutta S, Bavya Devi K, Roy M. Processing and degradation behavior of porous magnesium scaffold for biomedical applications. *Adv Powder Technol* [Internet]. 2017 Dec;28(12):3204–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921883117303710>
168. Kocijan A, Kovač J, Junkar I, Resnik M, Kononenko V, Conradi M. The Influence of Plasma Treatment on the Corrosion and Biocompatibility of Magnesium. *Materials (Basel)* [Internet]. 2022 Oct 21;15(20):7405. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/20/7405>
169. Chen J, Dai J, Qian J, Li W, Li R, Pang D, et al. Influence of Surface Roughness on Biodegradability and Cytocompatibility of High-Purity

- Magnesium. *Materials* (Basel). 2022 Jun;15(11):3991.
170. Park JH, Schwartz Z, Olivares-Navarrete R, Boyan BD, Tannenbaum R. Enhancement of Surface Wettability via the Modification of Microtextured Titanium Implant Surfaces with Polyelectrolytes. *Langmuir*. 2011 May;27(10):5976–85.
171. Wong HM, Zhao Y, Leung FKL, Xi T, Zhang Z, Zheng Y, et al. Functionalized Polymeric Membrane with Enhanced Mechanical and Biological Properties to Control the Degradation of Magnesium Alloy. *Adv Healthc Mater*. 2017 Apr;6(8):1601269.
172. Xia YH, Zhang BP, Lu CX, Geng L. Improving the corrosion resistance of Mg–4.0Zn–0.2Ca alloy by micro-arc oxidation. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2013 Dec;33(8):5044–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113004967>
173. Lee DH, Kim BS, Chang SY. Tensile Properties of AZ91D Magnesium Alloy Coated by Plasma Electrolytic Oxidation. *Mater Sci Forum* [Internet]. 2009 Apr;620–622:259–62. Available from: <https://www.scientific.net/MSF.620-622.259>
174. Smith T. The effect of plasma-sprayed coatings on the fatigue of titanium alloy implants. *JOM* [Internet]. 1994 Feb 1;46(2):54–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF03222560>
175. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect* [Internet]. 2001 Oct;49(2):87–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670101910527>
176. Wang BL, Liu XS, Ji Y, Ren KF, Ji J. Fast and long-acting antibacterial properties of chitosan-Ag/polyvinylpyrrolidone nanocomposite films. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2012 Sep;90(1):8–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712003086>
177. Wang N, Maskomani S, Meenashisundaram GK, Fuh JYH, Dheen ST, Anantharajan SK. A study of Titanium and Magnesium particle-induced oxidative stress and toxicity to human osteoblasts. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2020 Dec;117:111285. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493120332033>

178. Ma WH, Liu YJ, Wang W, Zhang YZ. Improved biological performance of magnesium by micro-arc oxidation. *Brazilian J Med Biol Res.* 2015 Mar;48(3):214–25.
179. Zheng Z, Chen Y, Hong H, Shen Y, Wang Y, Sun J, et al. The “Yin and Yang” of Immunomodulatory Magnesium-Enriched Graphene Oxide Nanoscrolls Decorated Biomimetic Scaffolds in Promoting Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2021 Jan 9;10(2):2000631. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adhm.202000631>
180. Husak Y, Oleshko O, Michalska J, Korniienko V, Solodovnyk O, Dryhval B. F- and P-enriched Coatings for Mg Implants by Low Energy PEO Process. In: 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2021. p. 1–4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9568602/>

