

УДК: 615.281:577.1, 616.71,
611.018.4:616-003.9-07-085:546/.57-022.513.2
УКПП
№ держреєстрації № 0121U100471
Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58
e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

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

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
Стан мінералізованих тканин при застосуванні нових композитів з
наночастинками Ag^+ та Cu^{2+}

ВИЗНАЧЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ
ВЛАСТИВОСТЕЙ
(проміжний)

Науковий керівник
проф., д-р мед наук

Р.А. Москаленко

Суми 2022

Рукопис закінчено 25 грудня 2022 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол №_ від _ грудня 2022 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР,
Головний. наук. співроб.,
д-р мед. наук

(підпис)

(дата)

Р.А. Москаленко
(реферат, вступ, висновки,
розділи 1,2,3)

Відповідальний виконавець
Науковий співроб.

(підпис)

(дата)

Є.В. Гусак
(розділи 1,2,3)

Старший наук. співроб.,
канд. мед. наук

(підпис)

(дата)

Ю.В. Москаленко
(розділ 1,3)

Молодший наук. співроб.

(підпис)

(дата)

О.О. Коломієць
(розділ 1)

Лаборант

(підпис)

(дата)

Н.В. Казбан
(розділ 3)

Лаборант

(підпис)

(дата)

Р.А. Чижма
(розділ 3)

Лаборант

(підпис)

(дата)

А.П. Денисенко
(розділ 3)

Лаборант

(підпис)

(дата)

В.С. Голопьярова
(розділ 1)

Лаборант

(підпис)

(дата)

І.М. Гудовський
(розділ 1)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 62 с., 26 рис., 6 табл., 69 джерел.

АНОДИЗАЦІЯ, ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, КАЛЬЦИФІКАТИ, МІДЬ, МІНЕРАЛІЗОВАНІ ТКАНІНИ, НАНОЧАСТИНКИ, ПЛАЗМОВОГО ЕЛЕКТРОЛІТИЧНОГО ОКИСЛЕННЯ, СРІБЛО, ТВЕРДА МОЗКОВА ОБОЛОНКА, ЯЄЧНИКИ

Об'єкт дослідження – мінералізовані тканини.

Предмет досліджень – зміни метаболізму мінералізованих тканин при використанні остеопластичних матеріалів з структурно-інтегрованими наночасточками срібла та міді.

Мета роботи – визначити особливості метаболізму мінералізованих тканин при використанні остеопластичних матеріалів з наночасточками міді та срібла.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- синтез наночасточок металів (Cu, Ag), в тому числі з використанням технології «зеленого синтезу» та вивчення їх фізико-хімічних характеристик (розміри, форма, розчинність, агрегація);

- структурування остеопластичних матеріалів на основі кальцій-фосфатів новими наночасточками;

Методи дослідження - аналіз закордонних та вітчизняних джерел щодо складу наночастинок та властивостей іонів-ефекторів, гістологічне та гістохімічне дослідження (забарвлення гематоксилином та еозином), сканувальна електронна мікроскопія з мікроаналізом, рентгенівська дифракція мінералізованих тканин в нормі та патології. Також застосовані методи покриття плазмового електролітичного окислення з метою підвищення зносостійкості і стійкості до корозії, покращення біосумісності і біорозкладності.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ, АНАЛІЗ ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ АНОДИЗАЦІЇ ДЛЯ СТВОРЕННЯ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ	7
1.1 Сучасні уявлення про процес плазмової електрооксидзації	7
1.2 Стадії ПЕО та залежність процесу від різних факторів	9
2 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА КІНЕТИКИ ВИХОДУ ІОНІВ	18
2.1 Кінетика вивільнення іонів срібла з композиту НА-AgNPs та стабільність наночастинок при різних типах обробки	18
2.2 Антибактеріальний вплив AgNPs на формування біоплівки Enterococcus Faecalis	29
3 МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МІНЕРАЛІЗОВАНИХ ТКАНИН	38
3.1 Морфологічне дослідження тканини твердої мозкової оболонки з нанорозмірною кальцифікацією	38
3.2. Морфологічне дослідження тканини раку яєчників з нанорозмірною кальцифікацією	45
ВИСНОВКИ	52
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	55

ВСТУП

В основу проекту покладена ідея щодо створення ефективної комбінації кальцій-фосфатного композиту з наночасточками міді та срібла та визначення метаболізму мінералізованих тканин при їх імплантації.

Дослідження базується на гіпотезі про залежність змін тканин організму від розміру та концентрації наночасточок. Відомо, що збільшення розміру наночасточок срібла призводить до зменшення цитотоксичності, при цьому відбувається нелінійне зменшення антибактеріальних властивостей. Використання різних методів синтезу дозволить розробити широку лінію наночасточок міді та срібла та визначити їх ефективність і токсичність, на основі чого буде відібрана ефективна комбінація для структурування остеопластичних матеріалів.

Зважаючи на відсутність можливості біодеградації наночасточок, існує гіпотеза про можливість їх накопичення в тканинах, що може призвести до розвитку побічних ефектів або впливу на метаболізм тканин. Проте, зважаючи на низькі концентрації наночастинок, їх ефекти можуть бути мінімальними або взагалі відсутніми. При цьому системних досліджень щодо впливу різних типів наночастинок на метаболізм мінералізованих тканин недостатньо для оцінки їх віддалених ефектів та безпеки для застосування в клінічних ситуаціях.

Таким чином, в роботі проводиться системна оцінка впливу наночастинок срібла та міді на мінералізовані тканини і верифіковані гіпотези щодо їх безпеки і ефективності.

Використання кальцій-фосфатних матеріалів для пластики кісткової тканини останніми десятиліттями стало рутинною процедурою, яку проводять ортопеди-травматологи та імплантологи. Інфекційні післяопераційні ускладнення досягають 12-17%, що супроводжується зростанням вартості лікування, можливою інвалідизацією та втратою органу. На сьогодні ефективним засобом боротьби з інфекцією є антибіотики, проте зважаючи на

розповсюдженість резистентності та складності доставки лікувального препарату у мінералізовану тканину, їх актуальність стоїть під питанням. Антибактеріальні агенти, в тому числі наночастинки металів та їх оксидів, активно досліджуються з метою впровадження в клінічну практику через неможливість розвитку резистентності до них з боку мікроорганізмів. Існує велика кількість досліджень, які показують високу ефективність наночастинок срібла та міді відносно більшості клінічно значущих штамів мікроорганізмів. Доведена можливість синтезу безпечних наночастинок, які мають низьку клітинну токсичність. Проте відсутні дослідження щодо їх впливу на метаболізм мінералізованих тканин, як ефекторів застосування модифікованих остеопластичних матеріалів.

Виконання дослідження уможливить отримати системні дані щодо метаболізму кісткової тканини при застосуванні остеопластичних матеріалів з інкорпорованими наночасточками срібла та міді. Для порівняння у проєкті досліджується метаболізм мінералізованих тканин за умов патології та норми. Отримані нові дані будуть використані для розробки рекомендацій щодо клінічного дослідження ефективності матеріалів для заміщення дефектів кістки та зменшення інфекційних післяопераційних ускладнень.

В результаті виконання проєкту очікується отримати дані щодо особливостей реакції мінералізованих тканин на матеріали, які містять наночасточки срібла та міді та отримати межі безпечності застосування зазначених остеопластичних матеріалів. Враховуючи зростаючу кількість інфекційних ускладнень після ортопедичних втручань та ріст антибіотикорезистентності, подібні матеріали з високою антибактеріальними властивостями можуть значно зменшити ризик ускладнень. Саме відсутність інформації щодо безпеки використання таких засобів обмежує їх широке застосування в клінічній практиці.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ, АНАЛІЗ ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ АНОДИЗАЦІЇ ДЛЯ СТВОРЕННЯ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ

1.1 Сучасні уявлення про процес плазмової електрооксидзації

Успішна регенерація кісткової тканини – це комплекс фізіологічних процесів, які впливають на баланс між резорбцією (остеокласти) і синтезом (остеобласти) кістки з подальшим ремоделюванням. Останні десятиліття особлива увага при регенерації кісткової тканини приділяється остеоінтеграції біоматеріалів.



Такі матеріали повинні мати належні механічні властивості, бути біосумісними та не викликати імунної відповіді. Незважаючи на імпланти на основі Ti, імплантати на основі Mg можуть бути використані як замітники кістки з подальшою деградацією та заміною на власну тканину. Біорозкладні імплантати можна імплантувати на відповідний період і поступово замінювати їх тканиною господаря.

Основним недоліком Mg є швидка неконтрольована деградація, а покриття плазмового електролітичного окислення (ПЕО) підходять як найкраще для захисту від корозії [1]. Основними перевагами обробки анодування є підвищена зносостійкість і стійкість до корозії, покращена біосумісність і біорозкладаність. Керамікоподібні покриття на легких металах утворюються в лужних електролітах під високою напругою. Короточасні

розряди відбуваються локально на межі метал/електроліт, що призводить до перетворення металу на шар на основі оксиду [1].

Питання розширення асортименту хімічних композитних покриттів вирішується додаванням розчинних і нерозчинних добавок. Крім того, різний хімічний склад і прикладена напруга впливають на морфологію поверхні. Особливо бажаними властивостями є довготривалий захист і багатофункціональність поверхонь [1, 2].

Таким чином ПЕО створює надзвичайні умови для отримання захисного керамічного оксидного покриття з чудовою зносостійкістю та стійкістю до корозії, морфологією поверхні та біофункціональністю [3]. Основними властивостями покриттів для матеріалів, що розкладаються, є морфологія пор, адгезивні властивості пов'язані з хімічною стабільністю та кращою корозійною дією. Електроліти на лужній основі зазвичай використовуються для обробкою Mg ПЕО [4]. Для виготовлення ПЕО-покриттів в основному застосовують розчини силікатів, алюмінатів і фосфатів. Багато досліджень продемонстрували вплив аніонів на характеристики покриття. P-, Si- та Al-вмісні електроліти можуть брати участь у певних фазах утворення, таких як $Mg_3(PO_4)_2$ [5], Mg_2SiO_4 , і $MgAl_2O_4$ [6]. Деякі роботи показали, що присутність SiO_3^{2-} в електроліті призвела до формування більш стабільного пасивного шару, ніж розчин на основі PO_4^{4-} під час обробки ПЕО. Крім того, згідно з літературними даними, покриття на силікатній основі мали найкращі корозійні властивості. Силікатні електроліти широко використовуються для ПЕО завдяки стабільності та твердості покриттів [6, 7]. Тому в деяких публікаціях розглядається вплив типу електролітів на отримане покриття. Інші дослідження показали вплив режиму струму, щільності струму, часу процесів і прикладеної напруги на формування поверхні [4]. Іони фтору є свого роду важливими модифікаторами електролітів, які призводять до трансформації фазового складу, що покращує корозійну стійкість ПЕО-покриття [8, 9]. Поєднання складу розчину та параметрів обробки призводить до перспективних властивостей ПЕО покриття. Наприклад, силікатно-фосфатний

електроліт із додаванням іонів фтору створював краще покриття з корозійною стійкістю ПЕО-покриттів із збільшенням часу обробки [10, 11]. А поєднання силікатів і фторидів позитивно впливає на властивості цитосумісності покриттів [12].

1.2 Стадії ПЕО та залежність процесу від різних факторів

Таким чином, біологічні властивості ПЕО-покриттів залежать від їх мікроструктури та складу, які в основному визначаються параметрами процесу та електроліту. Останні розробки процедури РЕО зосереджені на використанні суспензій СаР-частинок, спрямованих на включення на місці або ущільнення пористих покриттів і надання шарам нових функціональних можливостей. Використання стратегії впровадження частинок у покриття без утворення нової фази, забезпечує збереження первинного хімічного складу, форми та розміру частинок та дозволяє задати відповідні параметри покриттю [13]. Таким чином, дослідження спрямовані на створення керамічних покриттів із залученням СаР-частинок для посилення біоактивності, наприклад клітинної адгезії та проліферації є інноваційними.

Анодизація представляє собою електрохімічний процес, схема якого представлена на рисунку 1.

РЕО-покриття зразків Mg вимагають конкретних параметрів, які залежать особливо складу електроліту. В більшості густина імпульсного струму складає $0,1 \text{ A/cm}^2$. Кінцева напруга визначається складом електроліту і може бути наприклад до 300 В для силікатних розчинів [14].

Додавання до композиції електроліту частинок СаР походження у порошкоподібних формах, дозволить забезпечити більшу гнучкість і більше варіантів проведення процесу ПЕО [13]. У таблиці 1 наведено хімічний склад електроліту та різних частинок, які використовувалися в розчині ПЕО з метою досягнення покращених властивостей і представлення нових функціональних можливостей покриттів.

Формування ПЕО-покриття - це процедура, що складається з декількох циклів: формування шару → руйнування → плавлення → спікання → повторне формування шару. Частинки мають поверхневу енергію; отже, вони здатні поглинати негативні іони, утворюючи негативно заряджені частинки. За допомогою ефекту електричного поля ці колоїдні частинки можуть рухатися до анода (магнієвого сплаву) і осідати на його поверхні [15]. Вбудовані частинки НАР можуть підвищити щільність покриття та призвести до корозійної стійкості [14].

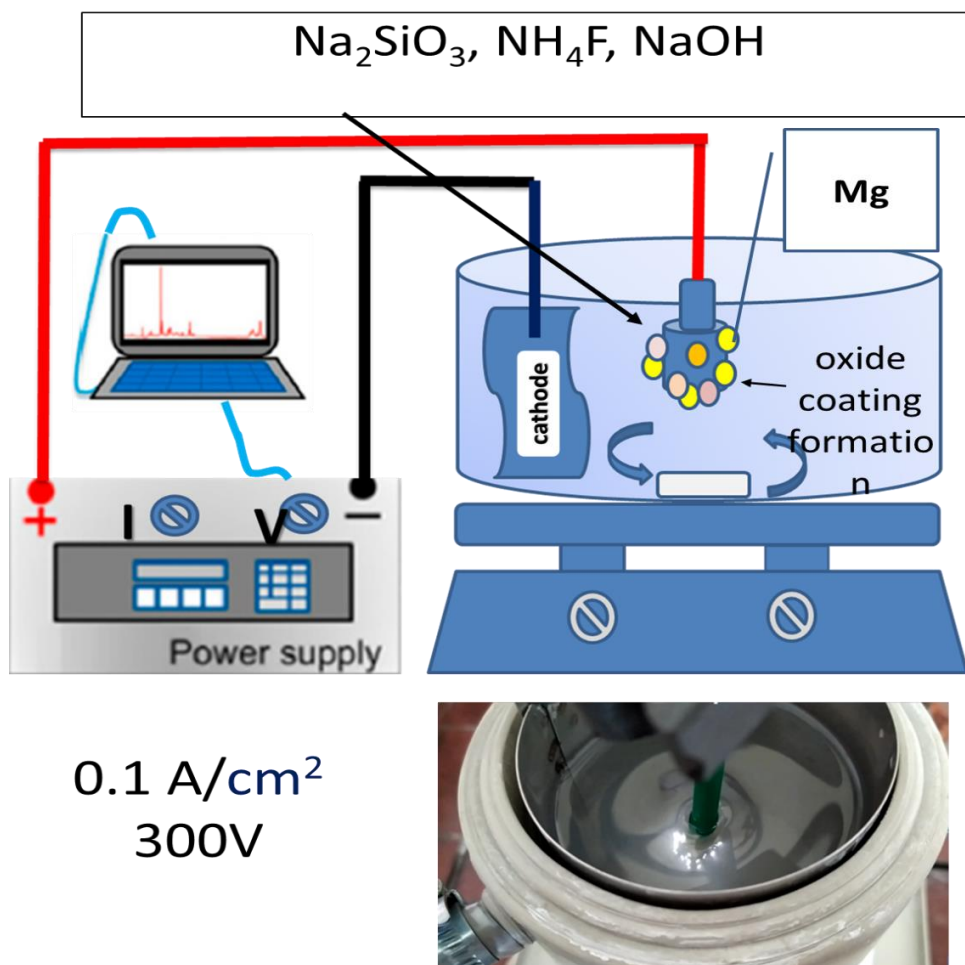


Рисунок 1 – Схема процесу процесу анодизації для зразків

Таблиця 1 – Електролітний склад розчинів для ПЕО, де CN – контроль, TCP – трикальцій фосфатні частинки, HAP – гідроксиапатитні частинки

Код зразку	Склад електроліту
CN	10g/L Na ₂ SiO ₃ + 5g/L NH ₄ F + 10g/L NaOH
TCP	10g/L Na ₂ SiO ₃ + 5g/L NH ₄ F + 10g/L NaOH+ 4g/L TCP
HAP	10g/L Na ₂ SiO ₃ + 5g/L NH ₄ F + 10g/L NaOH+ 4g/L HAP

На рис. 2 демонструються SEM-зображення зразків, покритих при різних режимах. ПЕО-покриття мають типову пористу структуру з рівномірним розподілом пор. Пори можуть мати як відкриту так і закриту структуру. Додавання компоненту до електроліту впливає як на розмір пор так і на їх орієнтацію. Наприклад додавання ГАП збільшило розмір пор з $0,65 \pm 0,4$ мкм² до $0,79 \pm 0,6$ мкм² [14].

