

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

Міністерство освіти і науки України  
Сумський державний університет (СумДУ)  
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2  
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58e-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

Визначення ефективності застосування плазмової електрооксидації для  
модифікації біодеградуючих сплавів для ортопедії

**ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ТА БІОСУМІСНОСТІ  
МОДИФІКОВАНИХ СПЛАВІВ**  
(остаточний)

Науковий керівник  
к.мед наук О.М. Олешко

2021

Рукопис закінчено 23 грудня 2021 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 25 листопада 2021 р. № 5

## СПИСОК АВТОРІВ

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

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 101 с., 41 рис., 11 табл., 129 джерел.

АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ, БАКТЕРІОСТАТИЧНИЙ ЕФЕКТ, БІОДЕГРАДАЦІЯ, БІОСУМІСНІСТЬ, ІМПЛАНТИ, КОРОЗІЙНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ, КУЛЬТУРИ КЛІТИН, МАГНІЄВІ ІМПЛАНТАТИ, НАНОЧАСТОЧКИ, ПЛАЗМОВА ЕЛЕКТРООКСИДАЦІЯ, ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ,.

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

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

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

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Створення робочих розчинів та підбір режимів (напруга, сила току, час) плазмової електрооксидзації для створення оксидних плівок на поверхні магнієвих сплавів.

2. Формування оксидної плівки на поверхні магнієвих сплавів з додаванням різної концентрації та форми наночасточок срібла та оксиду цинку.

3. Визначення фізико-хімічних, корозійних, структурних та оптичних характеристик поверхні імплантатів, отриманих різними методами.

4. Визначення ступеню адгезії, проліферації та метаболізму клітин при культивуванні на імплантатах з функціоналізованою поверхнею.

5. Узагальнення результатів дослідження з точки зору можливості створення біодеградуєчих ортопедичних імплантатів.

Отримані регламенти проведення електрооксидації поверхні та золь-гель депозиції з використанням наночасточок  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ . Описані залежності процесів формування покриття від параметрів розчину, режимів та часу проведення процесу. Визначені особливості розподілу наночасточок на поверхні імплантатів та їх фізико-хімічні характеристики.

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

Оцінка цитотоксичності та біосумісності модифікованих та немодифікованих імплантатів з лініями клітин, зокрема на комерційно доступних клітинних лініях U2OS (клітини остеобластичного диферону). Вивчення біологічної відповіді за рахунок характеристики особливостей процесів адгезії та проліферації клітин, наявності мінералізації матриці, а також метаболічних процесів (синтез колагену, лужної фосфатази, формування кристалічного гідроксиапатиту). Особливості адгезії та проліферації клітин а також ростових процесів за допомогою фарбування DAPI. Дослідження механізмів взаємодії імплантатів з клітинами, що дозволяє розробити практичні рекомендації з модифікації поверхні комерційних імплантатів.

## ЗМІСТ

Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів .....	6
ВСТУП.....	7
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	24
3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	39
3.1 Плазмова електрооксидация зразків ZrNb з AgNP .....	39
3.2 Плазмова електрооксидация (ПЕО) зразків TiZr .....	44
3.3 Плазмова електрооксидация зразків TiZr з наночастинками оксиду цинку ...	49
3.4 Фізико-хімічна характеристика поверхонь магнієвих сплавів, модифікованих плазмовою електрооксидациєю, після занурення в SBF .....	52
3.5 Структурно-біологічна оцінка покриттів на зразках магнію після плазмової електрооксидациї в різних розчинах електролітів .....	55
3.6 Формування бактеріостатичної поверхні на сплаві ZrNb методом анодування в розчині, що містить наночастинки Cu .....	59
3.7 Біоактивність чистого магнію після плазмового електролітичного окислення в розчинах на основі силікатів .....	70
ВИСНОВКИ.....	84
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	88

**ПЕРЕІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ**

Mg – Магній

EO - електрохімічне осадження

ПЕО – плазмова електрооксидация

CA – контактний кут

TEM - трансмісійний електронний мікроскоп

XPS - рентгенівська фотоелектронна спектроскопія

°C – градус Цельсія

Ag - Срібло

AgNP – наночастинки срібла

CuNPs – наночастинки оксиду цинку

Cu - Мідь

Ti – Титан

Zr - Цирконій

Nb – Ніобій

SEM – скануюча електронна мікроскопія

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – оксид алюмінію

Fe – ферум

Zn – цинк

ZnONPs – наночасточки оксиду цинку

Ca - кальцій

TiO<sub>2</sub> – оксид титану

CO<sub>2</sub> – оксид вуглеця

ZrO – оксид цирконію

ZnO – оксид цинку

BF – simulated body fluid

EDX – Energy Dispersive X-ray

SEM – scanning electron microscopy

(CFU) – колонієутворюючих одиниць

## ВСТУП

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

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

Серед біодеградуючих імплантів слави магнію (Mg) привертають значну увагу як перспективні завдяки їх біосумісності, фізичним властивостям та здатності повністю заміщуватись тканиною у фізіологічних умовах, що виключає необхідність повторного хірургічного втручання. Проте основною проблемою розробки сучасних імплантів для медичного застосування на основі Mg залишилось узгодження процесів деградації матеріалу та швидкості формування тканин намісці останнього. Оскільки ортопедичні імплантати мають зберігати свої механічні властивості щонайменше 3 місяці, то метою є використання сплавів з відповідними фізико-механічними характеристиками для уникнення низки клінічних ускладнень, наприклад другого перелому, який може виникнути внаслідок швидкої резорбції імплантату. Окрім того покращення корозійних властивостей біодеградуючих сплавів можливо досягнути застосувавши додаткові методи: моделювання і виготовлення нових сплавів з включенням рідкоземельних елементів та post-cast обробка, а також формування захисного покриття на основі кальцій-фосфатних матеріалів [2].

Плазмова електрооксидация (ПЕО) це сучасний перспективний метод модифікації поверхні, а саме створення оксидного шару з пористою структурою. Моделюванням електролітного складу, режимами сили току та напруги можна виготовити поверхню з унікальними характеристиками. Біокермічна поверхня

може володіти як високою біосумісністю, що створює ідеальну поверхню для прикріплення та проліферації остеогенних клітин з подальшою успішною остеointegraцією. В методі ПЕО змінюючи склад електролітів, силу току та напругу можна контролювати розмір пор, товщину оксидного шару та його склад. Окрім того що плазмова електрооксидація є екологічно чистим методом, процес осадження оксидів швидкий і контрольований [3].

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



## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

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

Метали, порівняно з іншими матеріалами, мають високу зносостійкість, ударну міцність, високу пластичність і в'язкість [9]. Це дозволяє широко застосовувати дані сплави в ортопедії, загальній та серцево-судинній хірургії. Відповідність механічних властивостей та швидкості корозії, додаткова структурна підтримка протягом певного періоду необхідні для завершення репаративних процесів. В основі даної лінії імплантів, що використовуються для медично застосування розглядаються три метали: залізо, цинк та магній. Механічні параметри чистих Fe, Zn і Mg наведені в таблиці 1.1.

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

стенту Armco® iron (Fe > 99.8%) та імпланції його у низхідну аорту новозеландських білих кроликів у 2001 році [11].

Таблиця 1.1 – Механічні параметри чистих Fe, Zn і Mg

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

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

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

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

Магній (Mg) та його сплави є біологічно сумісними матеріалами з відповідними біомеханічними параметрами та повною резорбцією у фізіологічних

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

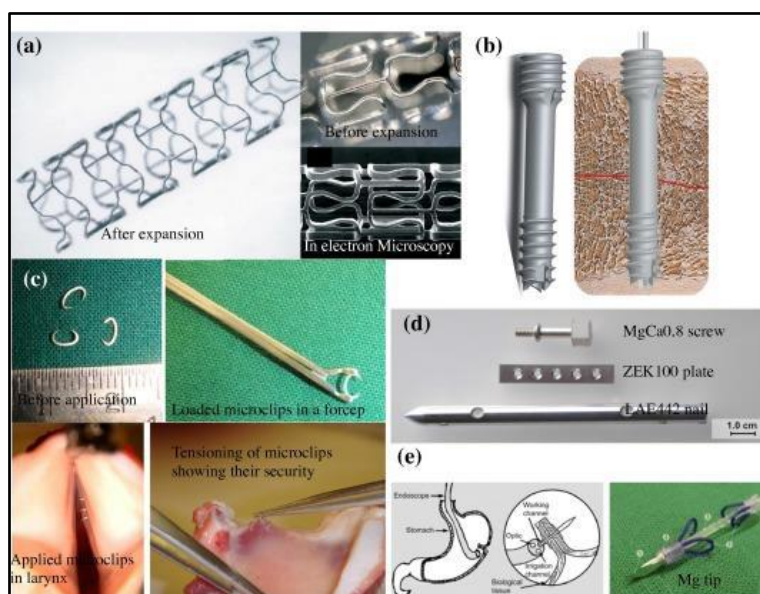


Рисунок 1.1 – Медичне застосування матеріалів на основі Магнію

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

Одним із яких є процес плазменної електрооксидзації (ПЕО), в наслідок якого створюється захисний оксидний шар (рис 1.3).

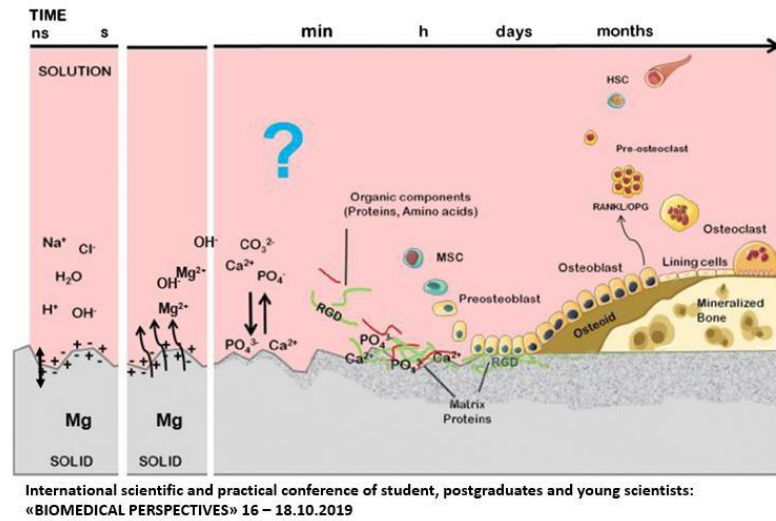


Рисунок 1.2 – Схема деградації Магнієвих сплавів у фізіологічних умовах з заміщенням на новоутворену тканину

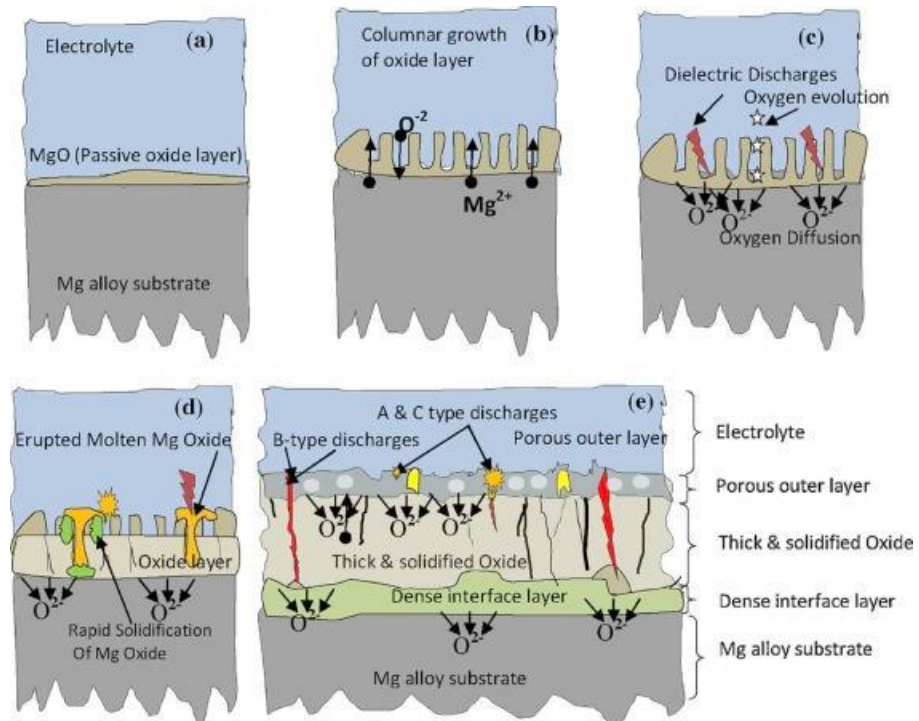


Рисунок 1.3 – Схема процесу плазмової електрооксидзації R.O. Hussein et al. / *Electrochimica Acta 112 (2013) 111–119*

ПЕО це модифікована анодизація, при якій мікророзряди виникають на поверхні Mg у супроводі з виділенням водню і створюючи поверхневу плівку. Згодом висока напруга викликає пробій діелектрика і покриття стає товщим.. Модифікація таких параметрів (рис 1.4) як напруга, щільність струму, склад розчину електроліту і час занурення визначають морфологію, товщину, склад та фізіохімічні властивості поверхневого покриття. Разом ці характеристики безпосередньо впливають на загальну корозійну стійкість матеріалу. Хімічний склад електроліту і режими чинять значний вплив на керамічні покриття. Модифікація напруги, щільності струму, складу розчину електроліту та часу розряду допомагає досягти різного типу морфології, товщини, складу, фізіохімічних властивостей. Морфологія та мікроструктура покриттів залежить також від добавок, які змінюють провідність розчинених речовин. Це впливає на утворення анодного поверхневого шару [22].