ДОДАТКИ

*Додаток А**Наукові праці, опубліковані за темою дисертації*

1. Oleshko O, Deineka V, Husak Y, Korniienko V, Dryhval B, Dudko J, et al. Plasma Electrolytic Oxidation of TiZr Alloy in ZnONPs-Contained Solution: Structural and Biological Assessment. In: Springer Proc Phys [Internet]. Springer Proc. Phys; 2020. p. 75–82. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-3996-1_8
2. Oleshko O, Kornienko V, Kyrylenko S, Simka W, Husak Y, Oleshko T, et al. Physical and Chemical Characterization of the Magnesium Surface Modified by Plasma Electrolytic Oxidation – Influence of Immersion in Simulated Body Fluid. In: 2020 IEEE 10th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2020. p. 02BA11-1-02BA11-4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9309586/>
3. Husak Y, Kornienko V, Simka W, Oleshko O, Oleshko T, Dryhval B, et al. Structural and Biological Assessment of Mg Alloy Surface after Plasma Electrolytic Oxidation in Different Solutions. In: 2020 IEEE 10th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2020. p. 02BA08-1-02BA08-4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9309693/>
4. Husak Y, Michalska J, Oleshko O, Korniienko V, Grundsteins K, Dryhval B, et al. Bioactivity Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions. *Molecules* [Internet]. 2021 Apr 6;26(7):2094. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/7/2094>
5. Husak Y, Oleshko O, Michalska J, Korniienko V, Solodovnyk O, Dryhval B. F- and P-enriched Coatings for Mg Implants by Low Energy PEO Process. In: 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) [Internet]. IEEE; 2021. p. 1–4. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9568602/>

6. Dryhval B, Husak Y, Sulaieva O, Deineka V, Pernakov M, Lyndin M, et al. In Vivo Safety of New Coating for Biodegradable Magnesium Implants. *Materials (Basel)* [Internet]. 2023 Aug 24;16(17):5807. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/16/17/5807>
7. Dryhval B, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Modification of magnesium alloys using plasma electrolytic oxidation in silicate solutions. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 109.
8. Dryhval B, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Effect of koh for cell toxicity and antibacterial properties of metal alloys after PEO. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 110.
9. Dryhval B, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Plasma elecrolytic oxidation for surface modification of pure magnesium. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2019. p. 111.
10. Oleshko O, Deineka V, Korniienko V, Dudko J, Dryhval B. Effect of CuNPs for cell toxicity and antibacteria properties of metal alloy after PEO. *Nanomaterials For Biosensor and Biomedical Applications International conference Jurmala, Latvia 2-4 July*; 2019. p. 45.
11. Dryhval B, Dudko J, Oleshko O, Husak Y. Wettability and rouhghness profile coatings of magnesium obtained by PEO in different solutions. *BIOMEDICAL PERSPECTIVES» ABSTRACT BOOK International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists*; 2020. p. 85.
12. Husak Y, Dryhval B. Phosphate and Flouride Bath Electrolyte for Lowenergy PEO Coatings on Mg-based Biodegradable Materials. *Surfcoat Korea*; 2021.
13. Dryhval B, Savchenko A, Oleshko O, Husak Y. Dynamic fluid circulation system for investigation surface adhesive properties. *ABSTRACT BOOK BIOMEDICAL PERSPECTIVE III International Medical Conference*; 2021. p. 95.
14. Husak Y, Kyrylenko S, Korniienko V, Diedkova K, Roshchupkin A, Dryhval B, et al. Biological properties of silicate based peo coatings on the pure Mg.

12th International Conference “Nanomaterials: Applications & Properties” (IEEE NAP-2022), Kraków, Poland. IEEE; 2022. p. 128.

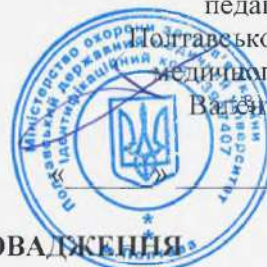
Апробація результатів дисертації

1. Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» (Суми, 2019).
2. Міжнародна конференція «Nanomaterials for biosensors and biomedical application» (Юрмала, Латвія, 2019).
3. Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» (Суми, 2020).
4. Міжнародна конференція «Nanomaterials: Applications & Properties» (Одеса, 2020).
5. Міжнародна конференція «Surfcoat Korea» (2021).
6. Міжнародна медична конференція BIOMEDICAL PERSPECTIVES» (Суми, 2021).
7. Міжнародна конференція «Nanomaterials: Applications & Properties» (Одеса, 2021).
8. Міжнародна конференція «Nanomaterials: Applications & Properties» (Краків, 2022).
9. Міжнародна конференція «YUCOMAT» (Чорногорія, 2023).