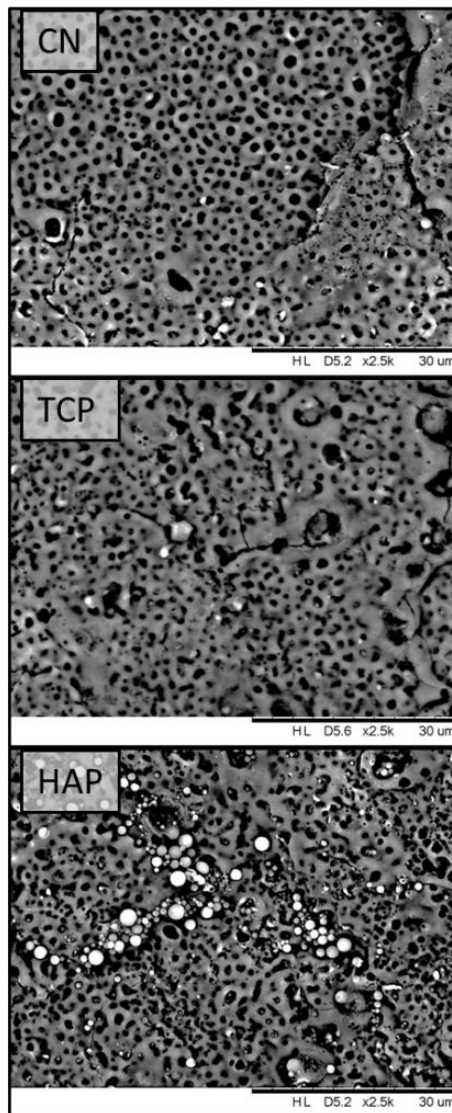


Рисунок 2 – SEM-зображення PEO покриття Mg імплантатів. CN - контроль, TCP - трикальційфосфат, HAP – гідроксиапатит в силікатному розчині [14]

На рисунку 3 представлена схема процесу анодизації в присутності кальцій-фосфатних частинок. Частинки з електроліту можуть інтегруватись до складу покриття, не змінюючи свої форми і хімічної структури (рис. 3). На рисунку 3 покриття HAP мали видимі частинки на поверхні. Видалення верхнього шару покриття підтвердило вбудовування частинок всередину шару (рис. 2. b)) [14].

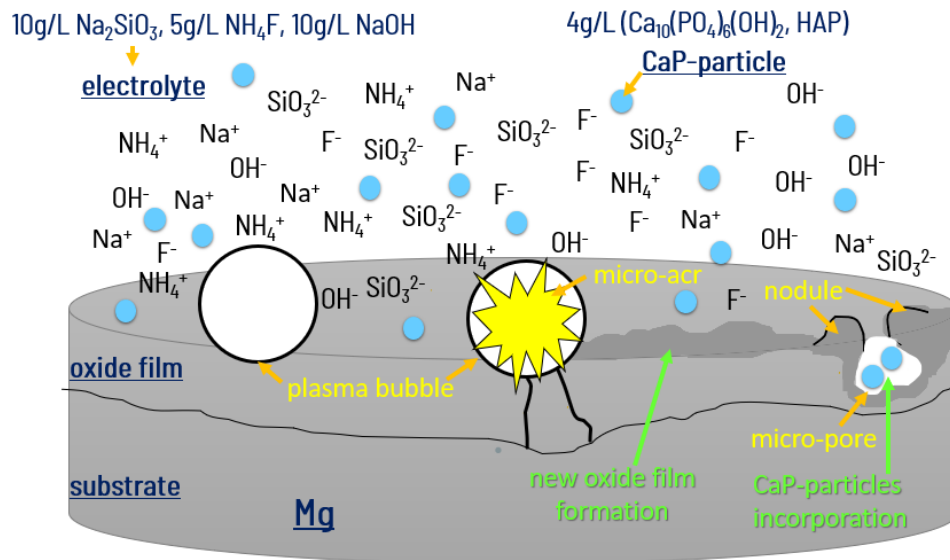


Рисунок 3 – Схема ПЕО процесу в присутності кальцій-фосфатних частинок

Поєднання електроліту з частинками на основі CaP дозволяє змінити елементний розподіл в покритті (табл. 2). Згідно з попередніми дослідженнями, під час процесу ПЕО фторид відіграє важливу роль у процесі росту покриттів [16]. Силікати мають особливу роль для формування високої питомої поверхні та властивостей біосумісності [17]. ПЕО-покриття можуть включати елементи, які були присутні у електроліті, наприклад бути збагачені фтором і силікатами [14].

Додавання порошку HAP до електроліту може змінювати діапазон значень параметра шорсткості поверхні, що наприклад призводить до збільшення значень Ra (табл. 3). Атрибут шорсткості в поєднанні з пористістю може вказувати на підвищену біоактивність покриття порівняно з іншими покриттями [18], особливо щодо адгезивних властивостей [14].

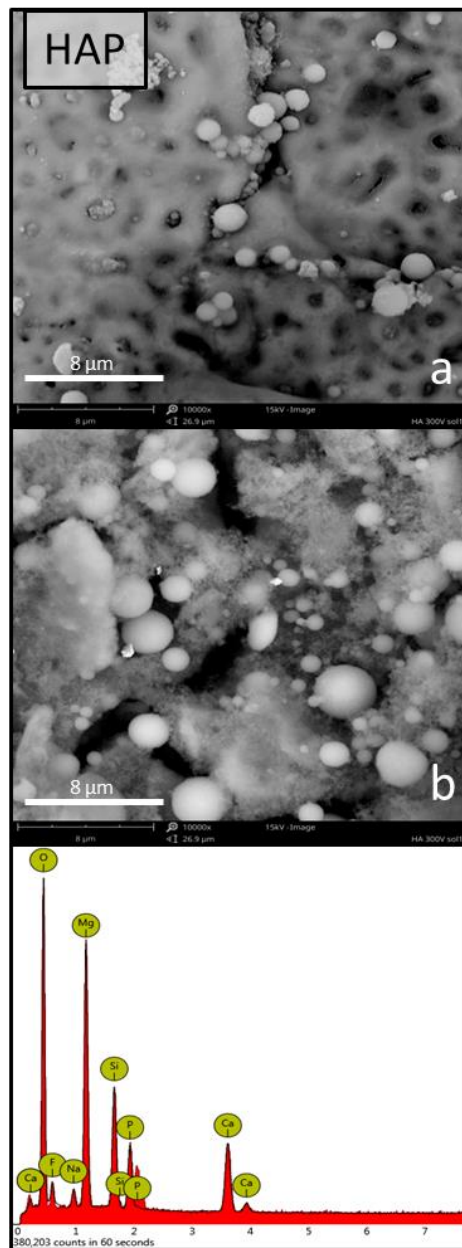


Рисунок 4 – SEM зображення HAP-вмісних покриттів зразка Mg: а) верхня частина та б) внутрішня частина покриття; і с) спектр EDX покриття [14]

Таблиця 2 – EDX аналіз ПЕО покриттів

Element Symbol	Table Column Head		
	<i>CN</i>	<i>TCP</i>	<i>HAP</i>
O	53.33 ± 0.16	54.48 ± 3.1	46.84 ± 1.22
Mg	31.04 ± 0.15	26.48 ± 3.42	30.54 ± 1.85
F	3.38 ± 0.1	9.44 ± 1.65 ^a	8.18 ± 5.09 ^a
Si	10.8 ± 0.13	10.05 ± 0.97	12.72 ± 2.0
Na	1.47 ± 0.1	1.4 ± 0.14	1.73 ± 0.03

Таблиця 3 – Значення Ra параметру шорсткості для ПЕО-покриттів

Шороховатість, мкм		
<i>CN</i>	<i>TCP</i>	<i>НАР</i>
2.67 ± 0.72	3.11 ± 0.16	4.65 ± 0.31

Іншою властивістю поверхні, що відповідає за клітинну адгезію, є змочуваність поверхні [19]. Вимірювання контактного кута дає інформацію про гідрофільний або гідрофобний характер поверхонь, наприклад зображених у (табл. 4.). Наприклад, статичний контактний кут для зразків без добавок становить $21,6 \pm 1,3^\circ$, що вказує на те, що поверхня ПЕО-покриття в електроліті на основі силікату натрію має гідрофільну природу. Тоді як додавання порошку TCP підвищило значення контактного кута до $52,7 \pm 7,1^\circ$. Частинки НАР викликають зниження КА, що призводить до повного змочування покриттів (табл. 4) [14]. Багато дослідників вказуює на те, що гідрофільна поверхня сприяє адгезії клітин [15, 20].

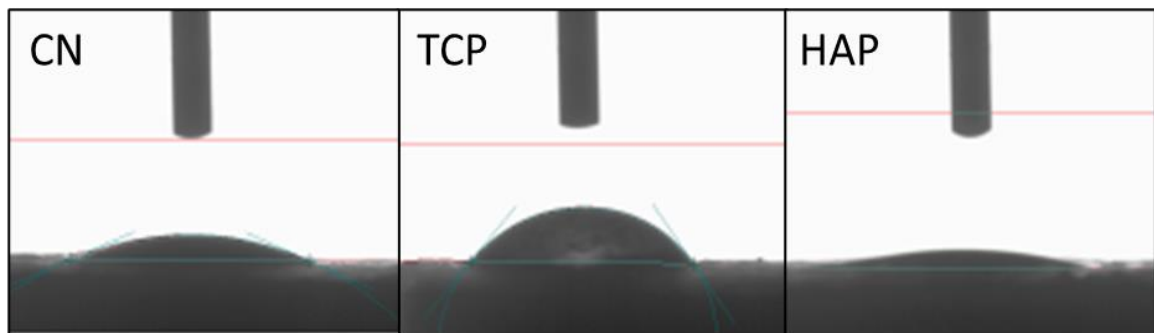


Рисунок 5 – Зображення значень контактного кута для отриманих ПЕО-поверхонь

Показники товщини ПЕО-поверхонь відіграють значну роль при захисті від корозії. Згідно літератури, більша напруга відповідає більшим показникам товщини покриття [21]. Однак додавання частинок може спричинити загальне зменшення товщини шару РЕО. Наприклад, побічний ефект частинок срібла може бути послаблений під високою напругою через збільшену швидкість

росту. Отже, структура покриття визначається фізичними параметрами та хімічним складом розчину [14].

Таким чином додавання частинок НАР до розчину вплинуло на параметри поверхні і, отже, на процедуру ПЕО. Це можна пояснити зміною властивостей розчину, наприклад, провідності, рН і в'язкості. Схема впливу умов ПЕО на показники отриманих покриттів представлено на рисунку 6.

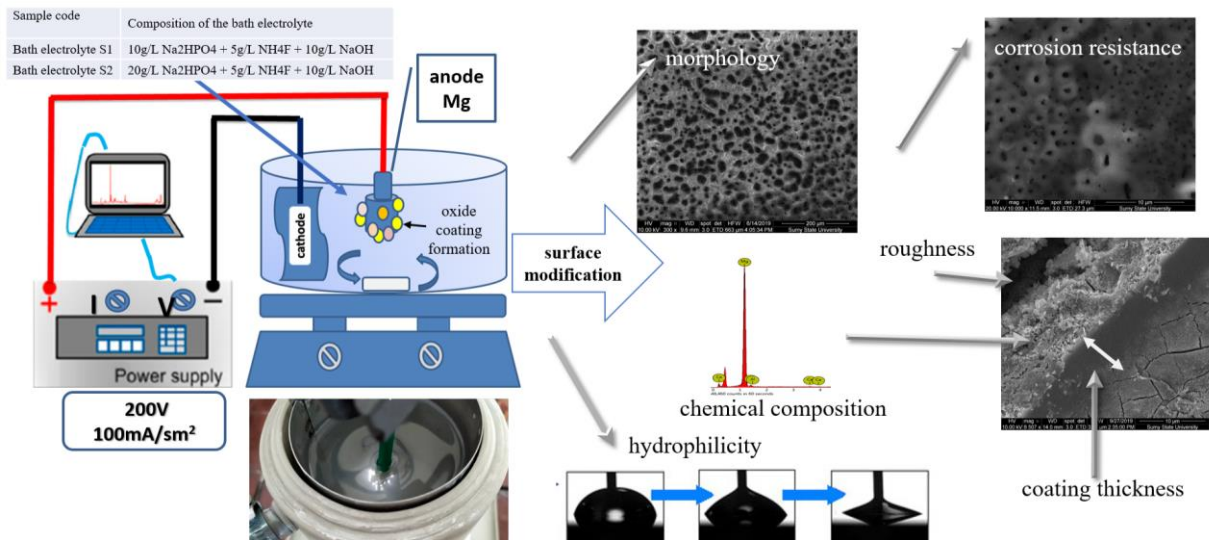


Рисунок 6 – Схема впливу умов ПЕО на показники отриманих покриттів

Тому модифікація складу електроліту є ідеальним рішенням для створення нових функціональних можливостей покриття. Наприклад, антибактеріальна поведінка ПЕО-покриття є перспективною для подальшого процесу загоєння після імплантації. Попередні дослідження показують, що наночастинки срібла (AgNP) є найкращим кандидатом для створення антибактеріального покриття. Наночастинки срібла були включені в керамічне оксидне покриття 3D каркасів Ti6Al4V. Наночастинки продемонстрували високу антибактеріальну активність проти грамположитивних бактерій і не справляли значного впливу на ріст клітин остеобластів і вироблення колагену [22]. У попередніх дослідженнях, пов'язаних з анодуванням Mg, срібло додавали до електролітів у нітратній та ацетатній формі та утворювали комплекс із гідроксиапатитом [23]. Але існує обмежена інформація про

використання суспензії AgNPs для анодування матеріалів на основі Mg. Згідно з даними, негативно заряджені частинки демонструють негативний дзета-потенціал в електролітах на лужній основі. Таким чином, негативний дзета-потенціал може сприяти введенню частинок у покриття [24].

Аналіз отриманих даних та результати досліджень підтверджують актуальність застосування силікатної ванни в ПЕО, збагаченої AgNPs та кальцій-фосфатними частинками, для обробки магнієвих зразків як нового підходу для отримання високобіоактивних поверхонь з антибактеріальними властивостями [14].

2 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА КІНЕТИКИ ВИХОДУ ІОНІВ

2.1 Кінетика вивільнення іонів срібла з композиту НА-AgNPs та стабільність наночастинок прирізних типах обробки.

Гідроксиапатит (ГА) широко використовується для виготовлення імплантатів завдяки його високій хімічній подібності до мінерального компоненту позаклітинного матриксу кісткової тканини [25]. Наночастинки срібла (AgNP) ефективно використовують для лікування бактеріальної інфекції різної локалізації [25]. Інфекційні захворювання кісткової тканини, спеціальні післяімплантаційні та хірургічні процедури вимагають застосування місцевих антибактеріальних матеріалів, а ГА з наночастинками срібла міг бути ефективним способом запобігання бактеріальної інфекції [26]. Традиційно вважається, що наночастинки срібла та іони Ag^+ мають антимікробні та бактерицидні властивості [27, 28]. Клінічне застосування AgNPs значно розвинулося в галузі стоматології та ортопедії, де периопераційна інфекція є постійною загрозою від імплантованих пристроїв або протезів під час хірургічної заміни суглобів [29]. Незважаючи на доведену антимікробну ефективність комбінації AgNPs-НА, існує багато питань, які необхідно вирішити перед практичним застосуванням цих матеріалів, зокрема швидкість вивільнення іонів срібла з AgNPs, адсорбційна здатність НА до AgNPs, швидкість десорбції іонів Ag^+ з AgNPs-НА [30]. Вивільнення іонів Ag^+ у довгострокових дослідженнях є одним з вирішальних моментів для забезпечення антимікробної ефективності композитів. Дослідження вивільнення іонів срібла з часом в одному і тому ж розчині демонструє, що кількість іонів срібла після центрифугування зменшується на 0,7-1,1 мкг/мл. Після попередньої обробки розчину, що містить AgNPs, в ультразвуковій ванні вивільнення іонів срібла в розчин дещо збільшується [31]. Дослідження фізико-хімічних властивостей, поведінки вивільнення іонів Ag^+ та

антибактеріальних властивостей отриманих нанокompозитів все ще залишається актуальною темою в даний час [32].

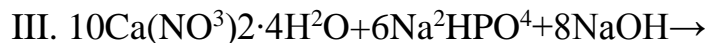
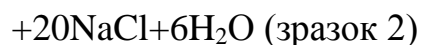
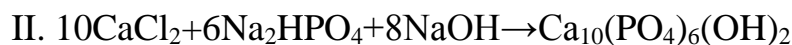
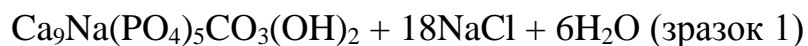
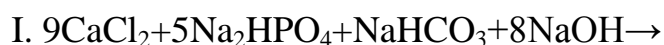
Матеріали і методи

А. Дослідження вивільнення іонів з AgNPs.