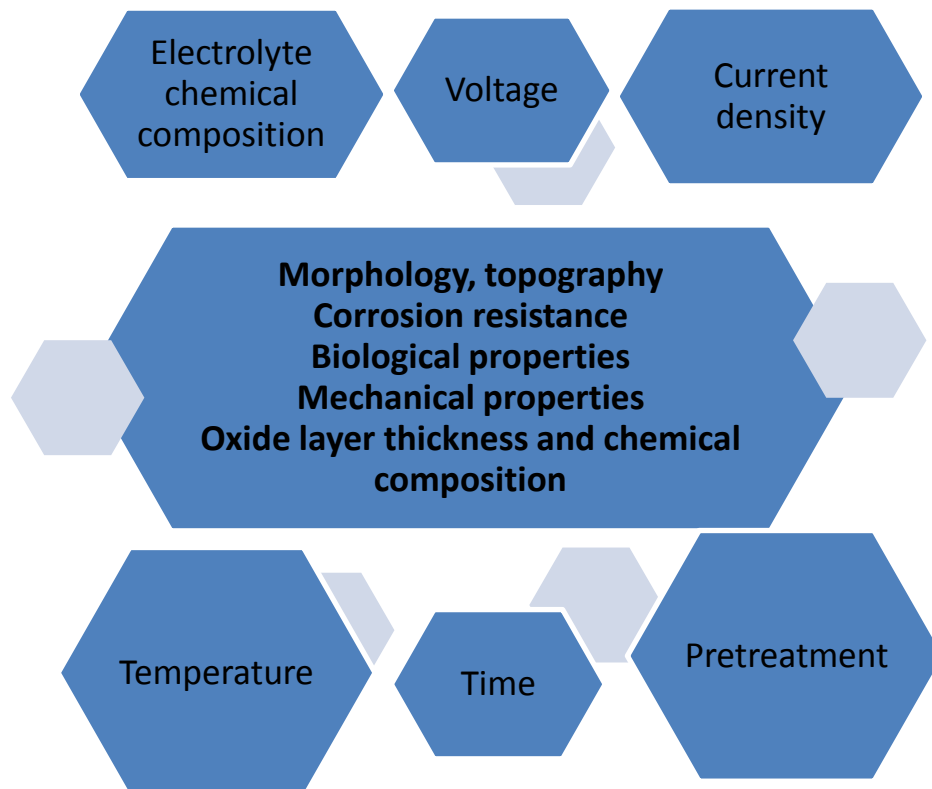


Рисунок 1.4 – Залежність властивостей поверхні після ПЕО від параметрів процесу

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

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

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

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

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

мезенхімальних стовбурових клітинах людини не спостерігалось. Було встановлено, що антибактеріальні покриття з високими концентраціями Ag виявляють цитотоксичність та інгібують остеointegraцію.

Плазмова електрооксидація Mg сплаву в розчині на основі Ca-P з AgNP може створити мезопористий шар оксиду, який підтримує адгезію та проліферацію клітин остеобластів. Крім того, отримана поверхня з вбудованим Ag може запобігти адгезії бактерій, що може бути ефективним підходом для профілактики інфекційних ускладнень після імплантації.

Топографія поверхні зубних та ортопедичних імплантатів є критичним питанням для стимуляції проліферації клітин та прискорення процесу остеointegraції, а також для запобігання адгезії бактерій [33–35]. Різні модифікації поверхні були розроблені для доступних на ринку імплантатів на основі титану та магнію. Такими модифікаціями є: піскоструменева обробка, травлення кислотами, електрохімічне анодне окислення або кальцій-фосфатні покриття [36]. Обробка з використанням плазмової електрооксидації (ПЕО) імплантатів є однією з найбільш перспективних методик завдяки утворенню міцних зв'язків з металевими підкладками [37]. Існують докази ефективності ПЕО покриттів на поверхні титанових сплавів, свідченням чого є посилення проліферації клітин та краща остеointegraція порівняно зі звичайними імплантатами [38–40].

Зубні імплантати з титану (Ti) широко застосовуються протягом останніх 50-ти років для фіксації та підтримки протезних конструкцій від одиночних коронок до нерухомих та знімних протезів [41].

Незважаючи на нові комерційні системи імплантатів, що характеризуються покращеними фізико-хімічними та механічними властивостями, кількість ускладнень все ще збільшується і коливається від 4,5% до 10% [42]. Бактеріальні інфекції, руйнування імплантатів, аномальна фізична активність пацієнта та виснаження на межі тканина-імплантат є найпоширенішими причинами невдалої імплантації [43]. Деякі джерела свідчать про те, що механічні параметри та властивості поверхні є головними факторами, що відповідають за успішну імплантацію [44].

PEO покриття сприятливіші для бактерій, за рахунок подібних механізмів адгезії прокаріотичних та еукаріотичних клітин. Тому для попередження бактеріальної адгезії, необхідна модифікація оксидного шару покриттів. Останні дослідження демонструють, що наночастинки срібла (NPs) мають сильний і швидкий бактерицидний ефект завдяки формуванню активних форм кисню (ROS), і як наслідок, пошкодження клітинної мембрани та ДНК бактерій [45, 46]. Однак Р. Покровецький зазначив, що деякі NPs срібла демонструють цитотоксичність на остеобласти [47], що вимагає нових безпечних та біосумісних форм NPs. Наночасточки мідні токсичні для бактерій, оскільки вони виділяють іони  $\text{Cu}^{2+}$  і мають тіофільність [48]. Ці властивості вказують на те, що CuNPs можуть бути перспективною альтернативою сріблу. Наночастинки срібла вже застосовувалися для модифікації оксидних покриттів [49]. Проте немає достатнього обсягу інформації про використання покриттів з CuNPs для імплантатів ZrNb.

Завдяки своїм властивостям Ті залишається основним матеріалом для виготовлення зубних імплантатів, відтоді, як був відкритий Вільямом Грегором. Однак, сплави Ті мають невідповідність жорсткості кістковій тканині, що спричиняє захисний ефект, і призводить до розсмоктування кістки та відторгнення імплантату [50]. Повідомляється, що нові метастабільні сплави  $\beta$ -типу Ті мають найнижчий модуль пружності порівняно з іншими сплавами Ті. Додавання нетоксичних металевих елементів, таких як Nb, Mo, Zr, Sn та Ta, широко вивчалось для досягнення біомеханічного успіху та високої біосумісності [51]. Кілька сучасних досліджень зосереджені на вивченні цирконію, як дуже привабливій альтернативі титану в стоматологічній імплантології [52]. Повідомляється, що сплави цирконій-ніобій (Zr – Nb) володіють кращою корозійною стійкістю та подібною біосумісністю, порівняно з Ті – 6Al – 4V та чистим Ті [53, 54]. Більше того, деякі дослідження показали, що бактерії, гірше прикріплюються до імплантатів цирконію, порівняно з титановими [55].

Проте матеріали на основі Mg широко застосовуються в медицині. В ортопедії та щелепно-лицьовій сфері використовують завдяки їх відповідним механічним характеристикам та біодеградації у біологічних рідинах [56, 57].



Mg та його сплави за фізико-механічними властивостями мають переваги перед комерційними імплантатами з нержавіючої сталі та титану [58]. Одне з основних питань в остеопластиці є швидкість корозії матеріалів. Низька корозійна стійкість магнію є основним недоліком імплантованих медичних виробів. Злуження та газова активність під час корозійного процесу може спричинити запалення та призвести до затримки формування тканино специфічних структур. Легування різними елементами (Mg – Ca, Mg – Zn, Mg – Sr та Mg – Ag) може використовуватися для підвищення корозійної стійкості та контролю швидкості деградації імплантатів на основі магнію у водних середовищах, а також для збереження їх механічної міцності та зменшення побічних ефектів [59].

Серед інших методів контролю корозійних процесів є нанесення додаткового покриття. Додатковий поверхневий шар може контролювати початкову швидкість деградації та підтримувати достатню механічну міцність матеріалу. Метою модифікації поверхні є підтримка механічних властивостей магнію після імплантації [60]. Основними методами поверхневої обробки сплавів Mg, описаних у літературі, є: гідротермічна обробка, плазмова електрооксидация (ПЕО), додавання у сплав рідкоземельних елементів чи електрохімічне осадження (ЕО) [61, 62]. Електрохімічне осадження (ЕО) та ПЕО є найбільш розповсюдженими методами модифікації поверхні. ЕО утворює голкоподібне кристалічне покриття. Тоді як ПЕО може утворювати пористі оксидні шари плівки з різною товщиною, та варіабельною морфологією, що є більш привабливою для адгезії клітин [63]. Тому пориста поверхня більш придатна для медичного застосування. Плівки оксидного шару з додаванням різних елементів можуть збільшити біосумісність імплантатів та контролювати процес корозії у фізіологічному середовищі. Лужні розчини, що містять силікати або фосфати, часто використовують як електроліти під час ПЕО магнію та його сплавів. Однак в деяких роботах описано суперечливі дані корозійної стійкості покриття ПЕО, отриманого в електролітах на основі силікатів та фосфатів [64]. Дослідження також описують відсутність токсичного впливу цих хімічних сполук на клітини [65].

Обидва електроліти привертають увагу завдяки багатообіцяючим результатам, як альтернатива для поліпшення біоактивності оксидного покриття [66].

Титан та його сплави є найпопулярнішим рішенням для застосування в ортопедії завдяки високій біосумісності, низькій корозії та відносно високому клінічному успіху [86]. Невідповідність між механічними властивостями імплантату та навколишніми тканинами, що призводить до захисту від стресу [87] і в кінцевому підсумку до резорбції кістки та можливого виділення токсичних елементів під час тривалої експлуатації [88] є основними недоліками застосування Ti.

Біорозкладні метали (Zn, Mg і Fe) є зручною альтернативою традиційним металам [89]. Завдяки низькій токсичності Mg є перспективним кандидатом для розробки біорозкладних імплантатів [90]. Це четвертий за поширеністю катіон в організмі людини і може повністю використовуватися різними шляхами після звільнення від імплантату [91]. Застосування Mg імплантату робить непотрібним повторне хірургічне втручання, значно знижує вартість лікування та мінімізує частоту ускладнень [92]. Проте широке застосування Mg імплантату обмежене через його високу хімічну реакційну здатність та швидку корозію у фізіологічному середовищі, що призводить до втрати механічної цілісності [93]. Розробка нових сплавів на основі Mg та пошук більш ефективних методів модифікації поверхневого шару є двома основними стратегіями, які можуть подолати вищезгадані ускладнення [91]. Як ми продемонстрували в нещодавньому огляді, додавання різних легуючих елементів (Ca, Al, Zn, Zr, Sr та ін.) не покращувало корозійну стійкість Mg і призводило до виділення токсичних металів під час експлуатації [94]. Деякі останні огляди продемонстрували, що формування бар'єрного покриття на сплавах Mg може бути успішною стратегією для виробництва стабільного зовнішнього шару, який запобігає швидкій корозії [95].

Біодеградуючі матеріали повинні мати певні критерії для біомедичного застосування, такі як пористість, здатність до біодеградації, біосумісність, стійкість до утворення бактеріальних біоплівки та механічні властивості. Матеріали на основі магнію широко використовуються в медицині для різних ортопедичних та

щелепно-лицевих операцій завдяки відповідним механічним характеристикам, біодеградації та розчинності у фізико-хімічних рідинах [67, 68].