Копії актів впровадження

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор з науково -
педагогічної роботи
Полтавського державного
медичного університету
Валентин ДВОРНИК



_____ 2023р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Використання силікатних розчинів під час модифікації поверхні імплантату за допомогою плазмової електролітичної оксидації.
2. **Установа-розробник:** Навчально-науковий медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Дригваль Богдан Олександрович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Ye. Husak, J. Michalska, Oleshko, V. Korniienko, K. Grundsteins, B. Dryhval, S. Altundal, O. Mishchenko, R. Viter, M. Pogorielov, W. Simka. Bioactivity Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions. Molecules. 2021. Volume 26 Issue 7. P.2094. <https://doi.org/10.3390/molecules26072094>.
5. **Впроваджено.** В навчальний процес та наукову роботу кафедри.
6. **Термін впровадження:** квітень-червень 2023 р.
7. **Ефективність впровадження.** Введено у навчальний процес у матеріали лекцій та практичних занять.
8. **Місце впровадження:** кафедра патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії та судової медицини (протокол № 1 від 30. 08.2023 року).

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патологічної анатомії та
судової медицини
Полтавського державного медичного університету,
доктор медичних наук, професор



Іван СТАРЧЕНКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Запорізький державний медико-фармацевтичний університет.
Проректор з науково-педагогічної роботи
доктор медичних наук, професор
Вітер В.А.

« 28 » вересня 2023 року

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Вплив напруги під час модифікацій за допомогою плазмової електролітичної оксидації на фізико-хімічні властивості поверіхні імплантату.
2. **Установа-розробник:** Навчально-науковий медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Дригваль Богдан Олександрович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Ye. Husak, J. Michalska, Oleshko, V. Korniienko, K. Grundsteins, B. Dryhval, S. Altundal, O. Mishchenko, R. Viter, M. Pogorielov, W. Simka. Bioactivity Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions. Molecules. 2021. Volume 26 Issue 7. P.2094. <https://doi.org/10.3390/molecules26072094>.
5. **Впроваджено.** В навчальний процес та наукову роботу кафедри.
6. **Термін впровадження:** _____ 2023 р.
7. **Ефективність впровадження.** Введено у навчальний процес у вигляді лекцій та практичних занять.
8. **Місце впровадження:** м. Запоріжжя ЗДМФУ
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри стоматології
післядипломної освіти проф. Міщенко О.М.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор ЗВО з науково-педагогічної
роботи Національного фармацевтичного
університету



фарм. н., професор Владимірова І. М.

» *мвж* 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
результатів наукових досліджень

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Спосіб отримання модифікованої поверхні імплантату за допомогою плазмової електролітичної оксидації.
2. **Установа-розробник:** Навчально-науковий медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Дригваль Богдан Олександрович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Ye. Husak, J. Michalska, Oleshko, V. Korniienko, K. Grundsteins, B. Dryhval, S. Altundal, O. Mishchenko, R. Viter, M. Pogorielov, W. Simka. Bioactivity Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions. *Molecules*. 2021. Volume 26 Issue 7. P.2094. <https://doi.org/10.3390/molecules26072094>.
5. **Впроваджено.** В навчальний процес та наукову роботу кафедри нормальної та патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету.
6. **Термін впровадження:** 2023-2024 рр.
7. **Ефективність впровадження:** підвищення якості знань студентів з питань патогенезу ускладнень імплантації.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра нормальної та патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету.
9. **Зауваження, пропозиції.** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри
нормальної та патологічної фізіології
Національного фармацевтичного
університету,
д. мед. н., професор

Надія КОНОНЕНКО