Базова суспензія AgNPs (NanoPure) була виготовлена, як описано в [32], і використовувалась без будь-якого подальшого очищення. Морфологію та хімічну структуру наночастинок оцінювали за допомогою SEM (JOEL JSM-7800F), оснащеному аналізатором рентгенівської енергодисперсійної спектроскопії (EDX). Розчин наночастинок (НЧ) срібла розбавляли дистильованою водою до концентрації 60 мкг/мл. Для оцінки впливу ультразвуку на вивільнення іонів срібла розчин витримували 30 хв в ультразвуковій ванні (40 Гц). Центрифугування при 8000 об/хв (10 хв) проводили для відділення іонів Ag^+ від НЧ Ag внаслідок седиментації НЧ. Концентрацію іонів Ag^+ у супернатанті вимірювали методом атомно-абсорбційної спектроскопії (ААС) за допомогою спектрофотометра С-115 М1. Параметри аналізу: лампа з порожнистим катодом для срібла ($\lambda(\text{Ag}) = 328,1$ нм), окисне полум'я – суміш газів пропан-бутан-повітря.

В. Синтез ГА

Зразки гідроксиapatиту синтезували трьома способами:



Була виміряна сорбційна здатність різних типів ГА. Отриманий Зразок 1 ГА мав нестехіометричну кальційдефіцитну природу; Зразки 2 і 3 – стехіометричний ГА, синтезовані двома різними способами. Зразки ГА змішували з розчином AgNPs у співвідношенні 1 до 1 і після центрифугування вимірювали концентрацію іонів Ag^+ у надосадовій рідині. Концентрація НЧ

Ag у вихідному розчині становила 18,625 мкг/мл. Зразки ГА контактували з розчином НЧ протягом 72 годин при 25°C. Також було досліджено вплив обробки ультразвуком на вивільнення іонів Ag⁺ з отриманих матеріалів НА AgNs.

C. Характеристика адсорбції та десорбції іонів срібла.

Для дослідження сорбції AgNP був обраний ГА. Адсорбцію розраховували за формулою:

$$A = (C_0 - C) \cdot V/m \text{ адсорбенту,}$$

де C_0 – вихідна концентрація AgNP в мкг/мл, C – концентрація AgNP в мкг/мл, V – загальний об'єм ГА та AgNP у мл; m – маса адсорбенту (ГА) в г; A – адсорбція, мкг/г. Процес десорбції досліджували за ізотермічних умов з постійним перемішуванням. Зразки ГК з адсорбованими наночастинками Ag змішували з дистильованою водою (співвідношення твердої речовини до рідини = 1:20) при постійній $T = 298 \text{ K}$ протягом 24 годин. Потім після центрифугування кількість срібла оцінювали у фільтраті за допомогою ААС.

$$D = C \cdot V / C_{(\text{Ag}) \text{ НА}},$$

де D – десорбція (мкг/г); $C(\text{Ag})\text{НА}$ – маса Ag, адсорбована ГА (мкг/г); C – концентрація Ag у фільтраті після десорбції (мкг/мл); V – об'єм розчину (мл).

D. Оцінка морфологічної стабільності AgNPs.

Для оцінки морфологічної стабільності було підготовлено три набори зразків AgNP. Дослідження проводили шляхом порівняння вихідної суспензії НЧ із суспензією після обробки. Для дослідження морфологічних змін AgNP використовували скануючу електронну мікроскопію. На першому етапі суспензію НЧ Ag (3000 мкг/мл) центрифугували при 8000 об/хв (10 хв). НЧ Ag, що осідають на дні кювети; потім супернатант відділяли (переносили). Потім осад ресуспендували з додаванням достатньої кількості дистильованої води для отримання базової концентрації. Процедуру повторювали тричі. Другий вид обробки представляв собою ультразвук протягом 2 хв. Базовий розчин та суспензію після обробки готували для аналізу SEM, поміщаючи 10 мкл розведеного зразка 10 разів на підкладку.

Е. Дослідження антибактеріальних властивостей AgNPs.

Дослідження антимікробної активності наночастинок проводили з використанням НЧ Ag, розчинених у живильному бульйоні в концентраціях 20, 100, 200 і 300 мкг/мл. Було підготовлено три серії зразків AgNPs. Перша серія пробірок містила базовий розчин. Другу серію пробірок центрифугували, а супернатант і осад осадів збирали. Третю серію пробірок із супернатантом і осадом AgNPs обробляли ультразвуком протягом 2 хвилин перед аналізом. Після цього пробірки інкубували при 37 °С протягом 1, 2 або 3 днів. Потім 200 мкл *S. aureus* (10^6 КУО/мл) додавали до 1,8 мл підготовлених AgNP та інкубували протягом 24 годин при 37 °С. Після цього була проведена оцінка оптичної густини в досліджуваних зразках за допомогою Multiskan FC Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) з довжиною хвилі 595 нм.

Антибактеріальні властивості композитів AgNPs-НА досліджували при концентраціях AgNPs у НА 5, 10, 20, 50, 100, 200 мкг/мл. Спочатку композитні суспензії поміщали в термостат на ніч при 37°C. Потім 10 мл суспензії наносили на фільтрувальний папір і висушували при кімнатній температурі. Бактеріальні суспензії 10^5 КУО/мл висівали на чашки з поживним агаром і сушили протягом 1 години. Попередньо підготовлені диски поміщали на агар і інкубували протягом 24 год при 37°C. Результат оцінювався вимірюванням зони затримки росту навколо дисків.

Результати та обговорення

А. Дослідження вивільнення іонів Ag⁺

Час адсорбції для всіх зразків ГА становив 72 години (3 дні) при температурі 25 °С. Результати наведено в таблиці 4.

Зразки 1, 2 і 3 відповідають ГА, отриманим у трьох видах синтезу, група зразків а – відповідає зразкам без ультразвукової (УЗ) обробки, група зразків б – відповідає зразкам, обробленим ультразвуком.

Таблиця 4 – Адсорбція ГА іонів срібла

Зразок	Умови адсорбції	Концентрація Ag ⁺ іонів у фільтраті після адсорбції мкг/мл	Адсорбція гідроксиапатитом, мг/л
1a	Без ультразвукової обробки	1.36 ±0.05	0.8632±0.03
1b	З ультразвуковою обробкою	1.29±0.05	0.8667±0.03
2a	Без ультразвукової обробки	0.44±0.05	0.2797±0.03
2b	З ультразвуковою обробкою	0.69±0.05	0.2759±0.03
3a	Без ультразвукової обробки	0.13±0.05	0.4456±0.03
3b	З ультразвуковою обробкою	0.12±0.05	0.4459±0.03

Концентрацію іонів Ag⁺ вимірювали в надосадовій рідині після центрифугування. Зразки 1b, 2b і 3b обробляли ультразвуком при 40 кГц протягом 30 хв. Здатність ГА зменшувати вивільнення іонів Ag⁺ з НЧ Ag за рахунок адсорбції досліджено для трьох типів гідроксиапатитів, які відрізнялися співвідношенням компонентів і типами синтезу. Результати представлені на рис.7.

Як видно з рисунку 6. після контакту ГА з AgNP (початкова концентрація становила 18,625 мкг/мл) і після центрифугування суспензії іони срібла залишались в супернатантному розчині. Зразки ГА, які контактували з розчинами AgNPs, вивільняли майже 1,2-1,3 мкг/мл іонів срібла. Найбільшу кількість вивільнених іонів срібла спостерігали в надосадовій рідині для кальційдефіцитного ГА (зразок 1). Ультразвукова обробка зразків під час адсорбції суттєво не вплинула на цей процес. Досліджено також здатність іонів срібла вивільнятися з колоїдного розчину НЧ Ag (початкова концентрація 60 мкг/мл) без ГА (рис. 7).

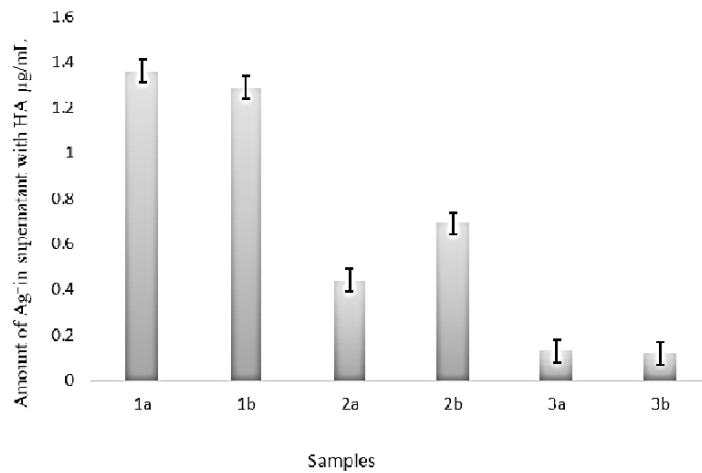


Рисунок 7 – Концентрація іонів Ag⁺ у надосадовій рідині, вивільненій із суспензії НА-AgNPs після центрифугування. Зразки 1b, 2b і 3b були оброблені ультразвуком. Зразок 1 (синтез I); зразок 2 (синтез II); зразок 3 (синтез III) – різні типи ГА

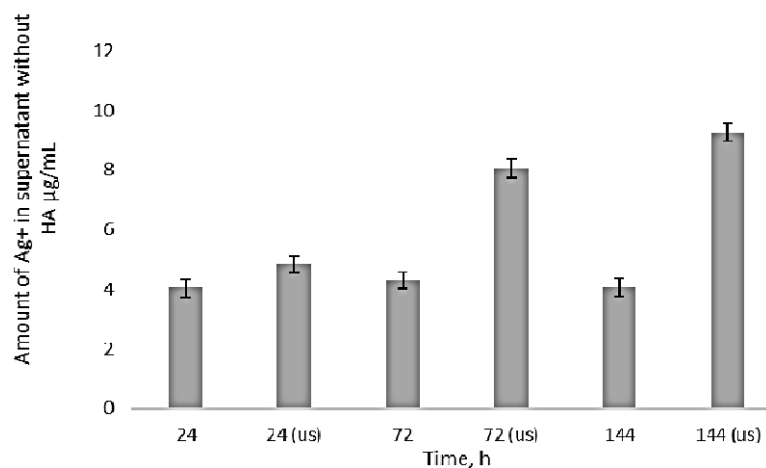


Рисунок 8 – Вивільнення іонів срібла з колоїдного розчину AgNPs

Вивільнення іонів срібла з AgNPs у розчин спостерігалось як в перші години, так і після 6 днів зберігання. Середня швидкість вивільнення становила не більше 4 мкг/мл за 24 години. Після попередньої обробки AgNPs в ультразвуковій ванні вивільнення іонів срібла збільшується. У присутності НА вивільнення іонів срібла з AgNP дещо знижується. При розведенні розчину НЧ Ag, який контактував з ГА в концентрації 60 мкг/мл, концентрація знизилась до 18,625 мкг/мл (у 3,2 раза), вивільнення іонів Ag зменшувалось у

2,9 раза. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що ГА не пригнічує вивільнення іонів Ag^+ з AgNPs, отже, така здатність може бути використана для пролонгованої антибактеріальної активності композитних матеріалів.

Кількість ГА у суспензіях оцінювали для характеристики адсорбційної здатності ГА, які були використані у дослідженні. Фіксований об'єм суспензії зважували, висушували до постійної маси і знову зважували. Результати дослідження наведено в таблиці 5.

Таблиця 5 – Концентрація ГА в приготованих суспензіях

Зразок	Об'єм суспензії, мл / Маса суспензії, г	Маса висушеного ГА, г	Концентрація ГА в суспензії, г/мл
1	12 / 12.10	0.485	0.04
2	12 / 12.68	1.582	0.13
3	12 / 12.57	0.997	0.08

Найменшу кількість ГА у суспензії спостерігали для кальційдефіцитного гідроксиапатиту, отриманого синтезом I. Кількість сухого осаду ГА у 2 рази менше, ніж для синтезу III, і в 3,2 рази менше, ніж у суспензії синтезу II. Оцінка сухого ГА у суспензії дає можливість знайти адсорбційну здатність ГА, синтезованого різними методами. Отримана адсорбційна здатність різних зразків ГА представлена в табл. 6.

Як видно з таблиці 6, усі синтезовані зразки ГА мають високу адсорбційну здатність (0,3-0,9 мг/г ГА). Найвищу адсорбційну здатність мають кальцій дефіцитні ГА (синтез I). Істотного процесу десорбції іонів срібла з HA-AgNPs не спостерігається. Найбільша кількість іонів Ag^+ десорбується з ГК, отриманого в синтезі II. Ультразвукова обробка зразків при десорбції істотно не вплинула на десорбцію.

Таблиця 6 – Адсорбція – десорбція іонів срібла зразками ГА з та без ультразвукової обробки

Зразок	Концентрація іонів Ag ⁺ у фільтраті після десорбції, мкг/мл	Адсорбція ГА, мг/г	Концентрація Ag ⁺ іонів у фільтраті після десорбції, мкг/мл	Десорбція Ag з ГА, мг/л
1a	1.36 ±0.05	0.8632±0.03	0.09±0.01	0.0021 ±0.001
1b	1.29±0.05	0.8667±0.03	0.12±0.01	0.0028 ±0.001
2a	0.44±0.05	0.2797±0.03	0.10±0.01	0.0071 ±0.001
2b	0.69±0.05	0.2759±0.03	0.12±0.01	0.0087 ±0.001
3a	0.13±0.05	0.4456±0.03	0.14±0.01	0.0063 ±0.001
3b	0.12±0.05	0.4459±0.03	0.10±0.01	0.0045 ±0.001

В. Вплив розведення та ультразвукової обробки на форму AgNP.

Підготовлені сети NP аналізували з вивченням морфології частинок за допомогою SEM-аналізу. Контрольні наночастинки мали морфологію куба з ядром наночастинки всередині. На сканограмі було видно покриття НЧ. Під час SEM візуалізації, AgNPs були добре дисперговані: без агломерації або агрегації частинок (рис. 9).

Ймовірно, це пов'язано з присутністю PVP, яке допомогло частинкам протистояти групуванню. Візуальне спостереження другого набору частинок виявило утворення кластерів внаслідок коагуляції, викликаній розрідженням або зникненням покриття. Зображення також показали, що AgNPs все ще були у формі наночастинок після обробки ультразвуком (рис. 9).

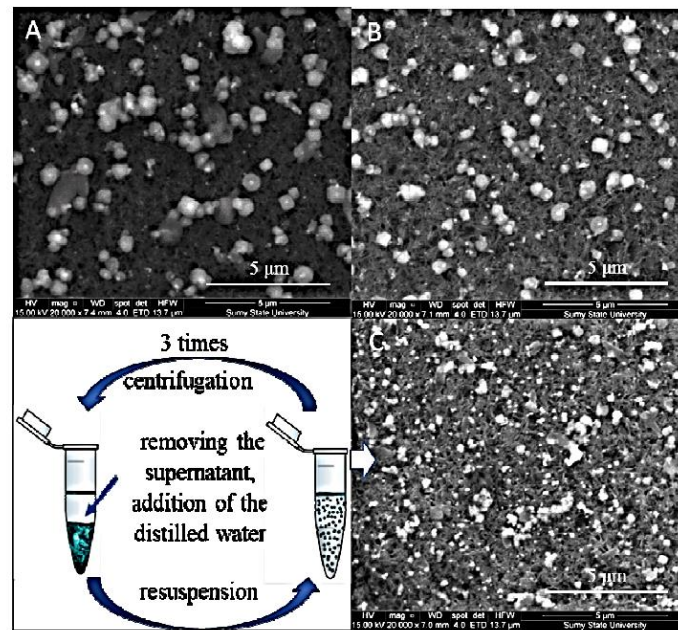


Рисунок 9 – SEM дослідження AgNPs А) вихідний розчин, В) вихідний розчин + ультразвук, С) 3 рази центрифугування – ресуспензійна обробка

С. Антибактеріальні результати

Завантаження НА з AgNPs використовується для забезпечення антибактеріальної активності отриманих матеріалів. Ефективність AgNPs проти *S. aureus* спостерігалася при концентраціях вище 100 мкг/мл (рис. 10а). У той же час порівняння ефективності супернатанту та осаду показало нижчу антибактеріальну активність супернатанту по відношенню до осаду (рис. 10b-9c). Час інкубації зразків істотно не впливав на їхню активність.