Mg та його сплави мають переваги за фізико-механічними властивостями перед комерційно доступними імплантатами з нержавіючої сталі та титану для хірургії [78]. Але швидкість корозії для матеріалів, що розкладаються, сьогодні викликає особливий інтерес. Низька корозійна стійкість магнію є основним недоліком імплантованих медичних пристроїв. Підлучення та виділення газу під час процесу корозії може викликати запалення та затримку формування кістки. Додатковий поверхневий шар може контролювати початкову швидкість деградації та підтримувати достатню механічну міцність після імплантації. Метою модифікованої поверхні є збереження механічних властивостей магнію протягом першого часу після імплантації [79]. Імплантати на основі магнію піддаються корозії *in vivo* в результаті біологічної реакції на взаємодію імплантат-тканина [69]. На жаль, ця електрохімічна реакція призводить до утворення гідроксиду магнію та виділення газоподібного водню [70]. Вивільнені іони металів, як правило, вважаються фізіологічно нешкідливими, оскільки можуть бути використані навколишніми тканинами [71]. Проте швидка деградація імплантатів на основі магнію може серйозно вплинути на їх механічні характеристики та негативно вплинути на процес загоєння як твердих, так і м'яких тканин [72]. Тому розробка застосування магнію та його сплавів *in vivo* потребує додаткових досліджень корозійної стійкості магнію у водних розчинах. У літературі описано велику кількість методів обробки поверхні для сплавів Mg: гідротермічна обробка, плазмове електролітичне окислення (ПЕО), рідкоземельна лазерна обробка поверхні, електрохімічне осадження (ЕО) [80, 81]. ЕО і ПЕО є найбільш поширеними методиками. ЕО утворює голчасті леза НА кристалічного покриття на підкладці іншого виду. У той час як ПЕО може утворювати плівки шару пористого оксиду різної товщини, твердість є більш привабливою для адгезії клітин [82].

Легування різними елементами (Mg–Ca, Mg–Zn, Mg–Sr і Mg–Ag) можна використовувати для підвищення корозійної стійкості та контролю швидкості

деградації імплантатів на основі магнію у водних розчинах, а також для збереження їх механічну міцність і зменшують їх побічні ефекти [73].

Було запропоновано поступове покращення корозійної стійкості магнію за рахунок утворення поверхневих покриттів шляхом плазмового електролітичного окислення. Керамічне оксидне покриття, що утворюється під час ПЕО, міцно прикріплюється до субстрата і захищає імплантати на основі магнію від корозійної атаки *in vivo* [72]. Властивості шарів, що досягаються за допомогою ПЕО-процесу, можуть бути змінені електричними параметрами, складом електроліту ванни, матеріалом підкладки та тривалістю процесу нанесення покриття [74, 75].

Електроліти ванни на основі гідроксиду калію та/або натрію з добавками фосфатів та/або силікатів, фториду калію, фториду натрію та алюмінату натрію використовували для процесу нанесення ПЕО покриття на сплави Mg [76]. Інтенсивно досліджується вплив електролітних добавок на мікроструктуру та морфологію покриттів. Однак умови під час процесу нанесення ПЕО покриття зазвичай відрізняються в різних джерелах [77] і все ще вимагають подальших роз'яснень.

Структура поверхні пор більш застосовна для медичного застосування. Плівки оксидного шару з додаванням різних елементів можуть підвищити біосумісність імплантатів і контролювати процес корозії у фізіологічному середовищі. Лужні розчини, що містять силікат або фосфат, часто використовують як електроліти в ПЕО для магнію та його сплавів. Проте деякі дослідницькі роботи повідомляють про суперечливу дату корозійної стійкості ПЕО-покриття, отриманого в електролітах на основі силікатів і фосфатів [83]. У дослідженнях також описано відсутність токсичної дії цієї хімічної сполуки на клітини [84]. Обидва електроліти привертають увагу завдяки перспективним результатам щодо підвищення біоактивності оксидного покриття [85].

Беручи до уваги те, що Mg має високу реакційну здатність в кислому середовищі [30], існують обмежені технології, які можуть бути використані для отримання компактного покриття і при цьому не вплинуть на Mg субстрат [97]. Крім того, антикорозійна функція покриття може підвищити біосумісність і

забезпечити деякі інші корисні аспекти, такі як антибактеріальний ефект. Для запобігання корозії імплантатів використовуються дві різні стратегії — органічні та неорганічні покриття [91]. Хітозан, альгінат, целюлоза, колаген і желатин використовуються для формування біосумісних покриттів і демонструють високу біосумісність і покращену корозійну стійкість [98-100]. Основним недоліком органічного покриття є чиста механічна стійкість і можливі пошкодження на етапі імплантації. Контрольовані реакції між субстратом і навколишнім середовищем з одночасним перетворенням поверхні підкладки в шар неорганічного оксиду є більш підходящим методом для забезпечення стійкого антикорозійного шару. Анодування або хімічне перетворення є звичайними прикладами, які можуть створити захисне покриття на магнієвій підкладці [101]. На жаль, ці методи мають низьку відтворюваність, а хімічний склад електролітів обмежений. Плазмове електролітичне окислення (ПЕО) є простим, недорогим та ефективним методом нанесення керамічного покриття на різні сплави і демонструє високу відтворюваність та ефективність [102]. Є деякі дані про ПЕО чистого магнію та його сплавів для імплантації, які демонструють високу перспективність і потребують подальшого дослідження. Склад електролітної ванни та режими ПЕО, включаючи напругу та щільність струму, все ще досліджуються. Echeverry-Rendon M. et al. використовували розчин фтору, гексаметилентетраміну та маніту для створення захисного шару на коронарних стентах з магнієм. Вони довели затримку корозії та підтримку проліферації судинних клітин. Використання стандартного електроліту Kermasorb® для ПЕО сплавів Mg-RE та Mg-Zn-Ca продемонструвало гемосумісність із низькою швидкістю адгезії тромбоцитів [103]. Донг та ін. використовували електроліт, що складається з  $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{TiF}_6$ ,  $\text{NaF}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$  та  $\text{NaOH}$ . Однак обробка ПЕО утворювала покриття з тріщинами з підвищеною корозією [104]. Фен Пен та ін. використав фторидний розчин для ПЕО сплаву Mg-Al та забезпечив утворення стійкого пористого покриття з високим профілем цитосумісності [105]. Інші дослідники використовували розчин лужного силіката для створення двостадійного ПЕО-покриття сплаву AZ91 Mg і продемонстрували компактну структуру внутрішнього шару, значне покращення корозійної стійкості

та механічних властивостей покриття [106]. Таким чином, силікатний розчин може бути перспективним агентом для обробки ПЕО сплавів Mg завдяки утворенню високої питомої поверхні та кращої біосумісності [107]. Додавання Ca в ПЕО покриття може значно вплинути на деградацію та корозійні властивості, але більшість попередніх досліджень демонструють застосування високої напруги (від 400 до 500 В) і тривалий час обробки (до 30 хвилин), що може впливати на Mg субстрат [108]. Необхідно оптимізувати параметри ПЕО, щоб скоротити час обробки розчину на основі Ca. Таким чином, метою поточних досліджень є розробка ПЕО-обробки чистого Mg у різних розчинах на основі силікатів та оцінка структурно-біологічних властивостей нового покриття.

#### **Резьтати розділу опубліковані в:**

Oleksandr Oleshko, Volodymyr Deineka, Yevgeniia Husak, Viktoriia Korniienko, Oleg Mishchenko, Viktoriia Holubnycha, Marcin Pisarek, Joanna Michalska, Alicja Kazek-Kęsik, Agata Jakóbiak-Kolon, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov. *Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy*. - Materials. - 2019. - Volume 12. - Issues 22. - P.3742. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31766225/>.

Oleshko O., Deineka V., Husak Ye., Korniienko V., Dryhval B., Dudko J., Solodovnyk O., Simka W., Michalska J., Mishchenko O., Grundsteins K., Pogorielov M. *Plasma Electrolytic Oxidation of TiZr Alloy in ZnONPs-Contained Solution: Structural and Biological Assessment*. - Nanomaterials in Biomedical Application and Biosensors. – NAP-2019. – P. 75–82.

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

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

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

Yevheniia Husak, Joanna Michalska, Oleksandr Oleshko, Viktoriia Korniienko, Karlis Grundsteins, Bohdan Dryhval, Sahin Altundal, Oleg Mishchenko, Roman Viter, Maksym Pogorielov, Wojciech Simka. *Bioactivity Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions*. Molecules. 2021. Volume 26. Issues 7. P.-2094. <https://doi.org/10.3390/molecules26072094>.)

## 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Матеріали

Зразки магнію ( $1 \times 1 \times 1$  см) та  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{F}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  були придбані у компанії Sigma – Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі, США).

Сплави ZrNb (Zr – 2,5 мас. % Nb) та титано-цирконієвої системи (Zr60Nb21Ti19) були отримані з R&D Osteoplant (Дембіца, Польща). Для всіх типів металів та досліджень були підготовлені циліндричні зразки діаметром та висотою 6 мм. Усі хімічні речовини були придбані у Sigma-Aldrich та використовувались як отримані: нітрат срібла ( $\text{AgNO}_3$ , 98%), полі (N-вінілпіролідон) (PVP,  $M_w = 40\,000$ , K-25), моногідрат фосфінату натрію (SPM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 95%), етиленгліколь (EG,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ , 90%), ізопропанол ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ , 90%) та гіпофосфіт кальцію ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)_2$ ), дигідрат ацетату цинку ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2$ , 99%).

Титановий сплав 5-титанового типу (Ti6Al4V) та цирконій (Zr, чистота 99,7%) були придбані у Інституту Курдумова, НАНУ. Стрижні діаметром 10 мм вирізали циліндричними плитами товщиною 2 мм. Згодом поверхні плит механічно відшліфували, що створило наступні параметри шорсткості поверхні.

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

Грампозитивні бактерії (*S. aureus*, штам В 918), отримані з Національної колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного, Україна), були використані для оцінки властивостей клейкої поверхні зразків. Необхідні носії для бактеріальної культури були закуплені з HiMedia (Індія), Alamar blue - від Invitrogen (США).



Носії та реагенти для дослідження клітинної культури були придбані у компанії Gibco®, США. Людський остеобласт (НО) був отриманий з колекції Сумського державного університету.

## 2.2 Методи

### 2.2.1 Плазмова електрооксидация

#### - Магнієві зразки

Зразки магнію ( $1 \times 1 \times 1$  см) полірували за допомогою паперу з сортованого SiC, очищали ультразвуком в ацетоні та швидко промивали дистильованою водою. Склад електроліту та відповідні ідентифікаційні коди зразків представлені в табл. 2.1.1 та табл. 2.1.2

Таблиця 2.1 – Коди зразків та їх відповідні склади електроліту, данні під час обробки ПЕО

Код зразка	Склад електроліту
Електроліт 1 (зразок S1)	10g/L $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ + 5g/L $\text{NH}_4\text{F}$ + 10g/L NaOH
Електроліт 2 (зразок S2)	10g/L $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ + 5g/L $\text{NH}_4\text{F}$ + 10g/L $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Таблиця 2.2 – Хімічний склад ванн для анодування та параметри анодування ПЕО процес.

Електроліт	Концентрація компонентів електроліту; г дм <sup>-3</sup>				Анодуюча напруга
	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	NaF	NaOH	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	
C1	10	5	10		200, 250
C2	10	5		10	250, 300

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

### **- ZrNb, так і Zr60Nb21Ti19 зразки**

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

#### 1. ZrNb:

- Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,5 моль/л) та наночастинки срібла (264 мг/л).

#### 2. Zr60Nb21Ti19:

- Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,5 моль/л);

- Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,1 моль/л) та ZnO Np (40 000 мг/л).

Модифікацію поверхні здійснювали шляхом плазмової електрооксидзації за умов дії постійного електричного струму. Сила струму становила 100 мА/см<sup>2</sup>, напруга варіювалась в залежності від типу сплаву та складу електроліту. Так для ZrNb зразків максимальні показники досягали 450 Вольт. Зразки з титано-цирконієвої системи піддавались ПЕО при 300, 400 та 450В, а за умов збагачання електроліту наночастинками оксиду цинку – 350 Вольт відповідно. Площа поверхні модифікованої поверхні становить 0,89 см<sup>2</sup>. Анодовані зразки промивали дистильованою водою, а потім в деіонізованій суміші дистильована вода/2-пропанол протягом 5 хв.

### **- Сплав системи цирконій-ніобій**

(вагові %: Zr — 97,5; Nb — 2,4–2,5; Hf — 0,01; Ni — 0,01; Cr — 0,02; Ti — 0,007; Al — 0,008— 0,005) було отримано від NanoPrime (Дембіца, Польща) та використано в експерименті у відповідності протоколу. Циліндричні зразки готували діаметром 6 мм і висотою 6 мм. Всі хімічні речовини були придбані у Sigma Aldrich (Дармстад, Німеччина): CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 99%; PVP, Mw = 40000, K-25, Na<sub>2</sub>PO<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O, 95%), EG- C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, 90% та ізопропанол (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O, 90%).