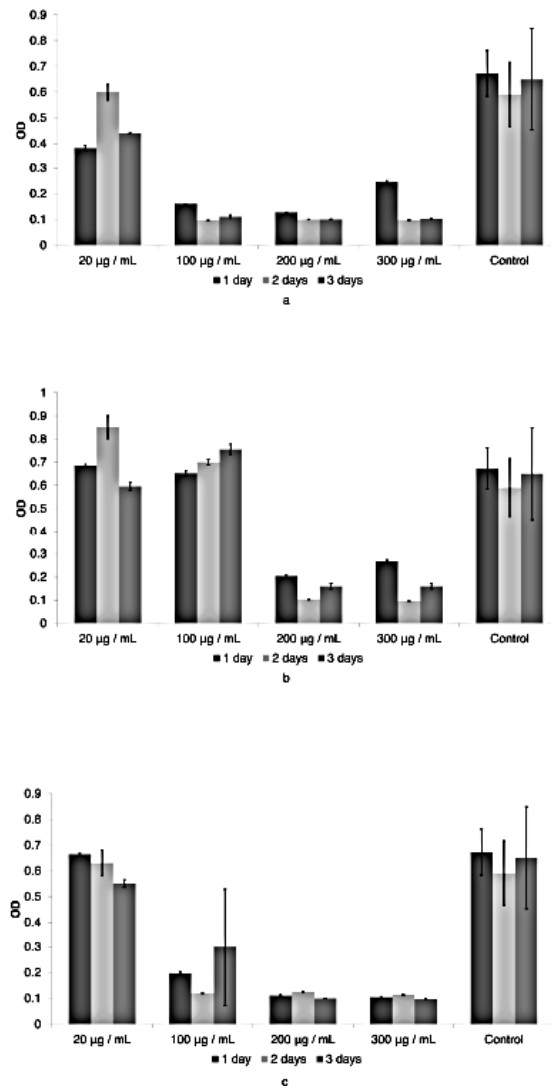


Рисунок 10 – Антибактеріальна ефективність AgNPs проти *S. aureus* (базовий розчин (a), супернатант (b), осад наночастинок (c))

У нашій попередній роботі [33] було продемонстровано, що ультразвукова обробка AgNPs підвищує їх антимікробну активність. Було припущено, що попередня обробка осаду наночастинок срібла та супернатанту ультразвуком може вплинути на їх антимікробну активність. Проте наш результат не підтвердив цю гіпотезу. Рисунок 11 демонструє неефективність ультразвукової обробки для зниження антимікробної активності супернатанту та осаду AgNPs. Навіть ми можемо спостерігати суперечливий ефект у випадку антибактеріальної активності супернатанту.

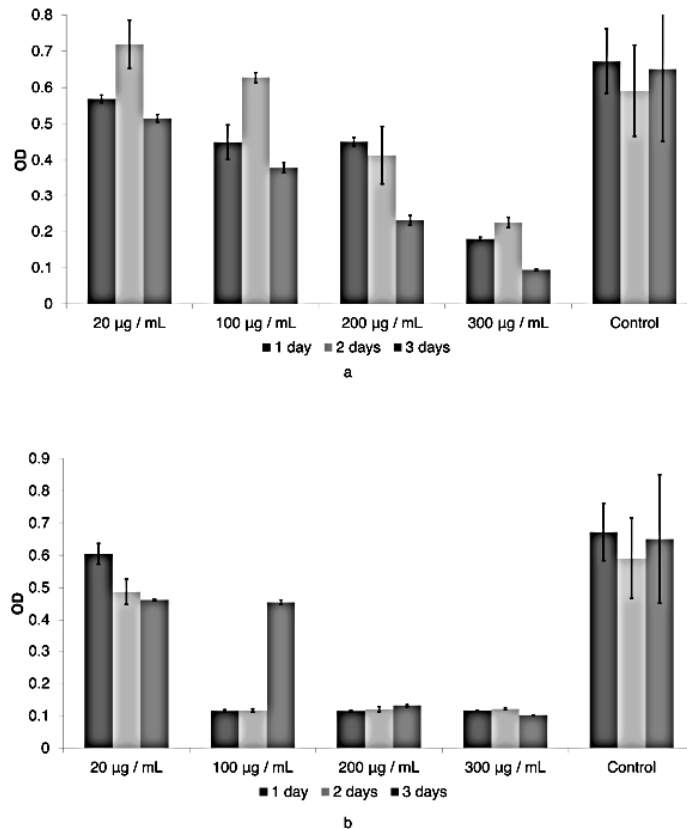


Рисунок 11 – Антибактеріальна ефективність AgNPs, оброблених ультразвуком, проти *S.aureus*, супернатант (а), осад наночастинок (б)

На наступному етапі ми оцінили антимікробну активність композитів AgNPs-НА. На рисунку 12 показано утворення зони затримки росту, яка оточує диск з композитами AgNPs-НА.

Впливу концентрації композитів на їх антимікробну активність не виявлено (зона інгібування становила 1-2 мм). Передбачається, що антибактеріальна активність AgNPs реалізується через контактні механізми та вивільнення іонів.

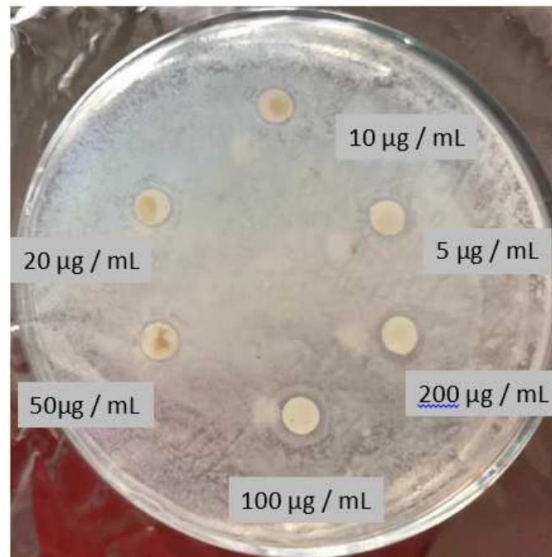


Рисунок 12 – Антибактеріальна ефективність композиту AgNPs-НА проти *S. aureus*

Наші результати підтвердили активацію обох видів антибактеріальної активності різною мірою. Основну роль в антибактеріальній активності досліджуваного композиту відіграє контактне інгібування.

2.2 Антибактеріальний вплив AgNPs на формування біоплівки *Enterococcus Faecalis*.

Ентерококи є умовно-патогенними бактеріями нормальної флори шлунково-кишкового тракту людини і тварин, і вони можуть викликати важкі інфекції при зниженні природних механізмів резистентності [34]. Інфекції, викликані ентерококами, все важче лікувати через їхню внутрішню та набуту резистентність до деяких антибіотиків, включаючи кліндаміцин, пеніцилін, аміноглікозиди та цефалоспорини. Таким чином, ці мікроорганізми мають селективну перевагу перед іншою фекальною флорою в стаціонарі, де активно застосовуються антимікробні препарати [35]. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) є одним із найбільш ізольованих видів серед клінічних зразків, і його часто виявляють у разі внутрішньолікарняних інфекцій. Бактерія є збудником сечовивідних шляхів, ранових інфекцій, ендокардиту, бактеріємії [35]. Основним чинником патогенності бактерій є здатність утворювати біоплівку,

яка підвищує резистентність до антибактеріальних засобів, що асоціюється з гіршим прогнозом. Крім того, біоплівка, що утворюється, сприяє захисту від імунної відповіді хазяїна і таким чином сприяє виживанню та персистенції патогенів [36]. Сьогодні не вистачає препаратів, спрямованих спеціально на бактеріальні біоплівки [37]. Тому розробка нових терапевтичних рішень із ефектом антибіоплівки є пріоритетом високого рівня. Наноматеріали є перспективними речовинами з антимікробною дією через їхні унікальні фізико-хімічні властивості, такі як надмалі розміри, велике співвідношення площі поверхні до маси та підвищена хімічна реакційна здатність [38]. В літературі є багато даних про визначення фізико-хімічні параметри наночастинок срібла (AgNPs) з особливостями синтезу. Однак відтворюваність різних методологій дуже низька [39], і пошук ефективного та надійного хімічного синтезу наночастинок срібла є гарячою темою в нанонауці. [40]. Виявлено, що антибактеріальні та антибіоплівкові властивості наночастинок срібла залежать від їх розміру, форми, концентрації та типу мікроорганізму [41] або архітектурних особливостей бактеріальної біоплівки [42]. Хоча кілька звітів показали антибактеріальну та антибіоплівкову активність AgNPs проти різних організмів [43], є кілька документів, пов'язаних з обробкою біоплівок *E. faecalis* AgNPs. N.S. Swidan взагалі виявили ефективність 1 мг/мл розчину AgNP проти ізолятів *E. faecalis* [44]. Однак в іншій роботі повідомлялося про неефективність 0,1% розчину AgNPs проти 4-тижневих біоплівок *E. faecalis* [45]. У нашій попередній роботі ми повідомили про ефективність хімічно синтезованих AgNP проти клінічних штамів *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* при низькій концентрації [46]. Крім того, мало уваги приділено морфологічним змінам у структурі клітин *E. faecalis*, оброблених AgNPs [45]. Таким чином, наше дослідження мало на меті оцінити вплив хімічно синтезованих наночастинок срібла проти *E. faecalis* у формі планктону та біоплівки з акцентом на структурні зміни в бактеріальних клітинах.

Матеріали та методи

А. Штами бактерій та умови культивування\ Наночастинки срібла.

Усі експерименти проводили з еталонним штамом *E. faecalis* B-7497 (Українська національна колекція мікроорганізмів, Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Поживні середовища (бульйон і ентерококовий агар) були придбані у Hi Media (Індія). AgNPs були хімічно синтезовані в присутності PVP як відновлювача згідно з раніше описаною методологією [47]. Основна концентрація срібла становила 3 г/л. **В.**

Антимікробна активність.

Антимікробну активність AgNP досліджували методом серійного розведення пробірок з визначенням МІК (мінімальної інгібіторної концентрації) та МВС (мінімальної бактерицидної концентрації) відповідно до міжнародних рекомендацій, наданих Клінічним і Лабораторним Інститутом стандартів [48]. Кожен дослід супроводжувався контролем стерильності поживного середовища та контролем росту мікроорганізмів. Усі тести проводили в трьох повторях.

С. Інгибування утворення біоплівки.

Утворення біоплівки оцінюють за допомогою аналізу Gentian Violet (GV) на полістирольних 96-лункових планшетах. З нічної культури *E. faecalis* готували бактеріальну суспензію в живильному бульйоні з концентрацією 10^6 КУО/мл. 180 мкл суспензій бактерій поміщали в кожну лунку 96-лункових полістирольних планшетів, що містили 20 мкл розчинів AgNPs при концентрації 1 МІС. Лунки, що містять лише бактерії, використовували як позитивний контроль, а лунки без бактерій використовували як негативний контроль. Планшети інкубували протягом 24 годин при 37 °С. Потім середовище з лунок видаляли і лунки тричі промивали PBS для видалення неприкріплених бактеріальних клітин. Після цього прикріплену біомасу фарбували 0,1% (мас./об.) генціанвіолетом протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Потім планшети тричі промивали 0,9% хлоридом натрію, сушили та додавали 200 мкл 80% об'ємного спирту на 2 хвилини для розчинення

зв'язаного барвника. Потім солюбілізований GV переносили на новий планшет і вимірювали оптичну густина за допомогою Multiskan FC Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) при 570 нм. Кожен тест повторювався шість разів. Для кожного ряду визначали середню OD.

D. Вплив AgNPs на встановлену масу біоплівки

Щоб вивчити вплив AgNPs на сформовану біоплівку *E. faecalis*, бактеріальну культуру інкубували протягом 24, 48 і 120 годин при 37 °C у полістирольних 96-лункових планшетах. Щодня змінювали живильне середовище на свіже. Через певний час AgNPs, розведені поживним бульйоном (200 мкМ) у концентрації 10, 20, 30 та 40 мкг/мл, додавали до лунок та інкубували протягом 24 годин при 37,0°C. Потім середовища видаляли з лунок і промивали PBS. Компоненти біоплівки, які були зафіксовані в лунках, фарбували та оцінювали, як описано раніше.

E. Дія наночастинок срібла на структури біоплівок.

Щоб оцінити вплив AgNPs на структуру біоплівки *E. faecalis*, ми провели скануючу електронну мікроскопію (SEM). Стерильні предметні скла (5x5 мм) поміщали в 24-лунковий планшет з живильним бульйоном і засівали *E. faecalis* у концентрації 5×10^5 КУО. Зразки інкубували протягом 1, 2 і 5 днів при 37 °C. Потім у кожному лунку додавали AgNPs у концентрації 10, 20, 30 та 40 мкг/мл та інкубували протягом 24 годин при 37 °C. Після цього предметні скла брали з культурального середовища та тричі промивали PBS для видалення планктонних клітин. Зразки фіксували шляхом занурення в 2,5% глутаровий альдегід на 30 хв при кімнатній температурі. Після цього зразки двічі промивали буфером і зневоднювали серією етанолу (v/v) у діапазоні від 50%, 70%, 90% до 96% протягом 30 хвилин при кімнатній температурі на кожному етапі. Зразки були висушені та напилені сріблом, щоб уникнути заряду під час SEM дослідження. Морфологію клітин і структуру біоплівки досліджували за допомогою мікроскопа SEO-SEM Inspect S50-B (виробництва Oxford Instruments plc).

F. Статистична обробка

Статистичну обробку результатів проводили непараметричним методом з визначенням похибки відносних величин та критерієм Манна Вітні за допомогою GraphPad. Різницю між групами вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Оцінка антибактеріальної ефективності AgNP проти *E. faecalis* виявила МІК та МВС 5,0 мкг/мл та 10 мкг/мл відповідно. Оскільки біоплівка має захисні бар'єри, впливати на неї складніше, ніж на планктонні мікроорганізми. Тому, щоб вивчити вплив наночастинок срібла на біоплівку, ми перевірили концентрації вище МІС. Відповідно до аналізу, AgNPs у концентраціях, що дорівнюють 0,5 МІС та 1 МІС, не пригнічують утворення біоплівки *E. faecalis* (рис. 13а). Не було статистично значущих відмінностей ($p = 0,25$ і $0,17$ відповідно для 0,5 МІС і 1 МІС) у прикріпленні бактерій до поверхні серед контрольних груп і груп, які отримували AgNPs. Результати аналізу дії НЧ Ag на 1-, 2- і 5-денні біоплівки в концентраціях 10, 20, 30 і 40 мкг/мл узагальнені на рис.13 (b,c,d). Виявлено достовірне зниження маси біоплівки в групах 1- та 2-денних біоплівок, оброблених AgNPs, порівняно з контрольною групою ($p \leq 0,05$).

Проте вплив НЧ Ag на 5-денну масу біоплівки не спостерігався ($p > 0,05$). Для оцінки впливу НЧ Ag на морфологічні особливості біоплівки *E. faecalis* було використано дослідження SEM (рис. 14). Архітектуру біоплівки в обох групах (контрольної та обробленої) оцінювали за допомогою сканограм, отриманих після першого, другого та п'ятого днів інкубації.

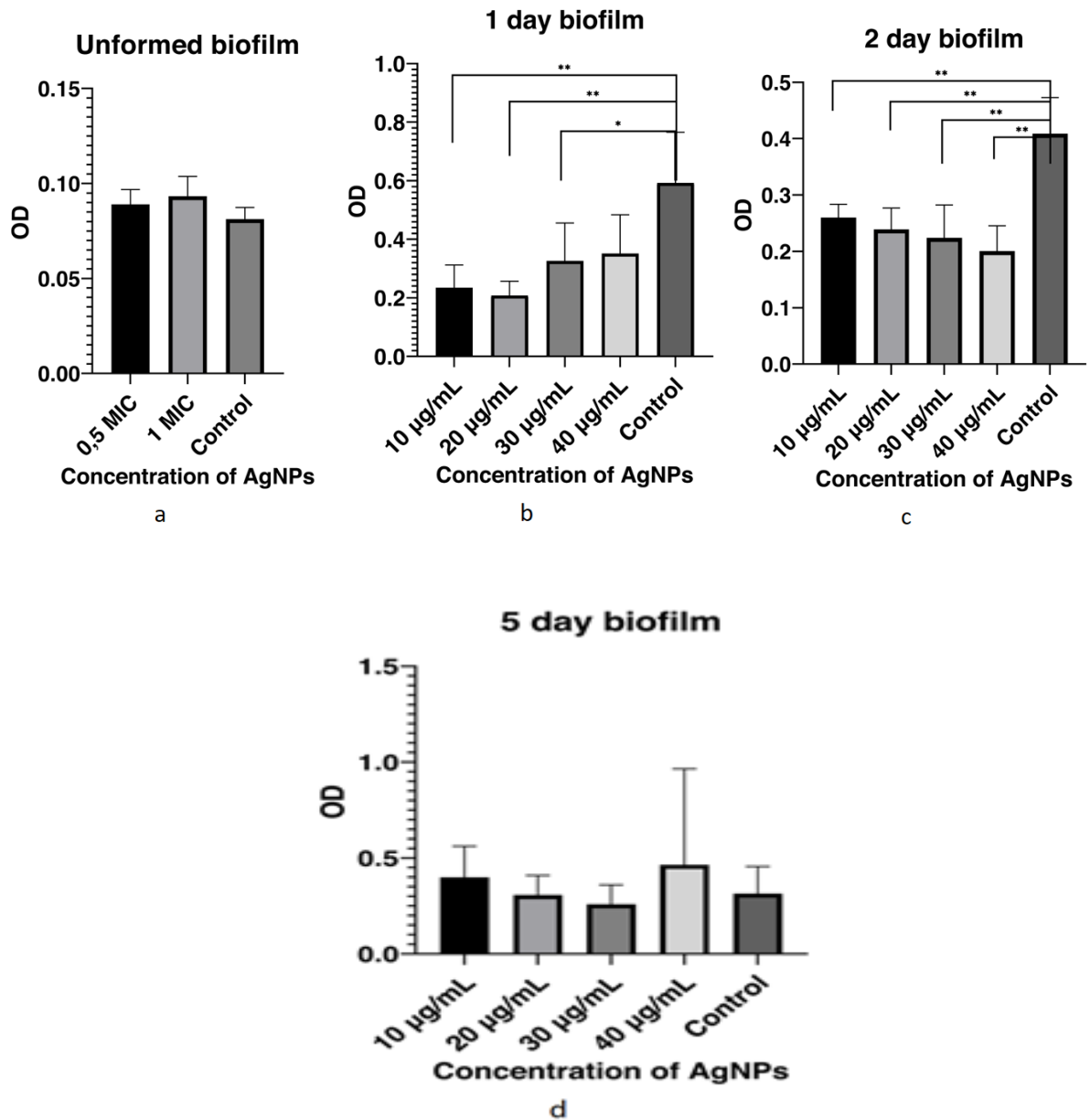


Рисунок 13 – а - Інгібування утворення біоплівки *E. faecalis* наночастинками срібла; b,c,d - Антибіоплівкова активність тестованих наночастинок срібла проти *E. faecalis* протягом 1, 2 та 5 днів біоплівки відповідно.

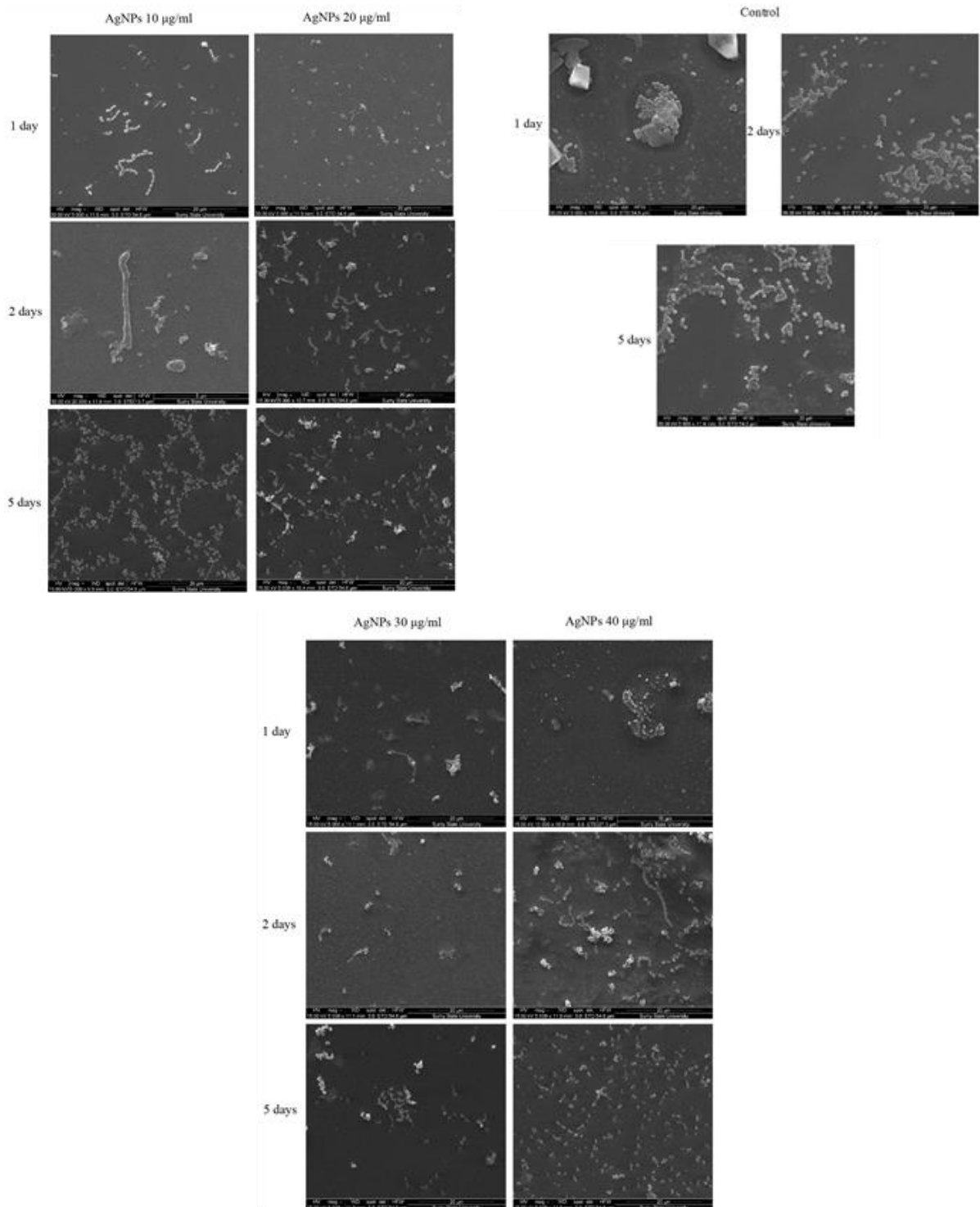


Рисунок 14 – SEM мікрофотографії біоплівки *E. faecalis* 1-го дня, 2-го дня та 5-го дня після дії AgNPs при 10-40 мкг/мл та контрольних груп

Клітини *E. faecalis* утворювали біоплівки, що формувались шляхом адгезії (седиментації), фіксації, коагрегації та дисперсії [44]. Клітини контрольного штаму мають гладку поверхню та представлені кокобацилами.

Після першої доби інкубації контрольний штам утворював моношарові мікроколонії з матрицею позаклітинних полімерних речовин. На другий день інкубації колонії мав з'єднані ланцюжки, в результаті чого утворюється складна біоплівка. Однак бактерії не змогли повністю покрити поверхню. Ми показали, що клітини *E. faecalis* повільно колонізували поверхню скла в контрольній групі. На 5-й день експерименту спостерігали розріджену біоплівку *E. faecalis* з ділянками старої культури. Підвищення концентрації AgNPs продемонструвало негативний вплив на здатність патогенів утворювати біоплівку (рис. 13). Досліджені 1- та 2-денні біоплівки руйнувались за допомогою нанесених AgNPs. Ефект антибіоплівко утворення значно посилювався зі збільшенням концентрації AgNPs порівняно з контрольною групою бактерій. Вплив наночастинок на 5-денні біоплівки відображався в порушеній морфології бактеріальних клітин при скануючому електронному мікроскопічному аналізі, тоді як аналіз Gentian Violet не виявив статистично значущої різниці в масі біоплівки в експериментальній і контрольній групах, як показано на рисунку 13. SEM-аналіз одноденної біоплівки, обробленої AgNPs (10 мкг/мл), виявив клітини, згруповані в ланцюги, тоді як у контролі ми спостерігали групи клітин зібрані у конгломерати (рис. 14). SEM чітко підкреслює інгібування утворення біоплівки. На рисунку 14 показано, що дія AgNPs на 2-денні біоплівки спричинила більш виражені зміни, включаючи ознаки утворення бульбашок і більш мінливу форму клітин із усадкою та руйнуванням мембрани. Кількість клітин на поверхні також зменшується. Морфологічні зміни біоплівки чітко проявляються на 5-й день після обробки. Спостерігається витік, що спричиняє різноманітну форму клітин та їх усадку, і клітини значно відрізняються порівняно з клітинами у формі коко-бацил, які спостерігаються без обробки НЧ. Аналіз отриманих зразків продемонстрував агреговані кластери імовірно мертвих клітин.

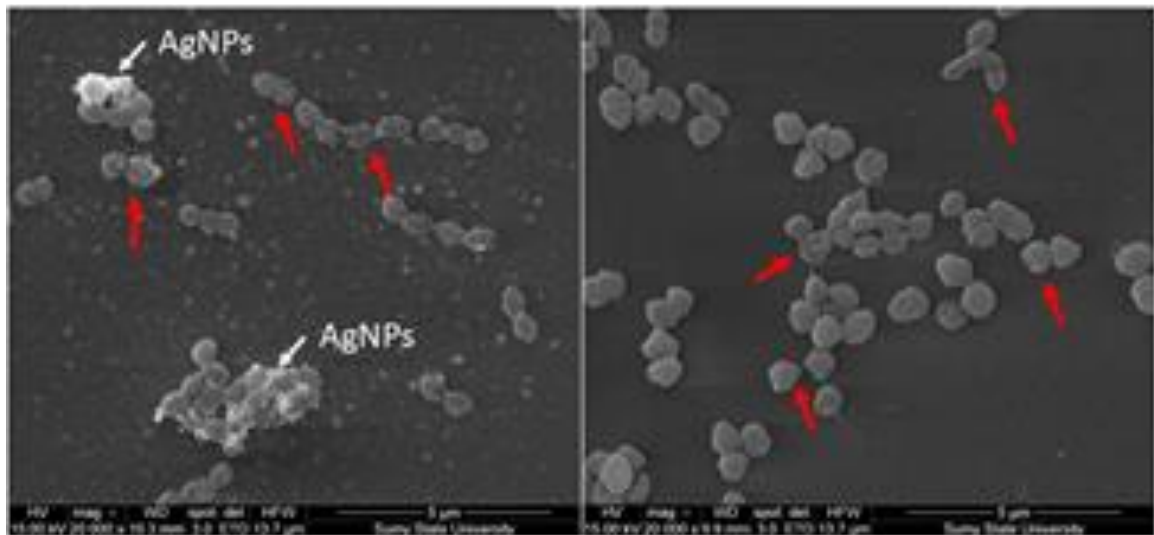


Рисунок 15 – SEM-зображення, що показують вплив AgNPs на морфологію бактеріальних клітин

Рисунок 15 чітко демонструє, що обробка AgNPs вплинула на форму клітини. Біоплівка стає менш регулярною, а покриття поверхні зменшується (червона стрілка вказує на морфологічну зміну клітини). SEM-зображення свідчать про фізичне пошкодження бактеріальних клітин, оброблених AgNPs, у порівнянні з необробленими клітинами. На поверхні бактерій видно поглиблення та пори, що призводить до витoku цитоплазми та уламків, що свідчить про втрату тургорного тиску. Візуалізовані морфологічні зміни бактеріальної клітини, ймовірно, пов'язані з порушенням зовнішньої мембрани, тоді як аналіз витoku везикул може свідчити про порушення цитоплазматичної мембрани. Пошкодження клітини може бути наслідком прямого прикріплення AgNPs до клітинної стінки та клітинної мембрани бактерії з подальшим проникненням у клітину [49].

3 МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ МІНЕРАЛІЗОВАНИХ ТКАНИН

3.1 Морфологічне дослідження тканини твердої мозкової оболонки з нанорозмірною кальцифікацією

Внутрішньочерепна кальцифікація може бути проявом як фізіологічних (вікових) так і патологічних процесів у структурах головного мозку. Патологічні кальцифікати можна поділити на декілька груп: пухлинні, дистрофічні, інфекційні, метаболічні, судинні, запальні, токсичні та вроджені [50].

За даними комп'ютерної томографії (КТ) біомінерали спостерігаються в порожнині черепа у 1% молодого населення та у 20% людей похилого віку. Проте за даними аутопсій поширеність кальцифікатів, в тому числі мікроскопічних, значно більша та досягає 72%. Клінічно вони можуть бути як безсимптомними знахідками, так і причиною різноманітних неврологічних та когнітивних порушень [51].

Кальцифікація твердої мозкової оболонки (ТМО) за даними КТ спостерігається у 12,5% дорослого населення та більш характерна для чоловіків середнім віком 53,1 роки [52]. Найчастіше кальцифікати локалізуються в серпі мозку (26,8%), петроклиновидній зв'язці (13,2%) та наметі мозочку (6,8%) та можуть бути проявом вікових змін [53].

У дітей біомінералізація ТМО зустрічається вкрай рідко (менше 1% серед обстежених пацієнтів за допомогою КТ) та частіше локалізується в наметі мозочку. Причому в кожному випадку в анамнезі були краніотомія, черепно-мозкова травма або головний біль. Кальцифікація ТМО в молодому віці має стати приводом для диференційної діагностики з пухлинними процесами, наслідками субдуральних та епідуральних крововиливів, порушенням кальцій-фосфорного метаболізму [54].

Також явище патологічної біомінералізації є однією із особливостей пухлин мозкових оболонок. При внутрішньочерепній локалізації кальцифікація спостерігається у 20-25% менінгіом [55].

На даний час немає однозначної думки про походження та біологічне значення кальцифікації пухлин мозкових оболонок. Є припущення, що вона пов'язана з дистрофічною кальцифікацією в процесі дегенерації пухлинних клітин та слугує бар'єром проти подальшого поширення пухлини, а тому є позитивним прогностичним маркером [56].

Після нейрохірургічних оперативних втручань необхідно забезпечити повне закриття дефекту ТМО, щоб мінімізувати ризики цереброспінальних фістул, інфекцій, гриж головного мозку, кортикальних рубців і спайок [57]. Є дані про використання наноматеріалів для вирішення цієї проблеми [58].

Вивчення морфологічних та фізіологічних особливостей ТМО створить основу для розробки нових матеріалів для біопластики та регенеративної медицини [59,60]. Отримання нових наукових даних про стан мінералізованої тканини ТМО в нормі та в умовах пухлинного росту також може сприяти покращенню діагностики та лікування пухлин центральної нервової системи.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження було схвалено Комітетом з етики Навчально-наукового Медичного інституту Сумського державного університету (протокол 4/02, 09.02.2022).

В протокол дослідження увійшло 30 зразків ТМО, отриманих під час аутопсій у Патологоанатомічному відділенні Сумської обласної лікарні. Тканину виділяли з ділянки falx cerebri (рис. 15А), а потім фіксували її в 10% розчині формаліну протягом 24 годин. Після цього були вирізані смужки розмірами 1,5x0,4x0,1 см та проведене фарбування гематоксиліном-еозином.

За результатами гістологічного дослідження ми розділили зразки на дві групи (по 15 зразків у кожній): з ознаками біомінералізації (група М) і контрольну (група С).

Для підтвердження наявності сполук кальцію зразки забарвлювалися гістохімічними методами. Методом фон Косса було виявлено відкладення кальцію за допомогою розчину нітрату срібла, який відновлюється під дією сильного освітлення і осідає на відкладеннях кальцію у вигляді металевого срібла.

Методом алізаринового червоного було виявлено осадження кальцію розчином алізаринового червоного (корекція рН до 6,3-6,5 за допомогою NH_4OH).

Була проведена скануюча електронна мікроскопія на SEO-SEM Inspect S50-B з роздільною здатністю 10 нм. Дані про елементний склад ми отримали з аналізу *EDX* спектрів, активованих електронним зондом. Обробку спектру проводили стандартним програмним забезпеченням системи мікроаналізу.

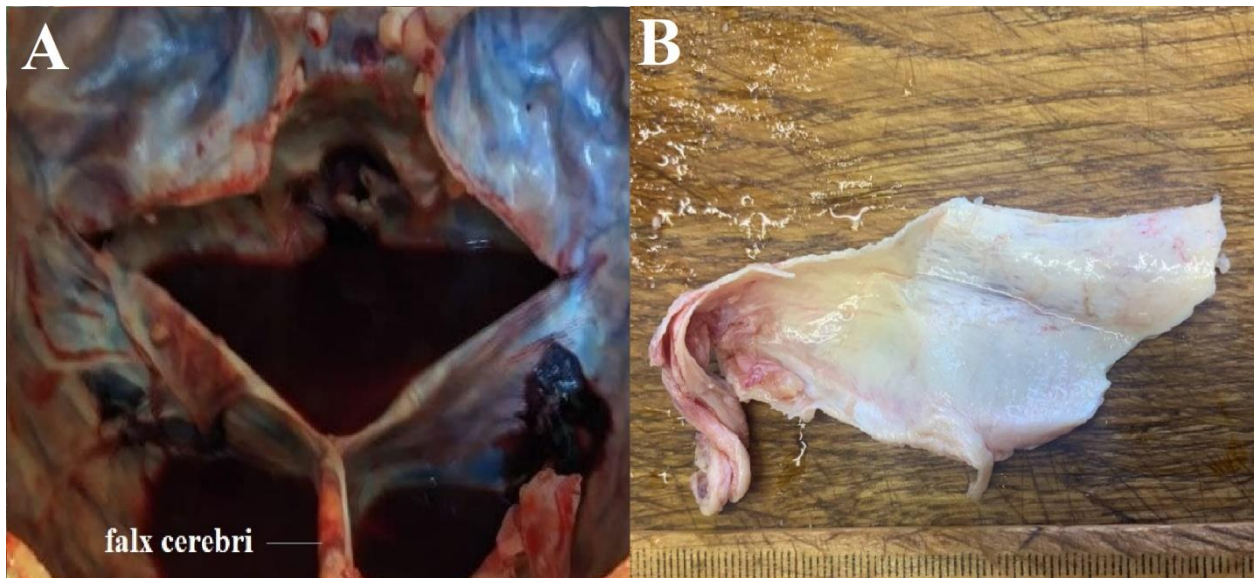


Рисунок 16 – Макроскопічне дослідження тканини твердої мозкової оболонки: А – ділянка falx cerebri (вказано стрілкою); В – тканина ТМО макроскопічно

Гістологічне та гістохімічне дослідження

Макроскопічне дослідження не дало достатньої візуальної інформації про наявність біомінеральних утворень (рис. 16В). Зразки були розподілені на групи за результатами гістологічного дослідження (фарбування гематоксилін-еозином).