Всі зразки промивали дистильованою водою та очищали ультразвуком в деіонізованій воді та 2-пропанолі протягом 5 хв кожен. Попередньо підготовлені зразки піддавали анодуванню в електроліті, що містить Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,5 М), КОН

та наночастинки міді (5 г / л). ПЕО проводили під постійним струмом  $0,1 \text{ A/cm}^2$  з кінцевою напругою 300, 450 і 500 V, впродовж 5 хв (легенди зразків: ZrNb-300, ZrNb-450 та ZrNb-500). Протягом усіх процедур використовувалось джерело струму (PWR 800H, Кікусуї, Японія).

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

### **2.2.2 Тест на занурення SBF**

Тест на занурення проводили в змодельованій рідині організму (SBF), яка має концентрацію іонів, подібну до плазми крові людини. Усі зразки занурювали окремо в 50 мл SBF при  $37^\circ\text{C}$  (початкове значення рН  $7,4 \pm 0,02$ ). Занурені зразки розміщували в свіжому SBF без перемішування кожні 2 дні для збереження стабільного хімічного складу та значення рН SBF. Вибрано широкий діапазон часу занурення, включаючи 1, 3, 7 та 63 дні. Швидкість деградації зразків оцінювали за допомогою вимірювань втрати ваги та аналізу морфології поверхні. Зразки зважували перед випробуванням і після кожного періоду занурення.

Для опису характеристик поверхні після випробування зануренням використовувався скануючий електронний мікроскоп SEO-SEM Inspect S50-B (FEI, Брно, Чехія). Хімічний склад поверхні до та під час дослідження оцінювали за допомогою енергодисперсійного рентгенівського спектрометра AZtecOne з детектором X-MaxN20 (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, UK), прикріпленим до SEM.

### **2.2.3 Аналіз SEM та EDX**

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

### **2.2.4 Рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія**

Для вивчення морфології та товщини ПЕО покриттів визначали поперечні перерізи оксидних шарів. Зразки, модифіковані ПЕО, заливали в епоксидну смолу (Eposir F 740 + Iрох EH 2260), а потім поміщали у вакуумну установку на 3 хв перед висушуванням. Потім усі зразки сушили на повітрі протягом 24 год і шліфували шліфувальною машиною (Einhell TH-US 400, 1440 об/хв) з використанням абразивного паперу (Hermes BW114) з грануляцією 400, 1000, 1200 і 1500. Морфологію та хімічний склад структур оксидного шару вивчали за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEO-SEM Inspect S50-B, FEI, Брно, Чехія; прискорювальна напруга-15 кВ) у парі з енергодисперсійним рентгенівським спектрометром (AZtecOne). з X-MaxN20, Oxford Instruments plc, Абінгдон, Великобританія).

### **2.2.5 Вимірювання контактного кута**

Експерименти з вимірюванням кута контакту з водою (CA) проводили за допомогою відеовимірювача оптичного контактного кута (OCA 15 EC, серія GM-10-473 V- 5.0, Data Physics, Фільдерштадт, Німеччина). Характеристика змочуваності покриттів спиралася на дані статичних вимірювань CA. На досліджуваній поверхні була використана цифрова обробка зображень сидячої

краплі деіонізованої води. Отримано оптичні зображення сидячих крапель. Середнє значення кута контакту визначали шляхом вимірювання п'яти різних точок для кожного зразка.

### **2.2.6 Вимірювання шорсткості**

Характеристики шорсткості поверхні та профілю зносу були отримані на довжині 10 мм за допомогою приладу для визначення шорсткості поверхні (Surftest SJ-301, Mitutoyo, Kawasaki, Kanagawa, Japan). Були виміряні такі параметри шорсткості: середнє арифметичне суми значень профілю шорсткості ( $R_a$ ) та десятибальної висоти ( $R_z$ ).

### **2.2.7 XPS-аналіз**

Хімічний склад та хімічний стан зразка характеризували рентгенівською фотоелектронною спектроскопією (XPS). Для цього було використано спектрометр PHI 5000 VersaProbe (ULVAC-PHI). Спектри XPS були отримані з використанням монохроматичного випромінювання  $Al_{K\alpha}$  ( $h\nu = 1486.6$  eV, 25 W) Спектри обстеження та високої роздільної здатності збирали за допомогою напівсферичного аналізатора при постійних енергіях пропускання відповідно 117,4 та 23,5 eV. Фон коригувався за допомогою моделі Ширлі для отримання інтенсивності сигналу XPS. Для процедури деконволюції використовували асиметричну функцію Гаусса/Лоренція при сталому співвідношенні  $G/L = 0,35$ . Визначені пікові позиції були виправлені у відношенні позицій авантідних вуглецевих C1 при 284,8 eV. Для обробки даних було використано програмне забезпечення Advantage Surface Chemical Analysis (вер. 5.9904).

### 2.2.8 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 інокулювали штамом бактерії до концентрації 10<sup>8</sup> денситометром DEN-1B (Biosan SIA, Рига, Латвія) і доводили до кінцевої щільності 1×10<sup>6</sup> колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл. Після отримання 2 мл суспензії, бактерій поміщали на зразки (зразки, оброблені ПЕО та 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 стерильного фосфатного буферного розчину (PBS; рН = 7,4), щоб видалити не прикріплені бактеріальні клітини, і помістили в стерильні пластикові пробірки 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 аликвоти з кожної пробірки переносили на агарові чашки з агаром Мюллера-Хінтона і розповсюджували за допомогою методу стрик-планшета. Після нічної інкубації при 37°C проводили підрахунок тих, хто вижив. Усі експерименти проводили в асептичних умовах у трьох примірниках.

### 2.2.9 Культура клітин

#### - Для магнієвих зразків

Для оцінки токсичності та біосумісності були використані U2OS клітин. Епітеліальні клітини остеосаркоми кістки людини (лінія U2OS) вирощували в стандартних умовах: зволожений 5% CO<sub>2</sub>, при температура повітря 37°C,

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  $2 \times 10^4$  клітин на лунку. Після цього був використаний колориметричний аналіз Alamar blue, в якому резазурин є синім барвником який відновлюється до рожевого забарвлення резорюфіну 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.

#### **- Для Zr60Nb21Ti19 зразків**

Первинну культуру клітин остеобластів людини культивували в модифікованій суміші середовищ/живильних речовин Дульбекко F-12 (DMEM/F-12) з використанням L-глутаміном, що містить 100 одиниць/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В, 10 % фетальної сировини великої рогатої худоби та 1,0 нг/мл bFGF. Клітини культивували при 37 °C у зволоженому інкубаторі з 5 % CO<sub>2</sub> протягом 24 годин, поки не був отриманий суцільний шар з більш 80 % злиття. Остеобласти висівали на кожен зразок та лунки з позитивним контролем при щільності клітин ( $2 \times 10^4$  клітин на лунку). Клітинну життєздатність аналізували колориметричним синім аналізом Alamar blue, в якому резазурин - синій барвник, активується до резорюфіну рожевого кольору лише

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

### **2.2.10 Оцінка біоактивності зразків**

#### **In vitro оцінка вивільнення іонів для ZnNb**

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



значення концентрацій, отриманих для всіх використаних аналітичних ліній зі стандартним відхиленням, що не перевищує 1,5%.

### **SBF тест для Zr60Nb21Ti19**

Дослідження біоактивності проводили в протеїні simulated body fluid (SBF) з концентрацією іонів, що імітували концентрацію плазми крові людини. SBF готували шляхом розчинення реагенту NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> та Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> у дистильованій воді, яку доводили до рН 7,40, використовуючи гідроксиметил амінометан та 1М HCl при 37 °С. розчин має такий іонний склад: 142,0 ммоль/л Na<sup>+</sup>, 5,0 ммоль/л K<sup>+</sup>, 1,5 ммоль/л Mg<sup>2+</sup>, 2,5 ммоль/л Ca<sup>2+</sup>, 147,8 ммоль/л Cl<sup>-</sup>, 4,2 ммоль/л HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1,0 ммоль/л HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 0,5 ммоль/л SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

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

### **2.2.10 Тест на бактеріальну адгезію**

Адгезивні властивості експериментальних зразків оцінювали за допомогою грампозитивної бактерії (*Staphylococcus aureus*, штам В 918). Штам бактерій, вирощений на поживному агарі при 37 °С протягом 24 год, суспендували в фізіологічному розчині (0,9 % NaCl) і повторно суспендували до кінцевої щільності 1x10<sup>8</sup> колонієутворюючих одиниць (CFU) мл<sup>-1</sup> (8 log CFU) у поживному бульйоні з використанням стандартів McFarland.

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

протягом 1 хвилини для видалення прилиплих бактерій з поверхонь зразків. Дотримуючись цього кроку, ми проводили визначення кількості колоній у кожній точці інкубації, використовуючи методіку з багатолунковою планшеткою, культивуючи на твердому носії 10 мкл фізіологічного розчину протягом 24 год. Лунки, що містять диски і випробувані зразки в середовищі росту без бактеріальних інокулятів, використовували в якості контролю. Всі експерименти повторювались по три рази.

### **2.2.11 Аналіз вивільнення іонів з оксидних покриттів**

Вміст міді, фосфору, кальцію та титану у сольових розчинах Рінгера визначали за допомогою атомно-емісійного спектрометра Varian 710-ES (Санта-Клара, штат Каліфорнія, США), з небулайзером OneNeb та розпилювальною скляною камерою Twister. Застосовували наступні параметри: RF потужність 1,0 кВт, витрата плазми (аргону) 15 л/хв, допоміжний потік (аргон) 1,5 л/хв, тиск небулайзера 210 кПа, швидкість насоса 15 об/хв, лінії викиду Cu:  $\lambda = 327,395$  та  $324,754$  нм і  $206,200$  нм, P:  $\lambda = 177,434$  і  $213,618$  нм, Ca:  $\lambda = 370,602$  і  $373,690$  нм. Застосовано метод калібрувальної кривої. Стандарти готували на матриці, ідентичній матриці зразків (розчин Рінгера) з одноелементних стандартних розчинів 1 мг/мл, що постачаються Merck Millipore (Дармштадт, Німеччина). Використовували деіонізовану воду (система Millipore Elix 10, Дармштадт, Німеччина). Результати розраховувались як середнє значення концентрацій, отриманих для всіх аналітичних ліній відповідного елемента зі стандартним відхиленням, що не перевищує 1,5%.

### **2.2.12 Синтез наночастинок Ag**

Спочатку 10 мл EG нагрівали до  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв, 5 мл 0,1 М розчину PVP/EG додавали до нагрітого розчину EG. Після цього до реакційної колби по краплях додавали 5 мл 0,2 М розчину  $\text{AgNO}_3/\text{EG}$ , далі суміш перемішували протягом 1 години за допомогою магнітного змішувача. Після закінчення реакції

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

### 2.2.13 Синтез наночастинок ZnO

Нанокристали ZnO синтезувались шляхом алкоголізу та конденсації, відомо як поліольний процес, Zn (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (2,2 г) в EG (10 мл) змішують та нагрівають при 160 °C. Після нагрівання розчину в колбі з круглим дном, з обов'язковим наступним рідинним охолодженням протягом 4 годин на магнітному змішувачі, відбувається осадження нанокристалів ZnO. Нанокристали відновлювали центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 5 хв і двічі промивали ізопропанолом. Методика отримання наночастинок ZnO описана в працях закордонних авторів [33].

### 2.2.14 Синтез наночастинок міді

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

Отриманий золь центрифугували протягом 20 хв зі швидкістю 5000 об/хв. Відокремлений продукт тричі промивали з органічного компонента етанолом з

наступним центрифугуванням. Отриманий осад диспергували у 100 мл дистильованої води за допомогою ультразвукового диспергатора. Схема синтезу представлена на Рисунку 2.1.

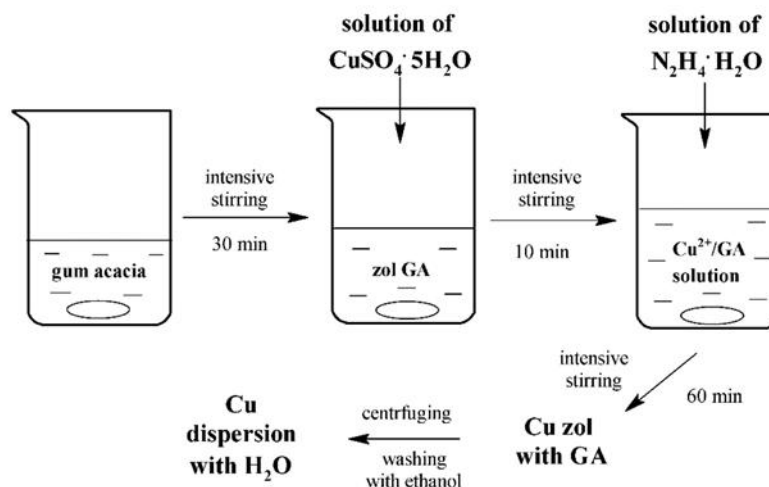


Рисунок 2.1 - схема синтезу нанокристалів Cu

### 2.2.15 Характеристика наночастинок

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

### 2.2.16 Статистичні методи

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

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

### **Результати розділу опубліковані в:**

Oleksandr Oleshko, Volodymyr Deineka, Yevgeniia Husak, Viktoriia Korniienko, Oleg Mishchenko, Viktoriia Holubnycha, Marcin Pisarek, Joanna Michalska, Alicja Kazek-Kęsik, Agata JakóbiK-Kolon, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov. *Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy*. - Materials. - 2019. - Volume 12. - Issues 22. - P.3742. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31766225/>.

Oleshko O., Deineka V., Husak Ye., Korniienko V., Dryhval B., Dudko J., Solodovnyk O., Simka W., Michalska J., Mishchenko O., Grundsteins K., Pogorielov M. *Plasma Electrolytic Oxidation of TiZr Alloy in ZnONPs-Contained Solution: Structural and Biological Assessment*. - Nanomaterials in Biomedical Application and Biosensors. – NAP-2019. – P. 75–82.

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

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

V. Korniienko, O. Oleshko, Y. Husak, V. Deineka, V. Holubnycha, O. Mishchenko, A. Kazek-Kęsik, A. JakóbiK-Kolon, R. Pshenychnyi, K. Leśniak-Ziółkowska, O.

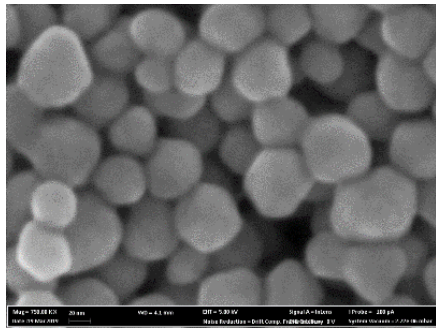
Kalinkevich, A. Kalinkevich, M. Pisarek, W. Simka, and M. Pogorielov, *Formation of a Bacteriostatic Surface on ZrNb Alloy via Anodization in a Solution Containing Cu Nanoparticles*, *Materials* (Basel). 13, 3913 (2020).)

Yevheniia Husak, Joanna Michalska, Oleksandr Oleshko, Viktoriia Korniienko, Karlis Grundsteins, Bohdan Dryhval, Sahin Altundal, Oleg Mishchenko, Roman Viter, Maksym Pogorielov, Wojciech Simka. *Bioactivity Performance of Pure Mg after Plasma Electrolytic Oxidation in Silicate-Based Solutions*. *Molecules*. 2021. Volume 26. Issues 7. P.-2094. <https://doi.org/10.3390/molecules26072094>.)

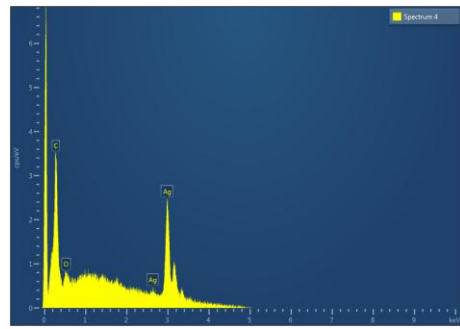
## 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1 Плазмова електрооксидация зразків ZrNb з AgNP

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



(а)



(б)

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

Поверхня сплаву зразків ZrNb, що модифікувалися за допомогою процесу ПЕО, була досить гладкою, після шліфування залишилися деякі шорсткі ділянки (рис. 3.2 а). Після процесу ПЕО в електроліті, що містить наночастинки срібла, на сплаві ZrNb (рис. 3.2 б) можна спостерігати мезопористий шар з розмірами пор від 200 нм до 70 мкм. Поверхня не є однорідною, з плямами оксидного шару, з великими порами та острівцями субмікро- та нанопор. У середині великих пор ми можемо спостерігати нанопористі структури, які можуть служити додатковими ділянками для адгезії клітин. Є докази того, що мезопористі структури можуть забезпечити ефективну остеointegraцію клітин та діяти як бар'єр для бактеріальної адгезії. [34]. На поверхні сплаву ZrNb після процесу ПЕО видно частинки срібла (світлі плями; рис. 3.2 б). Аналіз EDX (рис. 3.3 а) підтвердив наявність Ca, P та O в оксидному шарі на поверхні зразків ZrNb. Пікові показники срібла також добре видно в спектрах EDX.

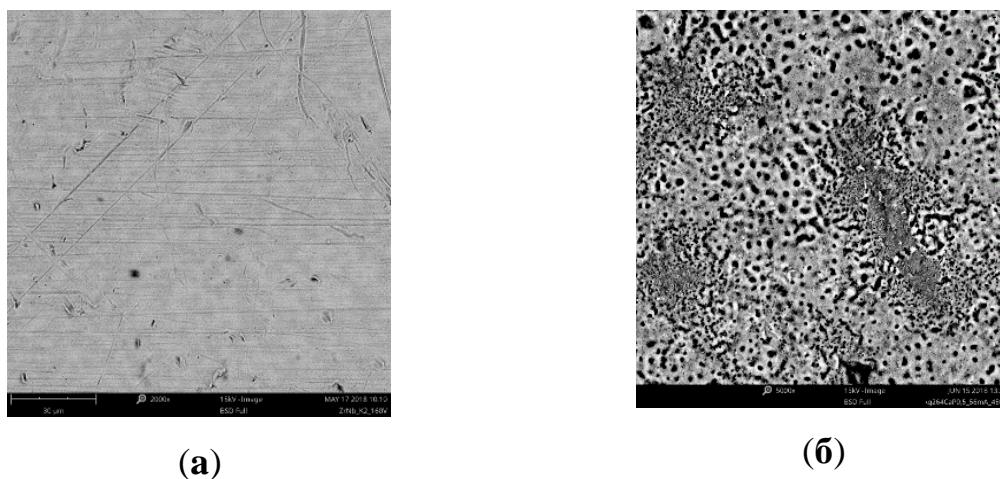


Рисунок 3.2 – SEM-зображення поверхні сплаву ZrNb до (а) та після (б) процесу ПЕО

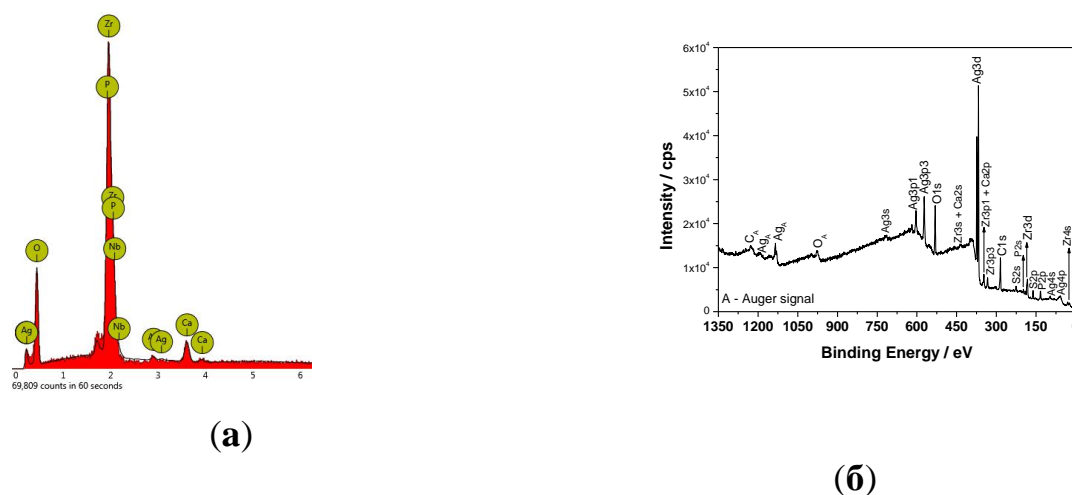
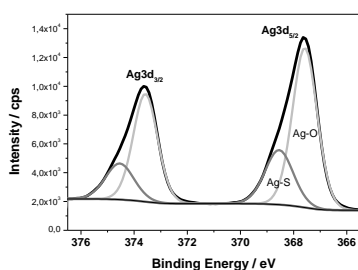


Рисунок 3.3 – Спектри EDX (а) та XPS (б) поверхні сплаву ZrNb після ПЕО-процесу

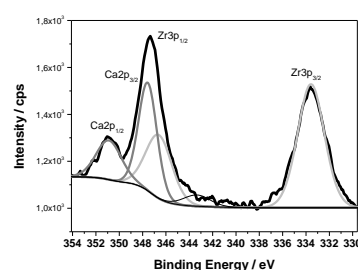
Для оцінки хімічного складу поверхні отриманих покриттів проводили XPS-дослідження. Вимірені енергії зв'язку основних електронів дають велику кількість інформації про властивості атомів у твердих тілах. На малюнку 7b показаний спектр обстеження XPS для поверхні сплаву ZrNb після ПЕО в електроліті, що містить наночастинки Ag. Ідентифіковані характерні сигнали XPS для конкретних елементів, які присвоюються Ag3d, Ag3p, Ag3s, Ag4s, Ag4p, Zr3d, Zr3p, Zr4s, O1s, Cl1s, P2p, P2s, S2p, S2s, Ca2p, піки показників Ca2s та Ag MNN, O KLL та C KVV Auger. Nb не виявлено в аналізованому шарі, де основними компонентами є



сполуки срібла: оксид срібла (367,6 eV) та сульфід (368,5 eV). Спектр високої роздільної здатності піку Ag3d після деконволюції представлений на рисунку 3.4 а, зі спіно-орбітними відділеннями  $\Delta = 6,0$  eV. Подальший аналіз XPS показав наявність піків, розташованих при 182,8 eV та 185,2 eV, що відповідають Zr3d5/2 та Zr3d3/2 відповідно в ZrO<sub>2</sub>. Сигнали фосфору P<sub>2р</sub> віднесли до фосфатних груп з енергією зв'язку 133,4 eV. У цьому випадку записаний сигнал для Ca<sub>2р</sub> збігається з піком Zr3р1/2. Ретельний аналіз діапазону енергії зв'язку від  $\sim 330$  до  $\sim 355$  eV призвів до визначення Ca, як показано на рисунку 3.4 б.



(а)



(б)

Рисунок 3.4 – Спектр XPS високої роздільної здатності піків Ag3d (а), Ca2р та Zr3р (б)

Вимірний діапазон деконволюціонували на чотири піки: 333,6, 346,6, 347,6 та 350,9 eV відповідно. Перший і другий піки були пов'язані з Zr3р, спіно-орбітними відділеннями  $\Delta = 13,0$  eV. Третій та четвертий пікові сигнали були віднесені до фосфатних сполук кальцію ( $\Delta = 3,55$  eV). Дані XPS підтвердили, що ПЕО в електроліті, що містить наночастинки Ag, утворювало покриття, котре складається із суміші оксиду цирконію та фосфатів кальцію, збагачених сполуками срібла, а саме оксидом та сульфідом.

На рисунку 3.5 представлена концентрація відібраних іонів, що виділяються з покриттів у розчин Рінгера через 2, 4 та 6 тижнів. Покриття, утворене на сплаві ZrNb, виділяло вибрані іони, такі як кальцій, фосфор і срібло, в рідину (розчин Рінгера). Були виявлені іони на основі субстрату, такі як ніобій та цирконій, однак

їх концентрація була нижче  $0,01 \text{ мг/л}^{-1}$ . Також необхідно відмітити, що спотстерігаються зміни в концентрації іонів кальцію, особливо після шести тижнів занурення модифікованого зразка. Концентрація кальцію значно збільшилась до цього часу до  $93,30 \text{ мг/л}^{-1}$ . Протягом 2-4 тижнів занурення зразка в розчині Рінгера, концентрація кальцію залишалася такою ж, як і концентрація фосфору та іонів срібла. Дослідження показали, що модифіковані зразки біологічноактивні в розчині Рінгера; однак концентрації іонів фосфору та срібла суттєво не змінювались протягом 6 тижнів занурення.