У 15 зразках (50%) тканини твердої мозкової оболонки виявлено ознаки біомінералізації у вигляді утворень неправильної форми з нерівними контурами різного розміру (рис. 17А). Інші 15 зразків (50%) не мали таких ознак (рис. 17В).

Фарбування тканини ТМО алізариним червоним підтвердило наявність сполук кальцію (оранжево-червоний колір) та неорганічного заліза (фіолетовий колір) у всіх зразках групи М (рис. 18А). Вони були дифузно розподілені по тканині. Фарбування зразків групи С алізариним червоним (рис. 18В) не підтвердило наявність кальцифікатів.

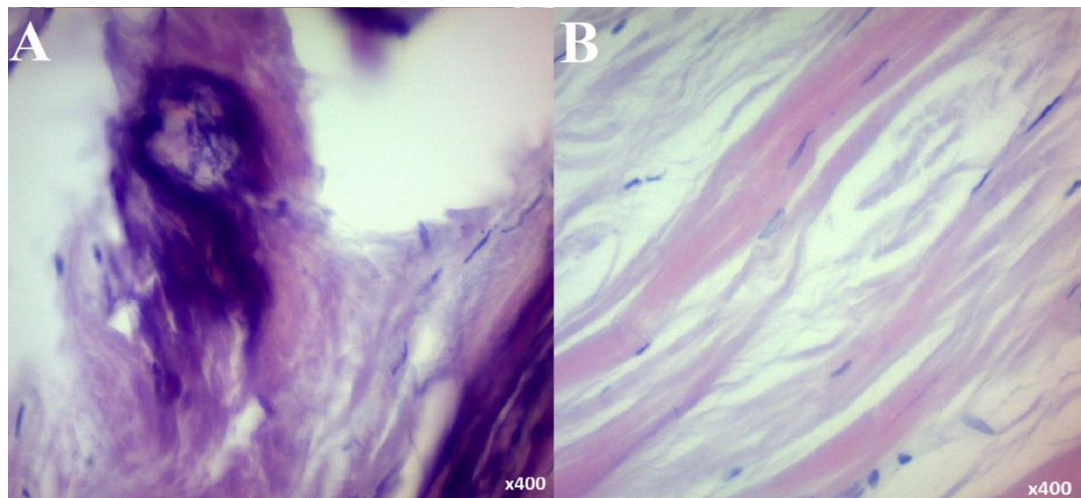


Рисунок 17 – Гістологічне дослідження тканини твердої мозкової оболонки:

А – група М; В – група С.

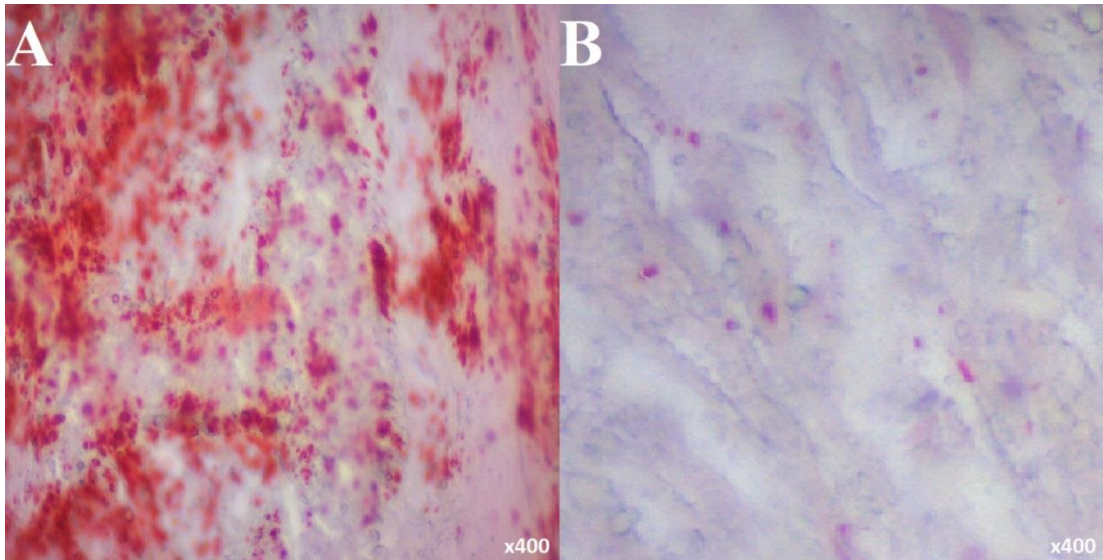


Рисунок 18 – Забарвлення тканини твердої мозкової оболонки алізариновим червоним: А – група М; В – група С.

За допомогою фарбування зразків ТМО за методом фон Косса було встановлено, що всі зразки групи М містили сполуки фосфату кальцію (рис. 19А). Зразки контрольної групи кальцифікатів не містили (рис. 19В).

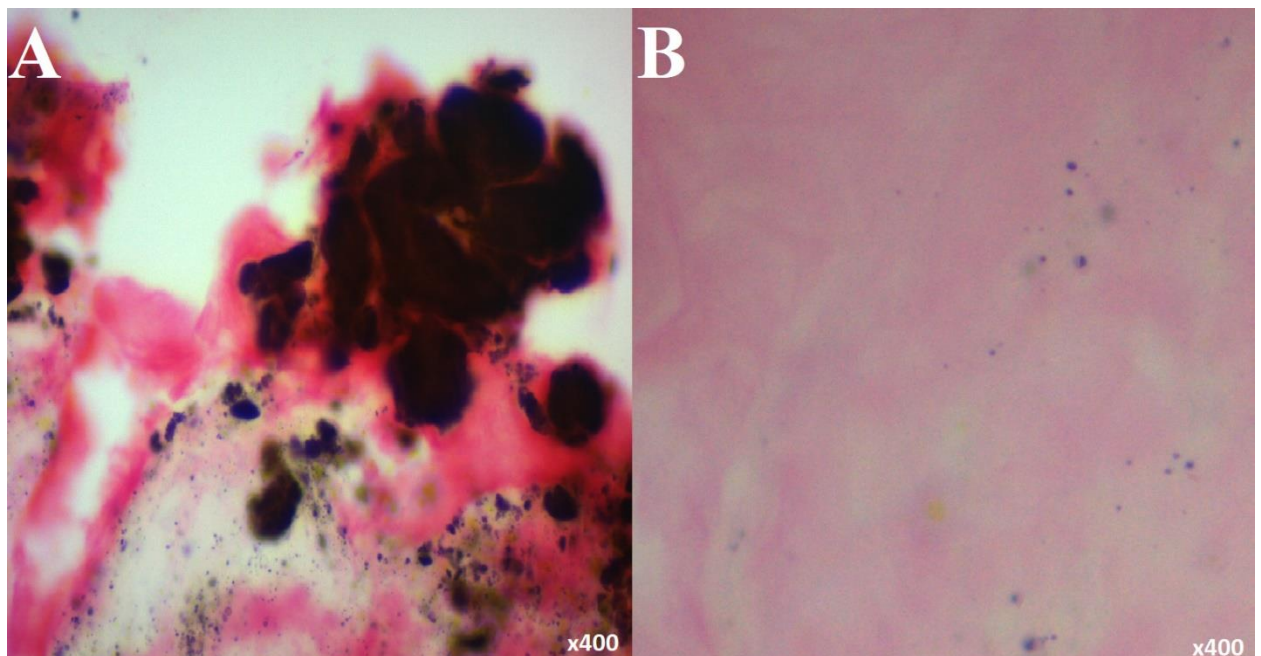


Рисунок 19 – Забарвлення тканини твердої мозкової оболонки методом фон Косса. А – група М; В – група С.

Скануюча електронна мікроскопія

За результатами досліджень методом скануючої електронної мікроскопії встановлено, що кальцифікати представлені округлими включеннями в 11 зразках (36,6%) групи М (рис. 20А).

Їх кількість коливалася від десятків до сотень. У середньому розміри кальцифікатів ТМО коливалися від 1 до 50 мкм. Розмір найдрібніших кальцифікатів досягав порядку десятків нанометрів, що може відповідати розміру наночастинок.

У спектрах EDX основними хімічними лініями є Са та Р. Співвідношення ліній Са та Р відображає особливості гідроксиапатиту $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (рис. 20В).

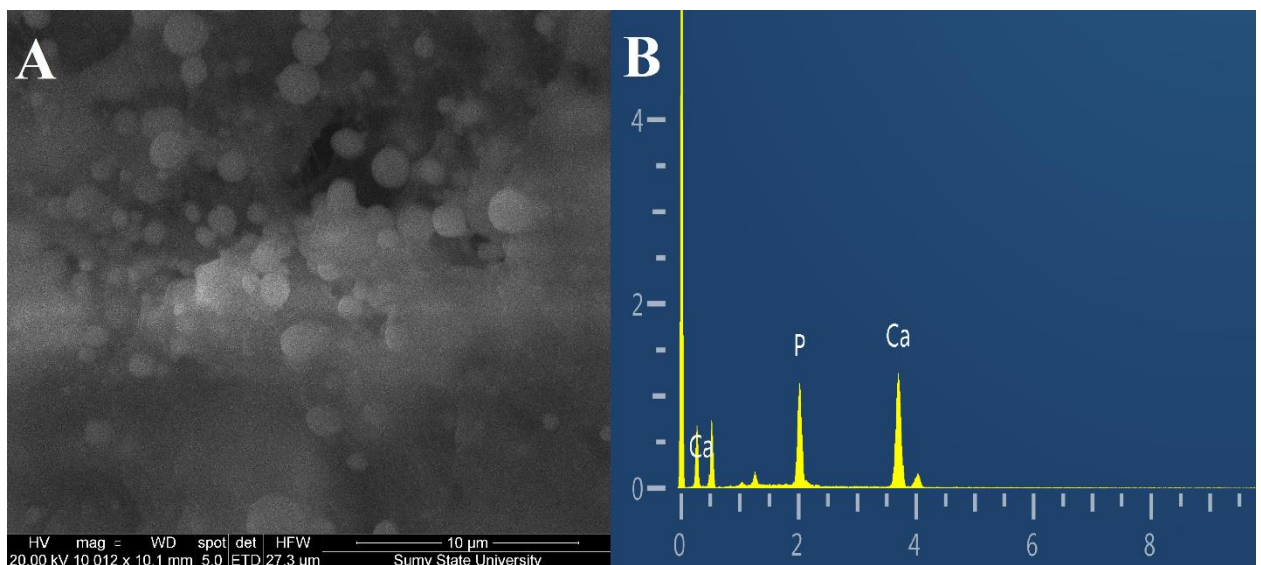


Рисунок 20 – Скануюча електронна мікроскопія тканини твердої мозкової оболонки. А – тканина ТМО, збільшення у правому нижньому куті; В – EDX спектр тканини ТМО.

Відповідно до співвідношення Са/Р із спектрів рентгенівського мікроаналізу та карт розподілу елементів (рис. 20), мінерал має кальцієво-фосфатний (апатитовий) склад. Згідно з картами розподілу значний вміст кисню в місцях кальцифікації пов'язаний з фосфатною групою апатиту (PO_4).

Дуже малий розмір кальцинатів ускладнює візуалізацію їх на карті розподілу елементів.

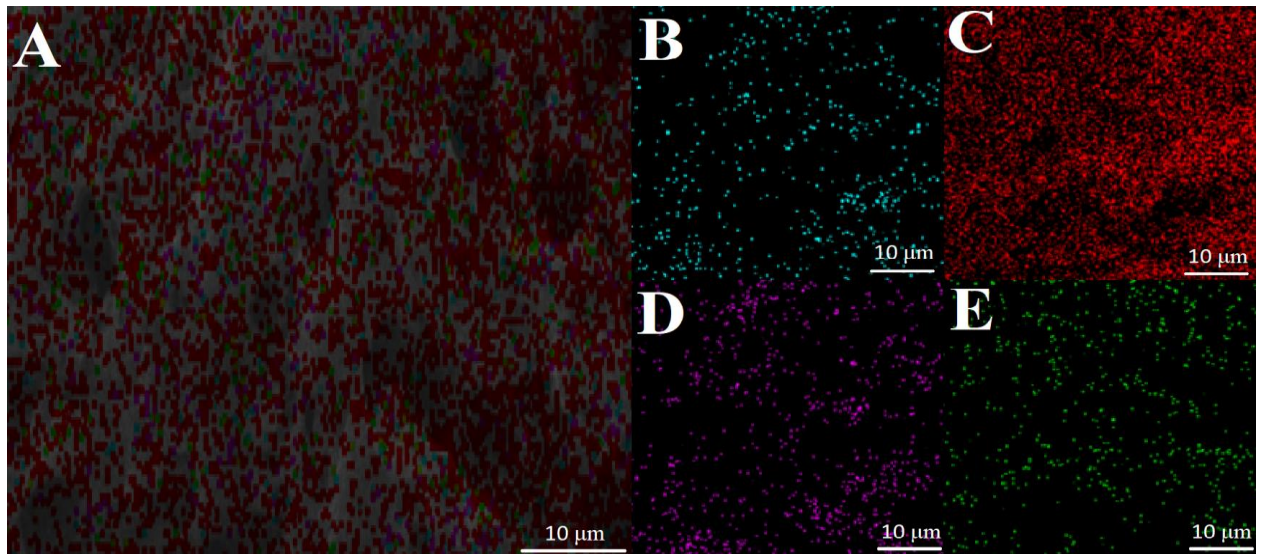


Рисунок 21 – Карта розподілу елементів при скануючій електронній мікроскопії тканини твердої мозкової оболонки: А – всі іони. В – синій колір позначає іони фосфору. С – червоний колір позначає іони вуглецю. D – фіолетовий позначає іони кальцію. Е – зелений позначає іони кисню

Кальцифікація ТМО є звичайною знахідкою при КТ та гістологічних дослідженнях. А у випадках пухлинного процесу може досягати 100% (псаммоматозна менінгіома). Але між цими кальцифікатами є різниця, яка може допомогти в диференційній діагностиці. На нашу думку, кальцифікація може слугувати раннім маркером виявлення пухлинного процесу в мозкових оболонках.

Кальцифікована тканина ТМО зазвичай є тісною комбінацією волокнистої сполучної тканини та біомінеральних композитів і є оптимальною біонічною моделлю для створення біоматеріалів.

Більшість нормальних зразків ТМО містять біомінеральні відкладення. У всіх цих випадках відсутні клінічні прояви і патології, пов'язані з порушенням кальцієво-фосфорного обміну.

За кристалохімічним і фазовим складом біомінерали ТМО (група М) відповідають фосфату кальцію у формі гідроксиапатиту. У середньому розміри кальцифікатів ТМО коливаються від 1 до 50 мкм. Розмір найдрібніших кальцинатів досягає порядку десятків нанометрів, що може відповідати розміру наночастинок.

3.2 Морфологічне дослідження тканини раку яєчників з нанорозмірною кальцифікацією

Рак яєчників є найпоширенішою причиною смертності жіночого населення серед онкологічних захворювань [61]. Високі показники смертності раку яєчників характеризуються низькою інформативністю скринінгових методів діагностики та безсимптомним перебігом [62]. Однією з основних гістологічних форм епітеліального раку яєчників є серозна карцинома [63]. Серозні карциноми яєчників поділяються на low- та high-grade [64]. Одним з клініко-морфологічних діагностичних критеріїв серозних карцином яєчників є псаммомні тільця (ПТ). ПТ являють собою кальциновані структури з ламелярною будовою [64,66]. Розвиток ПТ починається на ранніх етапах канцерогенезу, що має важливе значення саме в ранній діагностиці пухлин яєчників [66,67]. Частота виникнення даних ламелярних тілець сягає 100 % та 50 % для low- та high-grade серозних карцином яєчників відповідно [67,68]. Також встановлено, що ПТ розміром більше 200 μm візуалізуються при ультразвуковому дослідженні [69].

Метою нашої роботи було вивчення нано-кристалічної структури псаммомних тілець серозної карциноми яєчника для практичного використання у діагностиці.

Ми проаналізували 30 зразків серозних карцином яєчників з використанням гістологічних, імуногістохімічних та електронно-мікроскопічних методів дослідження.

Аналіз зображень гістологічного дослідження демонструє наявність ПТ у пухлинній тканині яєчника з варіацією кількості від 1 до 200 одиниць.

Аналіз морфометричних характеристик ПТ на основі зображень гістологічних та імуногістохімічних методів досліджень демонстрував коливання розмірів ПТ від 12.6 до 493.7 мкм (Рис. 22).