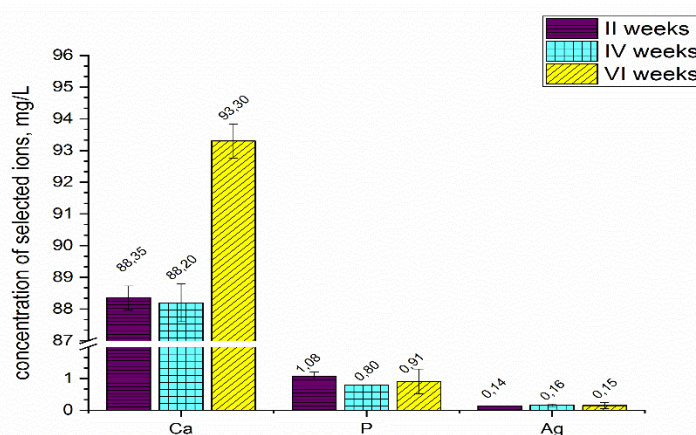
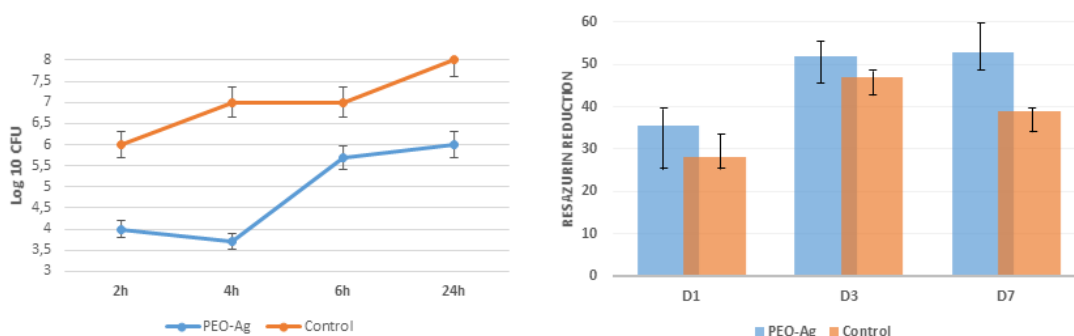


Рисунок 3.5 – Концентрація іонів, що виділяються із анодованого сплаву ZrNb в розчин Рінгера. Концентрації Zr та Nb були нижче  $0,01 \text{ мг/л}^{-1}$

Бактеріологічне дослідження підтвердило адгезію та проліферацію *S. aureus* під час 24-годинного експерименту. Через 2 години поверхня, модифікована ПЕО, мала на 30 % менше адгезованих бактерій, ніж у контрольних (лише полірування) зразків, з невеликим зниженням рівня мікроорганізмів протягом 4 годин (рис. 3.6 а). Не модифікована поверхня виявляла значну бактеріальну проліферацію в усі терміни часу, досягаючи  $8 \text{ Log } 10 \text{ CFU}$  через 24 години. Наявність AgNP на поверхні зразків перешкоджає росту бактерій. Так кінцеве число *S. aureus* не перевищувало  $6 \text{ log CFU}$  через 24 години. Відомо, що AgNP можуть вивільняти іони  $\text{Ag}^+$ , які порушують цілісність бактеріальної стінки шляхом реакції з

клітинною мембраною [35]. Постійне вивільнення іонів срібла може захистити поверхню імплантату від бактеріального зараження після імплантації.

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



(а) (б)

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

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

## 3.2 Плазмова електрооксидация (ПЕО) зразків TiZr

### 3.2.1. SEM з EDX

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

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

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

За даними, кальцій включається в структуру поверхні набагато простіше, ніж фосфор. Різниця кількості інкорпорації фосфору та кальцію не мала значної різниці при збільшенні напруги. Крім того, в результаті появи оксидного шару, було виявлено менше цирконію та титану. При цьому необхідно зазначити, що елементарний склад поверхні тісно пов'язаний з рівнем напруги електричного струму. Склад електролітів був обраний для досягнення атомних співвідношень

Ca/P 1,67 як атомного співвідношення стехіометричної HAP концентрації. При цьому на поверхні модифікованого сплаву за допомогою EDX не виявлено складової Nb.

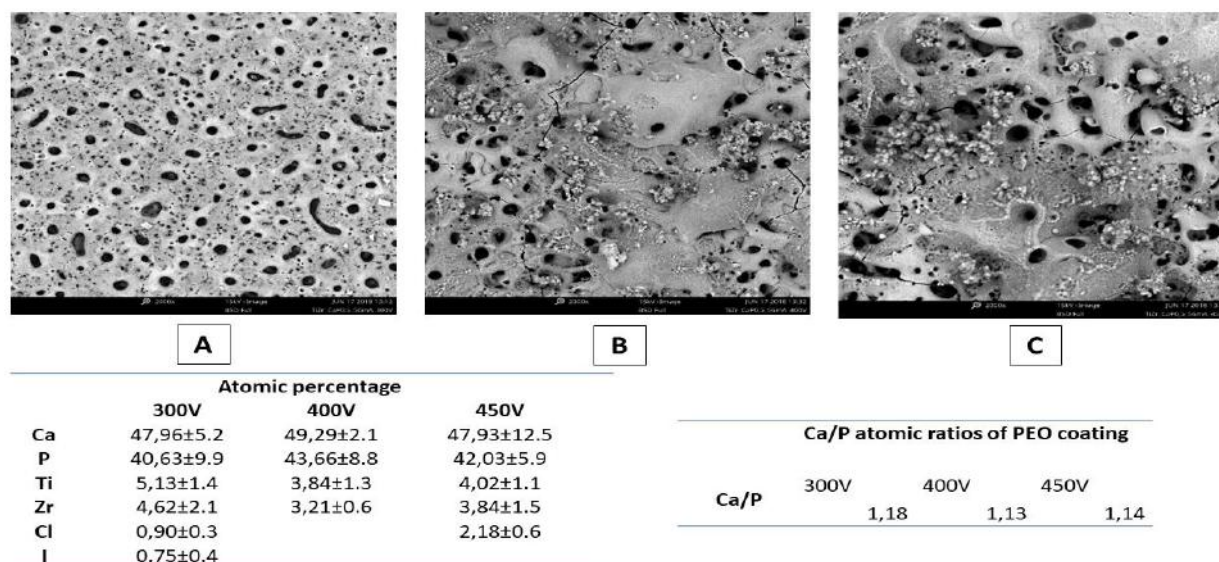


Рисунок 3.7 – Зображення SEM та EDX зразків TiZr після ПЕО в розчині 0,5 М Ca ( $\text{H}_2\text{PO}_2$ )<sub>2</sub> із режимом напруги 300 В (А), 400 В (В) і 450 В (С). EDX атомного співвідношення керамічного шару та часток Ca та P

### 3.2.2. SBF тест

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

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

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

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

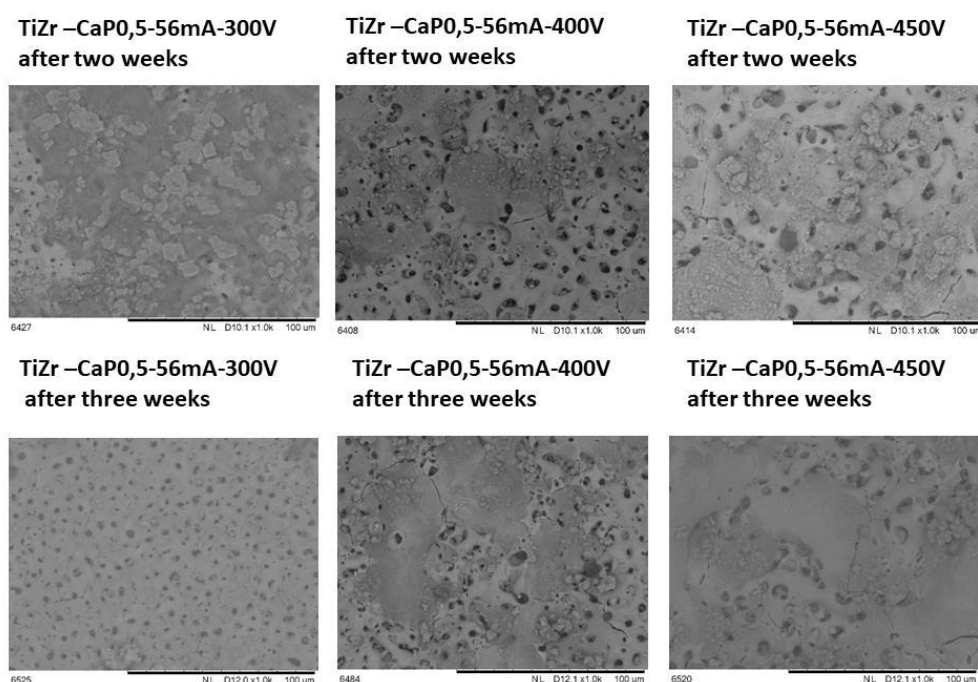


Рисунок 3.8 – SEM зображення зразків TiZr після 2 та 3 тижнів тесту на SBF

### 3.2.3 Культура клітин

Поверхні зразків модифікованих за різних параметрів напруги електричного струму показали біосумісність, а також здатність до адгезії та проліферації остеобластів. Немає суттєвих відмінностей у прикріпленні клітин у 1-й день між зразками TiZr-300 та TiZr-400, проте остеобласти набагато краще фіксуються до поверхні TiZr-450 ( $p \leq 0,05$ ). У період з 1 по 3 день культивування, спостерігається

значна проліферація клітин до 60 % на зразках TiZr-300 та 78 % - TiZr-450 відповідно. Клітинна проліферація сповільнюється з 3 та 7 день спостереження на зразках TiZr-300 та TiZr-400, що може свідчити про проблемність тривалої проліферації остеобластів. В іншому випадку на поверхні TiZr-450 клітини активно проліферують до 99 % ( $p \leq 0,01$ ) за числовими даними резазурину. Слід зазначити, що адгезія остеобластів на поверхні зразків TiZr-400 та TiZr-450 значно вища порівняно з контролем TCP як на 3, так і на 7 день спостереження (рис. 3.9).

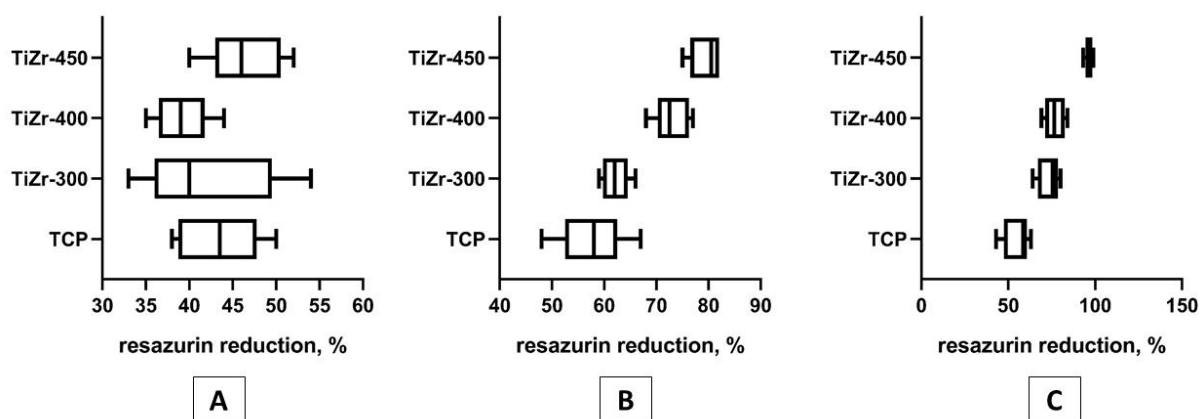


Рисунок 3.9 – Показники адгезії остеобластів експериментальних та контрольних TCP зразків на 1 (A), 3 (B) та 7 день (C)

### 3.2.4. Тест на адгезію бактерій

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

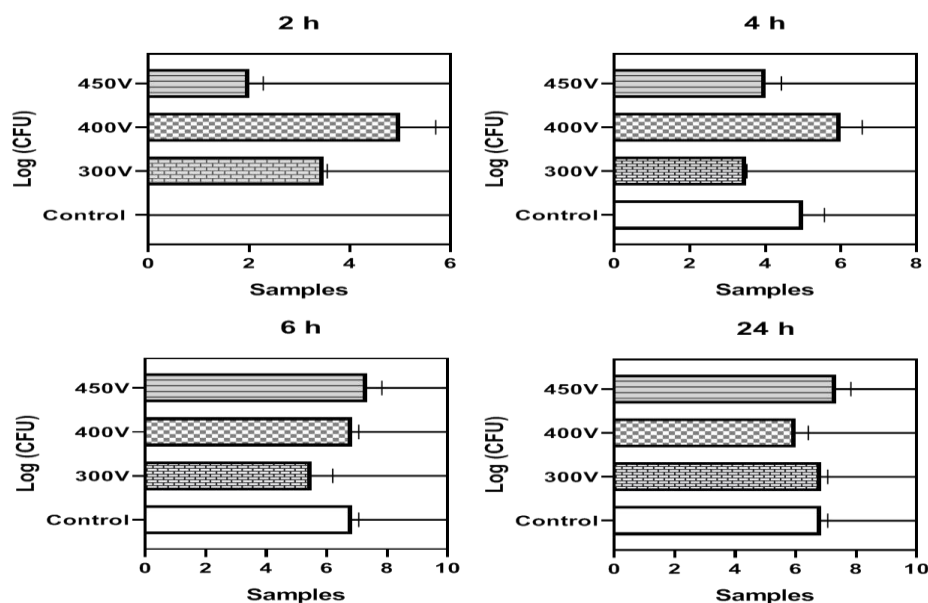


Рисунок 3.10 – Кількість приєднаних бактерій на поверхнях зразків TiZr протягом 24 год інкубації

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

Зразки оброблені ПЕО при 300 вольтах зберігають стабільну швидкість адгезії через 2 та 4 години. При цьому демонструють мінімальний рівень кількості бактерій в 5 log<sub>10</sub> CFU, але тривала протягом інкубація 24 годин призводить до інтенсивного приєднання бактерій аж до 7,6 log<sub>10</sub> CFU.