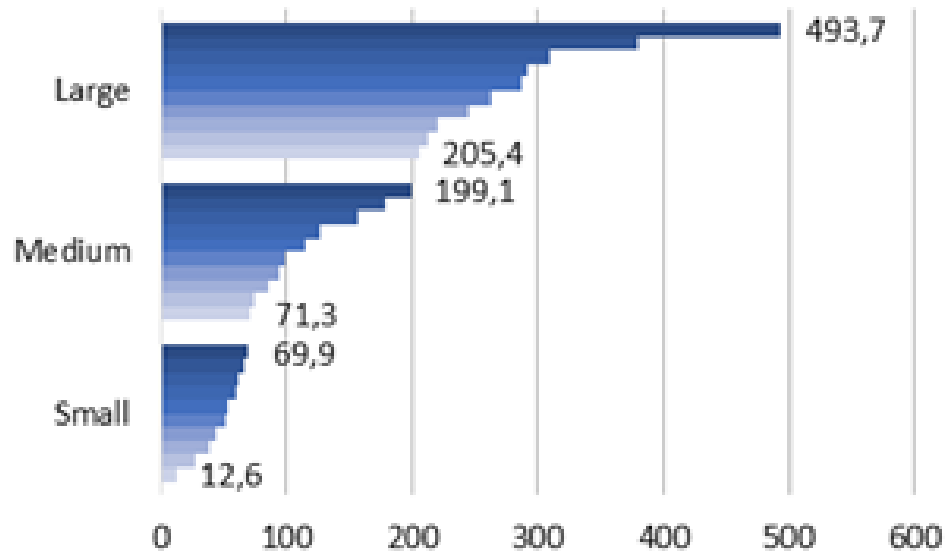


Рисунок 22 – Розподіл ПТ за розміром

ПТ переважно локалізувались у основі папілярних розростань серозної карциноми яєчників та детриті пухлинної тканини. Значна кількість ПТ знаходилася у товщі сполучної тканини пухлинних вузлів, а також прилеглої інтактної тканини яєчників. Навколо ПТ виявлялися залишки судинних стінок капілярів. ПТ мали ламелярну структуру, часто були представлені у вигляді фрагментів та уламків, які зберігали первинну структуру біомінерала (рис. 23А).

При імуногістохімічному дослідженні було встановлено накопичення OPN (остеопонтин) та ОС (амілоїд) на поверхні біомінеральних утворень. OPN покривав поверхню кальцифікатів з більш інтенсивним накопиченням по краях та між ламелами PBs (рис. 23В).

На основі цього, ми можемо говорити про наявність гідроксиапатиту в структурному складі ПТ. Накопичення ОС візуалізувалось на поверхні ламелярних структур із значно вищою інтенсивністю по периферії що свідчить про вміст білкового компоненту в структурі ПТ (рис. 23С).

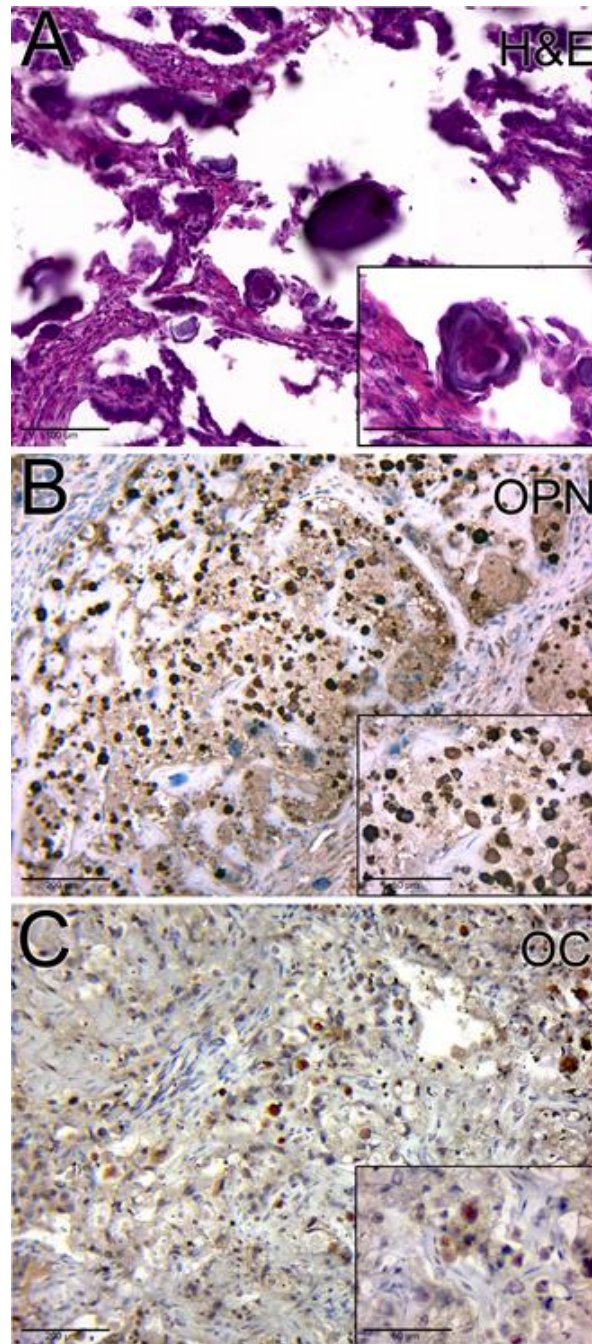


Рисунок 23 – ПТ серозних карциномаєчників. Гістологічне дослідження – забарвлення гематоксилін-еозин. Імуногістохімічне дослідження з використанням антитіла проти остеопонтину (B) та антитіла проти білка амілоїду (C)

ПТ за своєю будовою складаються з ламел та пластинчастого шару, які розташовані у послідовному порядку. Дана послідовність може свідчити про циклічність процесів формування ПТ. Середня товщина пластинчастого шару становила 3.7 мкм (± 0.17), а середня товщина ламел дорівнювала 0.65 мкм (\pm

0.02). Встановлено, що товщина пластинчастого шару має прямий сильний кореляційний зв'язок з розмірами ПТ ($r = 0.79$; $p < 0.001$), що може свідчити про етапність формування даних тілець (Рис.24). В той же час, товщина ламел має дуже слабкий кореляційний зв'язок з розмірами ПТ ($r = 0.1$; $p > 0.05$). Товщина ламел та пластинчастого шару також має дуже слабкий кореляційний зв'язок ($r = 0.08$; $p > 0.05$).

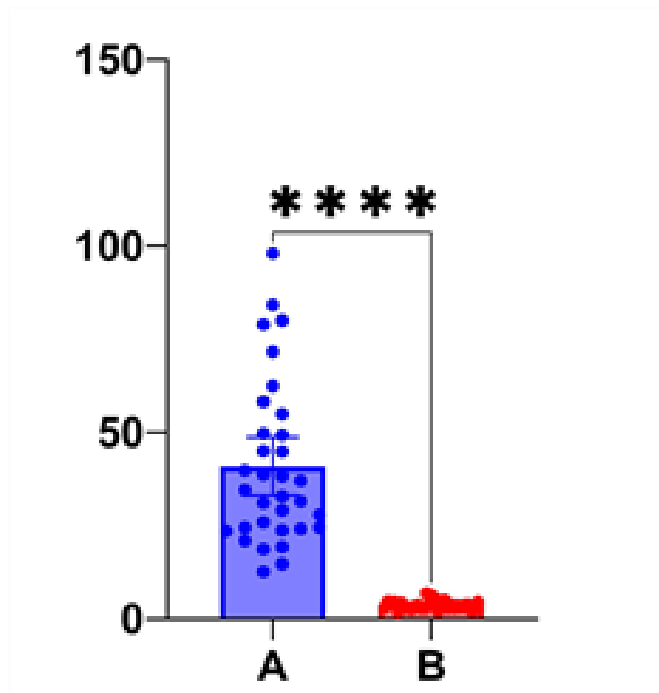


Рисунок 24 – А – розмір ПТ. В – товщина пластинчастого шару

Загалом, PBs відповідно до розміру можна розділити на 3 групи: великі – більше 200 μm (видимі при УЗД дослідженні), середні – 71 - 199 μm та дрібні – розміром до 70 μm .

За допомогою використання скануючої електронної мікроскопії (SEM) було встановлено, що PBs являють собою часточки різного розміру, круглої форми з візуалізацією пластинчастих структур, так званих нашарувань (рис. 25А). В EDX спектрах були лінії Ca та P. Співвідношення інтенсивності яких відображало характерні ознаки гідроксиапатиту (рис. 25В).

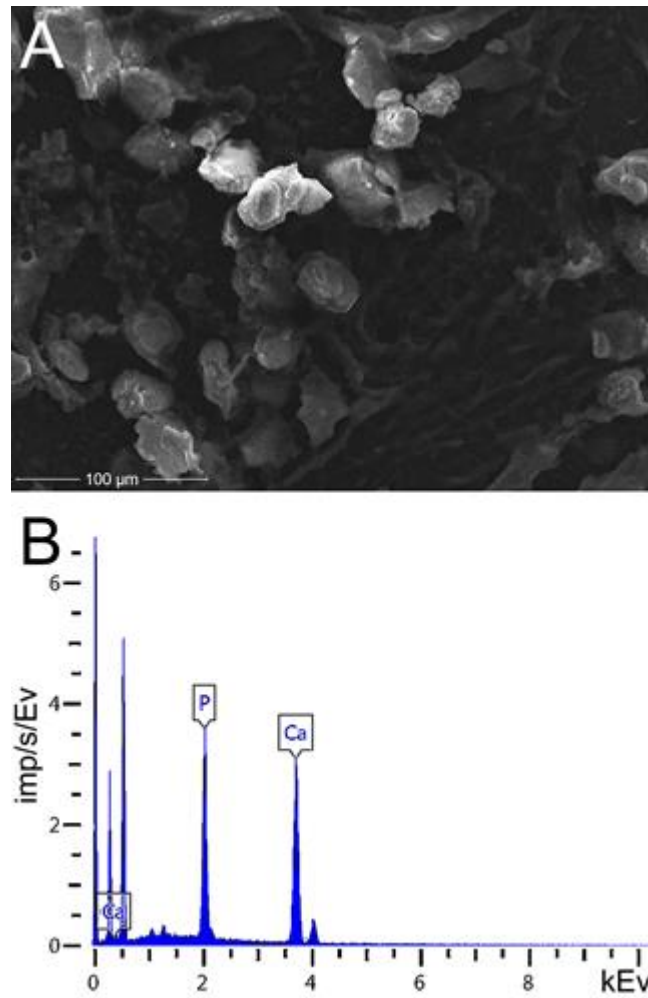


Рисунок 25 – А – Скануюча електронна мікроскопія (СЕМ). В – EDX спектр псаммомних тілець серозних карцином яєчників

За даними карт розподілу елементів (рис. 26) встановлено накопичення кальцію (Ca), фосфору (P) та кисню (O) в місцях локалізації кальцифікованих частинок. Щільність розподілу Ca та P має тенденцію до згасання інтенсивності накопичення з центру до периферії, що свідчить про різну зрілість кальцій-фосфатних сполук. Відмічався рівномірний розподіл вуглецю (C) по полю скануючого зразка з відсутніми ознаками накопичення в місцях локалізації біомінералів.

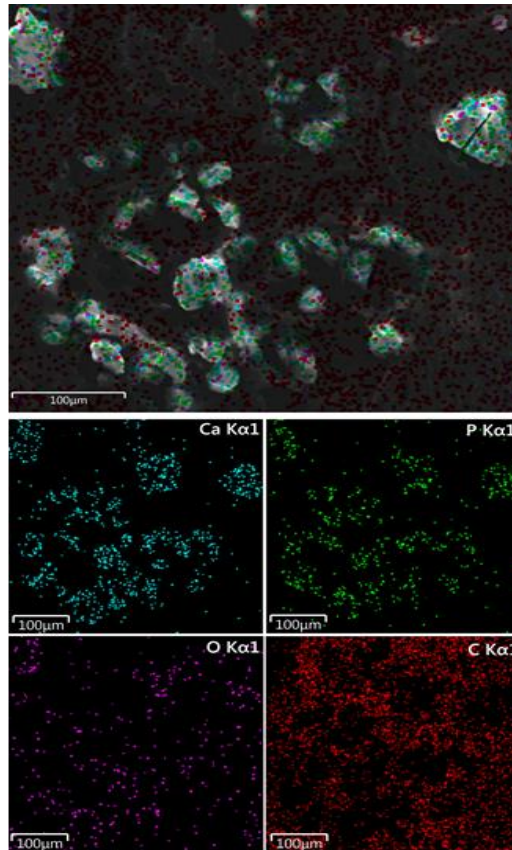


Рисунок 26 – Фізико-хімічне дослідження кальцифікатів серозних карцином яєчників за допомогою ЕДС-картування: червоний – вуглець, фіолетовий – кисень, зелений – фосфор, голубий – кальцій

Отже, на основі проведених досліджень встановлено, що кількість ПТ у пухлинній тканині яєчника варіює від 1 до 200 одиниць. Розміри їх коливаються від 12.6 до 493.7 мкм. У ході співставлення результатів ультразвукового та морфологічного дослідження встановлено, що ПТ можна розділити на 3 групи за розміром: великі – більше 200 мкм (які візуалізуються при УЗД), середні – 71 - 199 мкм та дрібні – розміром до 70 мкм (нанокристали). ПТ за своєю будовою складаються з ламел та пластинчастого шару. Середня товщина ламел дорівнює 0.65 мкм (± 0.02), а товщина пластинчастого шару – 3.7 мкм (± 0.17). Виявлено сильну кореляційну залежність товщини пластинчастого шару від розмірів ПТ ($r = 0.79$; $p < 0.001$). Встановлено, що до складу ПТ входять білки. Фазово-кристалічна структура

PBs представлена сполуками кальцію та фосфору, співвідношення яких відповідає структурі гідроксиапатиту.

Враховуючи нанокристалічну структуру та морфометричні характеристики PBs, даний патерн може бути використаний в практичній діяльності з метою ранньої діагностики серозних карцином яєчників.

ВИСНОВКИ

1. Огляд літературних джерел представляє розуміння ПЕО процесу як сучасного перспективного методу створення антикорозійних покриттів з біоактивними властивостями. Окрім того, це один з ефективних методів для обробки поверхні біодеградучих матеріалів, наприклад Mg. Однак для такого типу матеріалу лімітуючим є використання лужних електролітів, що пов'язано з високою реакційною здатністю магнію.

За рахунок комбінації складу електроліту та додавання частинок можна розширити можливості ПЕО. Такі модифікації, використання суспензій будуть впливати на фізико-хімічні властивості покриття та біосумісні можливості. Сучасним напрямком є використання срібла у вигляді наночастинок протягом анодизації. Таким чином такі поверхні можна розглядати як високоперспективні в боротьбі з періімплантаційними інфекціями.

2. В роботі досліджено адсорбційну та десорбційну здатність різних зразків ГА до AgNPs. Усі зразки демонструють високу адсорбційну здатність. Найвищою адсорбційною здатністю характеризується гідроксиапатит з дефіцитом кальцію. Ультразвукова обробка зразків під час адсорбції не впливала на цей процес. Процес десорбції із зразків ГА, насичених AgNPs, демонструє нижчу швидкість, ніж адсорбції. Найвищу десорбційну здатність спостерігали стехіометричні ГА, синтезовані з CaCl_2 , які мали найменшу адсорбційну здатність. Після обробки ультразвуком кількість срібла у фільтраті дещо збільшилася. Вивільнення Ag^+ з поверхні ГА за рахунок десорбції є дуже низьким, що дозволяє використовувати такі матеріали як біоматеріали з пролонгованою антибактеріальною дією. Антимікробна активність AgNPs реалізується головним чином через контактний механізм і додатково через вивільнення іонів. Обробка AgNP ультразвуком не спричиняє покращення їх антимікробної активності. Включення AgNP в ГА забезпечує антибактеріальну активність композиту.

Наше дослідження показало, що наночастинки срібла в концентрації 5 мкг/мл пригнічують розмноження планктону *E. faecalis*, а не перешкоджають прикріпленню *E. faecalis* до поверхні. Підвищення концентрації AgNPs до 10-40 мкг/мл зменшує біомасу 1- та 2-денних плівок ($p < 0,05$), але не викликає повного руйнування 5-денної біоплівки ($p > 0,05$). Спільне культивування AgNP з *E. faecalis* викликає зміни клітинної стінки бактерій, зокрема, утворення пор у клітинній мембрані та зниження тургорного тиску мембрани.

3. Кальцифікована тканина ТМО зазвичай є тісною комбінацією волокнистої сполучної тканини та біомінеральних композитів і є оптимальною біонічною моделлю для створення біоматеріалів. Більшість нормальних зразків ТМО містять біомінеральні відкладення. У всіх цих випадках відсутні клінічні прояви і патології, пов'язані з порушенням кальцієво-фосфорного обміну. За кристалохімічним і фазовим складом біомінерали ТМО (група М) відповідають фосфату кальцію у формі гідроксиapatиту. У середньому розміри кальцифікатів ТМО коливаються від 1 до 50 мкм. Розмір найдрібніших кальцинатів досягає порядку десятків нанометрів, що може відповідати розміру наночастинок.

4. Кількість ПТ у пухлинній тканині яєчника варіює від 1 до 200 одиниць. Розміри їх коливаються від 12.6 до 493.7 мкм. У ході співставлення результатів ультразвукового та морфологічного дослідження встановлено, що ПТ можна розділити на 3 групи за розміром: великі – більше 200 мкм (які візуалізуються при УЗД), середні – 71 - 199 мкм та дрібні – розміром до 70 мкм (нанокристали). ПТ за своєю будовою складаються з ламел та пластинчастого шару. Середня товщина ламел дорівнює 0.65 мкм (± 0.02), а товщина пластинчастого шару – 3.7 мкм (± 0.17). Виявлено сильну кореляційну залежність товщини пластинчастого шару від розмірів ПТ ($r = 0.79$; $p < 0.001$). Встановлено, що до складу ПТ входять білки. Фазово-кристалічна структура PBs представлена сполуками кальцію та фосфору, співвідношення яких відповідає структурі гідроксиapatиту.

Враховуючи нанокристалічну структуру та морфометричні характеристики PBs, даний патерн може бути використаний в практичній діяльності з метою ранньої діагностики серозних карцином яєчників.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Xiaopeng Lu, Blawert C, Luthringer Bérengère JC, Zheludkevich Mikhail L. Controllable Degradable Plasma Electrolytic Oxidation Coated Mg Alloy for Biomedical Application. *Frontiers in Chemical Engineering*, Vol4, 2022, 2673-2718.
2. Xiaopeng Lu, Mohedano M, Blawert C, Matykina E, Arrabal R, Ulrich Kainer K, Zheludkevich ML. Plasma electrolytic oxidation coatings with particle additions. A review. *Surface and Coatings Technology*, Volume 307, Part C, 2016, Pages 1165-1182
3. Tsakiris V, Tardei C, and Clicinschi FM. Biodegradable Mg alloys for orthopedic implants – A review. *J. Magnes. Alloy.*, vol. 9, no. 6, pp. 1884–1905, 2021, doi: 10.1016/j.jma.2021.06.024.
4. Barchiche CE, Rocca E, Juers C, Hazan J, Steinmetz J. Corrosion resistance of plasma-anodized AZ91D magnesium alloy by electrochemical methods. *Electrochim Acta*. 2007;53(2):417–25.
5. Esmaeili M, Tadayonsaidi M, Ghorbanian B. The effect of PEO parameters on the properties of biodegradable Mg alloys: A review. *Surf Innov.* 2020;9(4):184–98.
6. Zhang RF, Zhang SF, Xiang JH, Zhang LH, Zhang YQ, Guo SB. Influence of sodium silicate concentration on properties of micro arc oxidation coatings formed on AZ91HP magnesium alloys. *Surf Coatings Technol.* 2012;206(24):5072–9.
7. Toulabifard A, Rahmati M, Raeissi K, Hakimizad A, and Santamaria M. The effect of electrolytic solution composition on the structure, corrosion, and wear resistance of peo coatings on az31 magnesium alloy. *Coatings*, vol. 10, no. 10, pp. 1–19, 2020, doi: 10.3390/coatings10100937.
8. Hwang DY, Kim YM, Shin DH. Corrosion resistance of plasma-anodized AZ91 Mg alloy in the electrolyte with/without potassium fluoride. *Mater Trans.* 2009;50(3):671–8.

9. Chen Q, Zheng Y, S. Dong, X B Chen, and J. Dong. Effects of fluoride ions as electrolyte additives for a PEO/Ni-P composite coating onto Mg alloy AZ31B. *Surf. Coatings Technol.* vol. 417, 2021, doi: 10.1016/j.surfcoat.2021.126883.
10. Sreekanth D, Rameshbabu N, Venkateswarlu K. Effect of various additives on morphology and corrosion behavior of ceramic coatings developed on AZ31 magnesium alloy by plasma electrolytic oxidation. *Ceram Int.* 2012;38(6):4607–15.
11. Barati Darband G, Aliofkhaezrai M, Hamghalam P, Valizade N. Plasma electrolytic oxidation of magnesium and its alloys: Mechanism, properties and applications. *J Magnes Alloy.* 2017;5(1):74–132.
12. Sampatirao H, Radhakrishnapillai S, Dondapati S, Parfenov E, Nagumothu R. Developments in plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings for biodegradable magnesium alloys. *Mater Today Proc.* 2021;46:1407–15.
13. Grebņevs V, Leśniak-Ziółkowska K, Wala M, Dulski M, Altundal Ş, Dutovs Al, Avotiņa L, Erts D, Viter R, Vīksna Art, Simka W. Modification of physicochemical properties and bioactivity of oxide coatings formed on Ti substrates via plasma electrolytic oxidation in crystalline and amorphous calcium phosphate particle suspensions. *Applied Surface Science.* Volume 598, 2022, 153793.
14. Husak Y, Grebņevs V, Altundal S, Kazek-Kesik A, Yanovska A, Maciej A, et al. Effect Of CaP-particles on Ceramic-like Coatings Formed on Magnesium via Anodisation. 2022;01–4.
15. Zhang Y, Feyrerabend F, Tang S, Hu J, Lu X, Blawert C, Lin T. A study of degradation resistance and cytocompatibility of super-hydrophobic coating on magnesium. *Materials Science and Engineering: C, Volume 78,* 2017, Pages 405-412,
16. Wang L, Feng T, Yu Sh, Cheng Y, Bu Z, Hu X. Fluoride effect on plasma electrolytic oxidation coating formed on Mg-Al alloy in alkaline electrolytes. *Materials Research Express.* Volume 7, Number 1, 2020, 016412
17. Husak Y, Michalska J, Oleshko O, Korniienko V, Grundsteins K, Dryhval B, Altundal S, Mishchenko O, Viter R, Pogorielov M, Simka W. Bioactivity

Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions. *Molecules* 2021, 26, 2094

18. Djosic M, Miodrag M, Miskovic-Stankovic V. The porosity and roughness of electrodeposited calcium phosphate coatings in simulated body fluid. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2015, 80. 237-251.

19. Liber-Kneć A, Łagan S. Surface Testing of Dental Biomaterials—Determination of Contact Angle and Surface Free Energy. *Materials*, 2021, 14(11): 2716

20 Robinson H J, Markaki A, Collier CA, Clyne B. Cell adhesion to plasma electrolytic oxidation (PEO) titania coatings, assessed using a centrifuging technique. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. Volume 4, Issue 8, November 2011, Pages 2103-2112

21 Wang Z, Ma Y, Wang Y. Effect of v2o5 additive on micro-arc oxidation coatings fabricated on magnesium alloys with different loading voltages. *Metals (Basel)*. 2020;10(9):1–14.

22. Myakinin A. et al. In vitro evaluation of electrochemically bioactivated Ti6Al4V 3D porous scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 121, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.111870.

23. Fattah-alhosseini A, Molaei M, Nouri M, and Babaei K. Antibacterial activity of bioceramic coatings on Mg and its alloys created by plasma electrolytic oxidation (PEO): A review. *J. Magnes. Alloy*. vol. 10, no. 1, pp. 81–96, 2022, doi: 10.1016/j.jma.2021.05.020.

24. Lu X, Mohedano M, Blawert C, Matykina E, Arrabal R, Kainer KU, et al. Plasma electrolytic oxidation coatings with particle additions – A review. *Surf Coatings Technol*. 2016;307:1165–82.

25. Sheng Y, Narayanan M, Basha S, Elfasakhany A, Brindhadevi K, Xia C, Pugazhendhi A. In vitro and in vivo efficacy of green synthesized AgPs against Gram-negative and Gram-positive bacterial pathogens. *Process Biochemistry*. vol. 112, pp. 241–247, 2022.

26. Andrade F. A. C., Vercik L. C. de Oliveira, Monteiro F. J., Rigo E. C. da Silva. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver nanoparticles

hydroxyapatite composites by a simple and eco friendly method. *Ceramics International*. vol. 42, pp. 2271–2280, 2016.

27. Qing Y, Cheng L, Li R, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int. J. Nanomedicine*. vol. 13, pp. 3311-3327, 2018.

28. Talapko J, Matijević T, Juzbašić M, c-Požgain A, and Škrlec I. Antibacterial Activity of Silver and Its Application in Dentistry. *Cardiology and Dermatology Microorganisms*. vol. 8, pp. 1400, 2020.

29. Poon TKC, Iyengar KP, Jain VK. Silver Nanoparticle (AgNP) Technology applications in trauma and orthopaedics. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*. vol. 21, pp. 101536, 2021.

30. Bee S-L, Bustami Y, Ul-Hamid A, Lim K, Hamid ZAA. Synthesis of silver nanoparticle-decorated hydroxyapatite nanocomposite with combined bioactivity and antibacterial properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. vol. 32, pp. 106, 2021.

31. Bolshanina S, Radchenko O, Yanovska A, Varava J, Diedkova K, Zaitseva K. The Kinetic of Silver Ions Release from Nanoparticles and Influence of Ultrasound Treatment. 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2021.

32. Nasrallah DA, Ibrahim MA. Enhancement of physico-chemical, optical, dielectric and antimicrobial properties of polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose blend films by addition of silver doped hydroxyapatite nanoparticles. *J. Polym. Res*. vol. 29, pp. 86, 2022.

33. Myronov P, Bugaiov V, Holubnycha V. Low-frequency ultrasound increase effectiveness of silver nanoparticles in a purulent wound model. *Biomedical Engineering Letters*. vol. 10, no. 4, pp. 621 – 631, 2020.

34. Sánchez B et al. Prevalence of an intestinal st40 enterococcus faecalis over other E. Faecalis strains in the gut environment of mice fed different high fat diets. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 1–13, 2020.

35. Gök ŞM, Türk Dağı H, Kara F, Arslan U, and Findik D. Investigation of antibiotic resistance and virulence factors of enterococcus faecium and enterococcus faecalis strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyol. Bul.*, vol. 54, no. 1, pp. 26–39, 2020.
36. Chong KKL et al. Enterococcus faecalis Modulates Immune Activation and Slows Healing during Wound Infection. *J. Infect. Dis.* vol. 216, no. 12, pp. 1644–1654, 2017. 37.
37. Koch G. Medicinal Chemistry. *Chimia (Aarau).*, vol. 71, no. 10, p. 643, 2017.
38. Song W and Ge S. Application of antimicrobial nanoparticles in dentistry. *Molecules*, vol. 24, no. 6, pp. 1–15, 2019.
39. Alarcon EI and Ahumada M. Nanoengineering materials for biomedical uses. *Nanoeng. Mater. Biomed. Uses.* no. January 2020, pp. 1–208, 2019.
40. Lu H, Liu Y, Guo J, Wu H, Wang J, and Wu G. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. *Int. J. Mol. Sci.* vol. 17, no. 3, pp. 1–18, 2016.
41. Baran J. Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine a. 2018.
42. Noronha VT et al. Silver nanoparticles in dentistry. *Dental Materials.* vol. 33, no. 10. Elsevier Inc., pp. 1110–1126, Oct. 01, 2017.
43. Markowska K, Grudniak AM, and Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim. Pol.*, vol. 60, no. 4, pp. 523–530, 2013.
44. Swidan NS, Hashem YA, Elkhatib WF, and Yassien MA. Antibiofilm activity of green synthesized silver nanoparticles against biofilm associated enterococcal urinary pathogens. *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, 2022.
45. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, and Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against Enterococcus faecalis biofilm. *J. Endod.*, vol. 40, no. 2, pp. 285–290, 2014.
46. Oleshko O et al. Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy. *Materials (Basel).* vol. 12, no. 22, pp. 1–9, 2019.

47. Holubnycha V et al. Effect of ultrasound treatment on chitosan silver nanoparticles antimicrobial activity. Proc. 2018 IEEE 8th Int. Conf. Nanomater. Appl. Prop. N. 2018. pp. 2–5, 2018.
48. ISO 20776-2:2021, “Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility t.”
49. Lau CP, Abdul-Wahab MF, Jaafar J, Chan GF, and Abdul Rashid NA. Toxic effect of high concentration of sonochemically synthesized polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles on *Citrobacter* sp. A1 and *Enterococcus* sp. C1. J. Microbiol. Immunol. Infect. vol. 50, no. 4, pp. 427–434, 2017.
50. Saade C, Najem E, Asmar K, Salman R, Achkar B El, Naffaa L. Intracranial calcifications on CT: an updated review. J Radiol Case Rep [Internet]. 2019 Aug 1; 13(8):1–18.
51. Deng H, Zheng W, Jankovic J. Genetics and molecular biology of brain calcification. Ageing Res Rev [Internet]. 2015 Jul 1; 22:20–38.
52. Yalcin A, Ceylan M, Bayraktutan OF, Sonkaya AR, Yuce I. Age and gender related prevalence of intracranial calcifications in CT imaging; data from 12,000 healthy subjects. J Chem Neuroanat [Internet]. 2016 Dec 1; 78:20–4.
53. Ghorbanlou M, Moradi F, Mehdizadeh M. Frequency, shape, and estimated volume of intracranial physiologic calcification in different age groups investigated by brain computed tomography scan: a retrospective study. Anat Cell Biol [Internet]. 2021 Dec 6;
54. Whitehead MT, Oh C, Raju A, Choudhri AF. Physiologic pineal region, choroid plexus, and dural calcifications in the first decade of life. AJNR Am J Neuroradiol [Internet]. 2015 Mar 1; 36(3):575–80.
55. Adams LC, Böker SM, Bender YY, Fallenberg EM, Wagner M, Buchert R, et al. Assessment of intracranial meningioma-associated calcifications using susceptibility-weighted MRI. J Magn Reson Imaging [Internet]. 2017 Oct 1; 46(4):1177–86.

56. Das DK. Psammoma body: a product of dystrophic calcification or of a biologically active process that aims at limiting the growth and spread of tumor? *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2009 Jul;37(7):534–41.
57. Pogorielov M, Kravtsova A, Reilly GC, Deineka V, Tetteh G, Kalinkevich O, et al. Experimental evaluation of new chitin–chitosan graft for duraplasty. *J Mater Sci Mater Med*. 2017;28(2).
58. Ma H, Sun Y, Tang Y, Shen Y, Kan Z, Li Q, et al. Robust Electrospun Nanofibers from Chemosynthetic Poly(4-hydroxybutyrate) as Artificial Dural Substitute. *Macromol Biosci*. 2021;21(7).
59. Aydın HE, Kızmazoğlu C, Kaya I, Husemoglu B, Sozer G, Havıtcıoğlu H, et al. Biomechanical properties of the cranial dura mater with puncture defects: An In Vitro study. *J Korean Neurosurg Soc*. 2019;62(4):382–8.
60. Maehara N, Morioka T, Shimogawa T, Suzuki SO, Mizoguchi M, Haga S. Massive Ossification with Hematopoietic Marrow on Both Surfaces of the Expanded Polytetrafluoroethylene Artificial Dura Mater. *World Neurosurg*. 2020;139:405–9.
61. Arora T, Mullangi S, Lekkala MR. Ovarian Cancer. 2022 Jan 4. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 33620837.
62. Carter JS, Downs LS Jr. Ovarian Cancer Tests and Treatment. *Female Patient (Parsippany)*. 2011;36(4):30-35. PMID: 21841893; PMCID: PMC3154728.
63. Hatano Y, Hatano K, Tamada M, Morishige KI, Tomita H, Yanai H, Hara A. A Comprehensive Review of Ovarian Serous Carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2019 Sep;26(5):329-339. doi: 10.1097/PAP.0000000000000243. PMID: 31368906; PMCID: PMC7043727.
64. Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*. 2009 Sep;16(5):267-82. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa. PMID: 19700937; PMCID: PMC2745605.

65. Fanlu, M., Changqiu, W., Yan, L. et al. Psammoma bodies in two types of human ovarian tumours: a mineralogical study. *Miner Petrol* 109, 357–365 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00710-014-0342-6>
66. Meng, F., Wang, C., Li, Y. et al. Erratum to: Psammoma bodies in two types of human ovarian tumours: a mineralogical study. *Miner Petrol* 109, 367–375 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00710-015-0381-7>
67. Wen J, Zhao Z, Huang L, Li L, Li J, Zeng Y, Wu J, Miao Y. Switch of the ovarian cancer cell to a calcifying phenotype in the calcification of ovarian cancer. *J Cancer*. 2018 Feb 28;9(6):1006-1016. doi: 10.7150/jca.22932. PMID: 29581780; PMCID: PMC5868168.
68. Rosen DG, Zhang Z, Shan W, Liu J. Morphological and molecular basis of ovarian serous carcinoma. *J Biomed Res*. 2010 Jul;24(4):257-63. doi: 10.1016/S1674-8301(10)60036-X. PMID: 23554638; PMCID: PMC3596590.
69. Chyzhma R, Piddubnyi A, Danilchenko S, Kravtsova O, and Moskalenko R. 2021. "Potential Role of Hydroxyapatite Nanocrystalline for Early Diagnostics of Ovarian Cancer" *Diagnostics* 11, no. 10: 1741. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11101741>