Необхідно відмітити збалансованість показників на поверхні зразків TiZr – 400 вольт, адже вони були майже однаковими протягом усього експерименту (від 5 log<sub>10</sub> CFU до 6,6 log<sub>10</sub> CFU).

Тривале спільне культивування протягом 24 годин призводить до втрати антиадгезивних властивостей, адже всі імпланти демонструють майже однакові показники адгезії мікроорганізмів, що коливаються від 6 до 7,6 log<sub>10</sub> CFU.



### 3.3 Плазмова електрооксидация зразків TiZr з наночастинками оксиду цинку

#### 3.3.1. SEM, EDX and CA

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

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

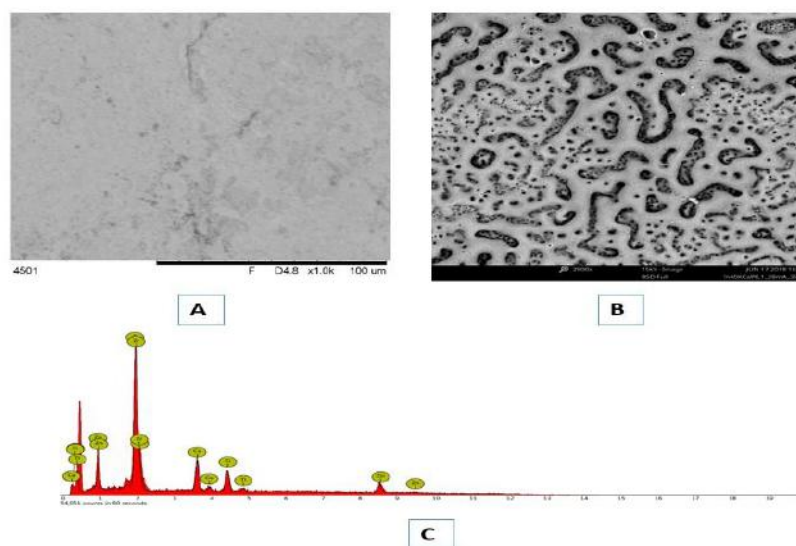


Рисунок 3.11 – СЕМ зразків TiZr до (А) та після (В) ПЕО з ZnONPs зі спектрами ЕДР модифікованої поверхні (С).

Контактний кут модифікованої поверхні зразків з TiZr після ПЕО становив  $58,2 \pm 17,6$ , що суттєво нижче в порівнянні з контрольними показниками ( $78,9 \pm 6,9$ ). Дані показники свідчать про достатню гідрофільність поверхні та повинні забезпечувати сприятливе середовище для адсорбції білка в перші хвилини після імплантації.

### 3.3.2 Оцінка біоактивності

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

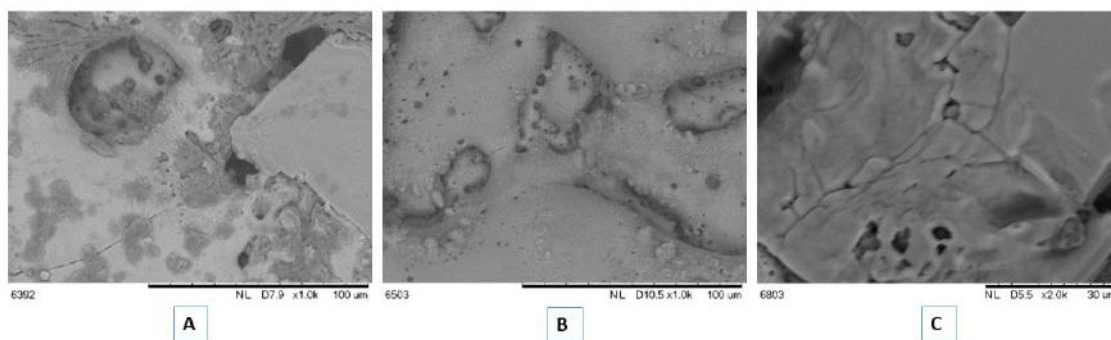


Рисунок 3.12 – СЕМ-зображення модифікованої поверхні TiZr після 2 (А), 3 (В) та 4 (С) тижнів занурення в розчин SBF

### 3.3.3 Культура клітин

На 1 день після посіву адгезія клітин (остеобластів людини) на поверхні TiZr зразків модифікованих ПЕО, була значно нижчою ( $p \leq 0,01$ ) порівняно

з контрольними показниками ( $40,6 \pm 7,4$  % проти  $54,3 \pm 3,2$  %). Але наступний етап культивування показав достатній прогрес проліферації клітин на 3 та 7 добу, порівняно контрольними зразками, де на 3 день відмічається зменшення кількості клітин. В останній термін кількість остеобластів на модифікованій поверхні, була значно вищою (рис. 3.13 А). На 7-й день спостереження не зважаючи на високу концентрацію Zn після плазмової електрооксидзації, на поверхні не виявлено клітинної токсичності, а навпаки присутні ознаки стимуляції проліферації остеобластів.

### 3.3.4 Мікробіологічне дослідження

Бактеріологічне дослідження підтвердило адгезію та проліферацію *S. aureus* під час 24-годинного експерименту (рис. 3.13 В). Через 2 години інкубації поверхня модифікована ПЕО мала однакову концентрацію бактерій порівняно з контрольною (полірований ZrNb імплантат). Але через 4 години експерименту рівень мікроорганізмів на експериментальних зразках залишився стабільним. У той час як концентрація бактерій на поверхні контрольних імплантатах показала значну проліферацію протягом усього часу до  $8 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$  за 24 години. Отже, наявність наночастинок оксиду цинку негативно впливає на процес адгезії *S. aureus* та може стримувати розмноження бактеріальних клітин на поверхні імплантату.

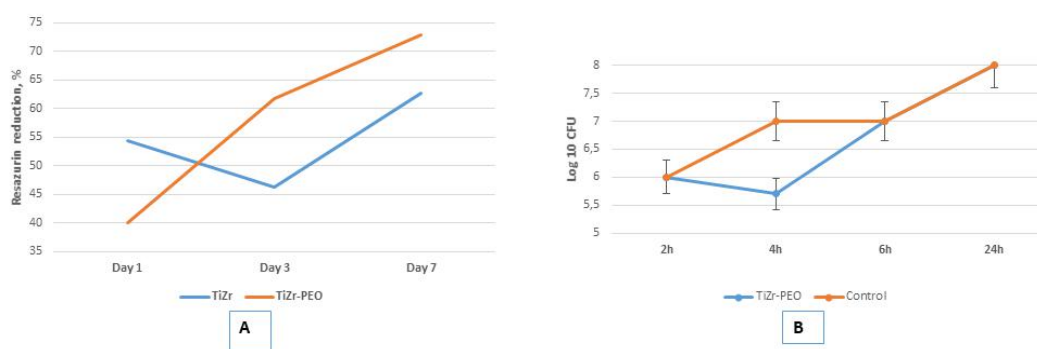


Рисунок 3.13 – Зниження резазурину протягом 7 днів культивування клітин остеобластів людини (А) та адгезії клітинних клітин бактерій протягом 24 годин спільного культивування (В).

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

ПЕО покриття зразків набули різноманітної морфології з різною пористою структурою (рисунок 3.14). Морфологія поверхні зразка S2 була більш шорсткою та пористою. Оксидний шар мав кратероподібну структуру з розміром пор до 7 мкм<sup>2</sup>. Після плазмової електрооксидації на поверхні зразків був сформований оксидний шар. Морфологія якого була представлена мезопористими структурами, такими як: пори, кратери та тріщини різної площі та глибини. Відмінною рисою покриття S1 був більш однорідний тип поверхні, з кратероподібними порами розміром до 1 мкм<sup>2</sup>. Мікротріщини не виявлялись ні на одній з поверхонь.

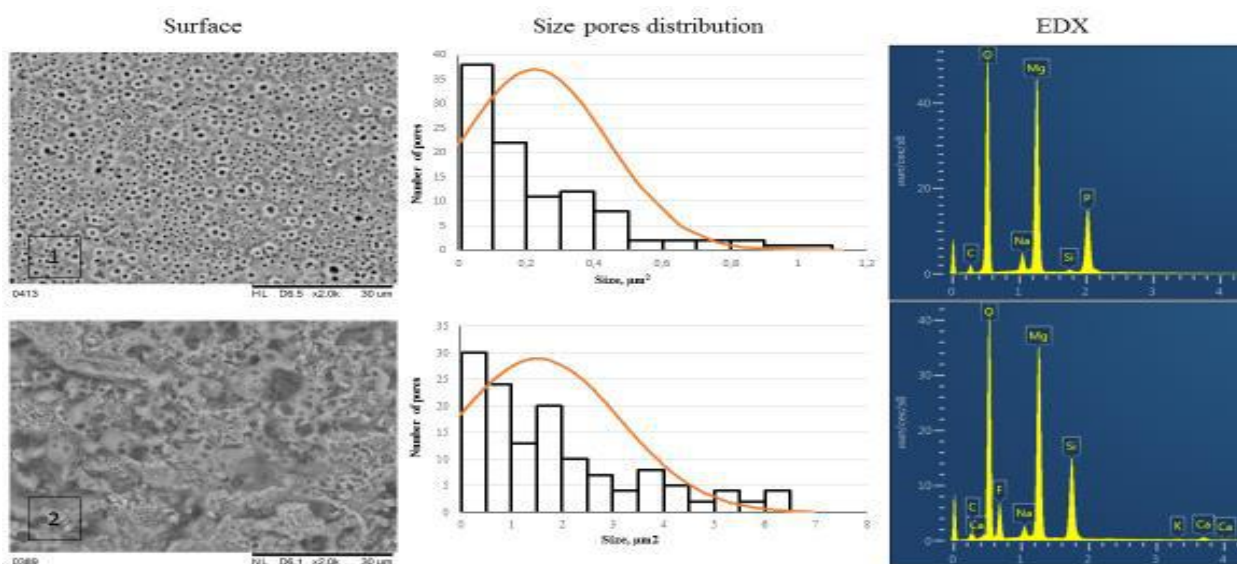


Рисунок 3.14 - аналіз морфології та хімічного складу поверхонь методом SEM. Ліві панелі, SEM-зображення зразків, анодованих при 250 V в електролітах для ванн на основі силікату 1 і 2; середні панелі, розподіл розмірів пор; праві панелі, відображення спектрів EDX з аналізом елементного складу поверхонь зразка.

Елементний склад поверхні покриттів оцінювали за допомогою EDX-аналізу (рисунок 3.14) було виявлено, що Mg і O представляють основний об'єм покриття.

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

Профіль шорсткості (Ra) і показник (Rz) ПЕО покриттів представлені в таблиці 3.14. Значення Ra і Rz збільшуються, при додаванні Са до електроліту порівняно з Na. Такий високий показник шорсткості зумовлений утворенням електричної дуги на поверхні зразків, що призводить до появи розвантажувальних каналів чи кратерів. Завдяки цьому можна зробити висновок, що товщина оксидного шару в зразках для електроліту 2 більша. Виражена мезопориста структура призводить до збільшення загальної площі поверхні. Це у свою чергу може сприяти кращій адгезії біологічних структур.

Таблиця 3.1 - показники шорсткості та контактного кута

Зразок	Ra, $\mu\text{m}$	Rz, $\mu\text{m}$	CA
S1	0.39 $\pm$ 0.01	2.83 $\pm$ 0.13	22.7 °
S2	1.67 $\pm$ 0.08	11.6 $\pm$ 1.24	16.62 °

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

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

шляхом вимірювання втрати ваги зразків та аналізу EDX поверхонь. Зразок, отриманий в ПЕО з електролітом 1, втратив 6,2% від ваги після 63 днів занурення в SBF, тоді як зразок з електролітом 2 для ванни втратив лише 4,88% від ваги. Динаміка зміни ваги в різні періоди представлена в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 - масові зміни зразків протягом SBF- тесту

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

Елементний аналіз поверхонь за допомогою EDS через 1, 3, 7 та 63 дні занурення представлені у таблиці 3.3.

Після першого дня елементний склад покриття був представлений як Mg, так і O. Масивна присутність O підтвердила оксидний характер поверхні. I Si, і F були включені з розчинів до складу поверхні (таблиця 3. 3).

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

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

### **Резьтати розділу опубліковані в (Резьтати розділу опубліковані в**

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

Таблиця 3.3 - елементний склад поверхонь зразків залежно від тривалості SBF-тесту

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

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

Модифікована поверхня мала пористу структуру в обох варіантах. На рисунку 3.15 представлені SEM-зображення поверхні зразків, анодованих при напрузі до 250 V. Поверхня покриттів має кратероподібну морфологію. Пори, можливо, є результатом виходу газів під час процесу ПЕО. Кратери є результатом охолодження та осадження розплавленого матеріалу на поверхню. Фосфатне покриття сприяє зростанню розміра і меншому розподілі пор, ніж силікатне покриття. Поверхня була вкрита мікротріщинами. У зразків, анодованих у силікатному розчині, поверхня характеризується значно більшою кількістю пор та рівномірним їх розподілом.

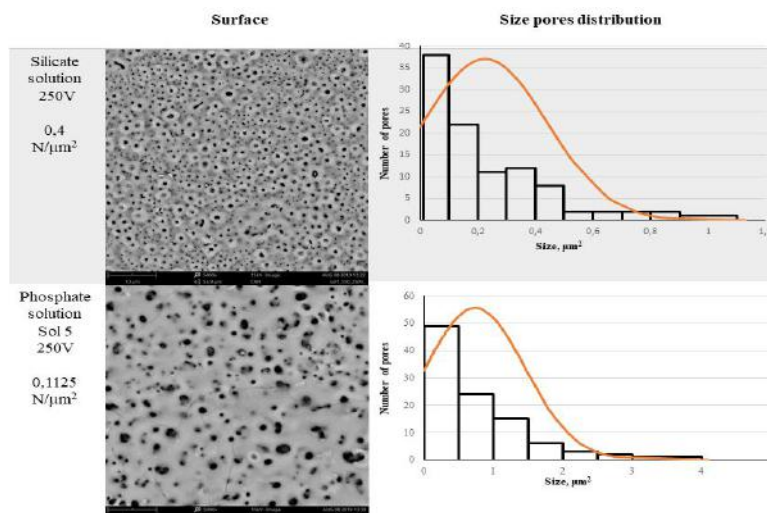


Рисунок 3.15 - зображення SEM-зразків, анодованих при 250 V в силікатних та фосфатних розчинах, кількість пор та розподіл за розміром

Розподіл елементів в покритті отриманий за допомогою EDX-аналізу представлений на рисунку 3.16. Ці покриття в основному складаються з Mg та O. Це говорить про характер оксидного покриття ПЕО. Аналіз отриманих спектрів EDX виявляє Si і F, як включення силікатного, а атомів P у покриттях отриманих з залученням фосфатного електроліту.

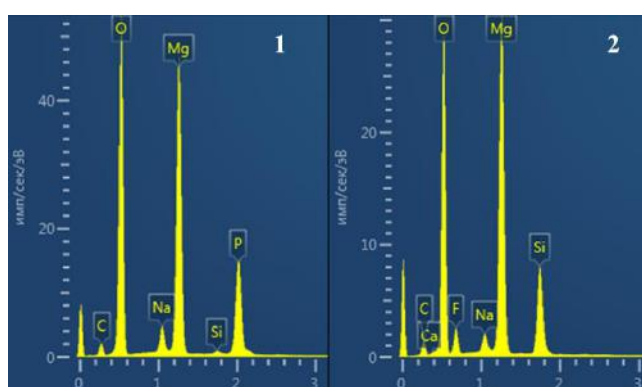


Рисунок 3.16 - відображення спектрів EDX силікатного та фосфатних покриттів



Зразок із силікатним покриттям втрачає 1,1% ваги через 21 день занурення у SBF, тоді як фосфатне покриття, зменшує вагу до 0,68%. Динаміка зміни маси на добу представлена в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 - вагові зміни силікатних та фосфатних покриттів під час SBF-тесту

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

Значення шорсткості покриттів ПЕО представлено в таблиці 3.5 значення  $R_a$  та  $R_z$  для фосфатних покриттів зростають порівняно з силікатними. Така величина шорсткості обумовлена іскроутворенням на поверхні, що призводить до появи розрядних каналів та кратерів із більшими розмірами.

Таблиця 3.5 - показники шорсткості та контактного кута для силікатних та фосфатних поверхонь

<b>Ім'я</b>	<b><math>R_a, \mu m</math></b>	<b><math>R_z, \mu m</math></b>	<b><math>CA</math></b>
Силікатний розчин	0.39±0.01	2.83±0.13	22.7 °
Розчин фосфату	1.09±0.63	7.79±3.8	70.73 °

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

У цьому дослідженні ми виявили залежність терміну інкубації й швидкості адгезії та життєдіяльності бактерій. Не було значної різниці в початковій адгезії після 2-годинної інкубації між зразками, анодованими при однаковій напрузі, але в різних розчинах (рисунок 3.17).

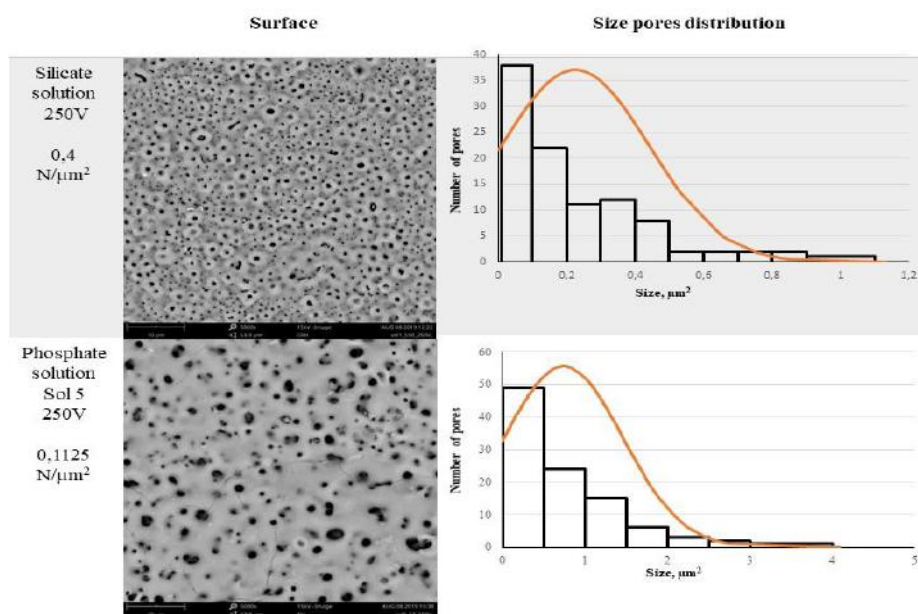


Рисунок 3.17 – зображення SEM-зразків, анодованих при 250 V в силікатних та фосфатних розчинах, кількість пор та розподіл за розміром.

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

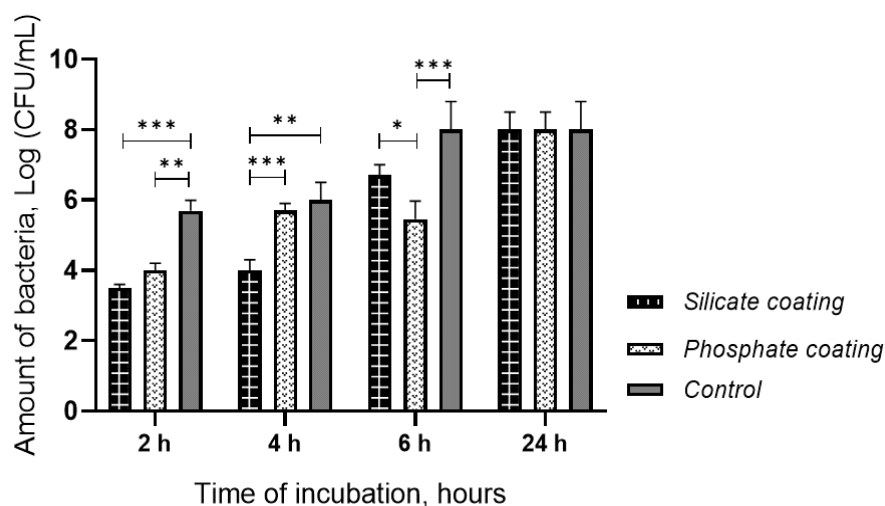


Рисунок 3.18 - кількість життєздатних бактерій, що адгезувались на поверхнях зразків через різні інтервали часу експерименту; зірочками позначається суттєва різниця (\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,005$ ; \*\*\* -  $p < 0,0005$ )

### Результати розділу опубліковані в (Результати розділу опубліковані в

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

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

На дифрактограмі синтезованої речовини відображались під кутами  $43,431^\circ$ ,  $50,553^\circ$  і  $74,264^\circ$ , що відповідає відбиттям від кристалографічних площин кубічної фази Cu (111), (200) та (220). Сторонні фази дифрактометрично не виявлені в матеріалі. Характеристики дифракційних піків сформованого зразка відповідали JCPDS №. 04-0836 (рисунок 3.19). Середній розмір областей когерентного

розсіювання синтезованого матеріалу становив 15,1 нм, розрахований за фізичним розширенням дифракційного піку (200) за формулою Шеррера.

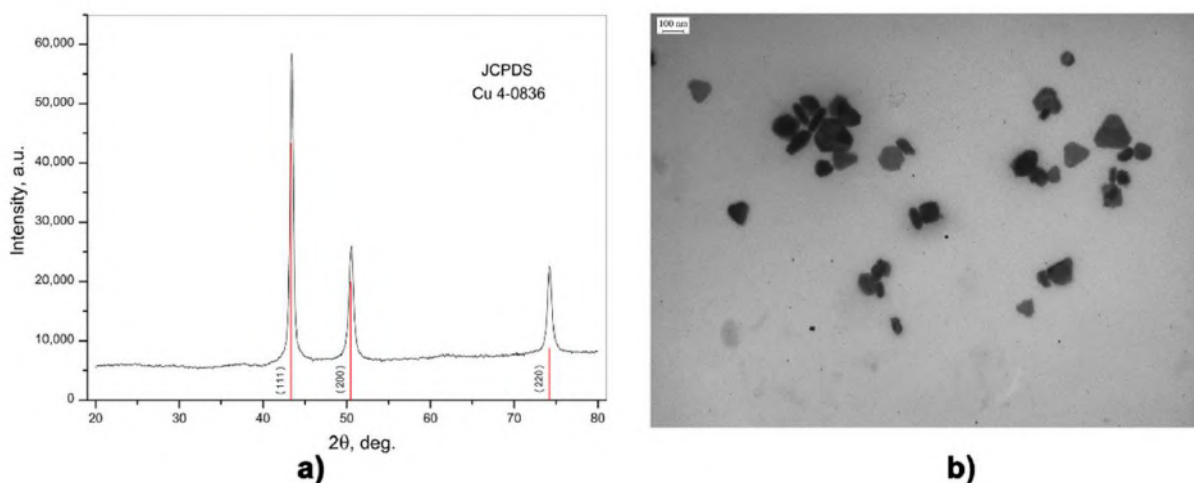


Рисунок 3.19 - характеристика CuNPs (a) дифрактограма та (b) TEM

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

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

При цьому вся поверхня модифікованого сплаву була пробита тріщинами (рисунок 3.20) різної довжини та неправильної форми. Важливо вказати на появу овальних пор та кратерів різного розміру. Тому при використанні ПЕО з електричною напругою 300 V внутрішні розміри пор становили від 1 до 2 мкм, а невелика кількість пор від 3 до 6 мкм. Збільшення напруги до 450 чи 500 V призвело до розширення кратерів. Внутрішні розміри варіювали від  $2,1 \pm 0,4$  до  $6,3 \pm 0,8$  мкм. Слід також зазначити, що при використанні режиму з напругою електричного

струму в 500 V на поверхні зразків з'явилися ймовірно фосфатні відкладення (рисунок 3.20).

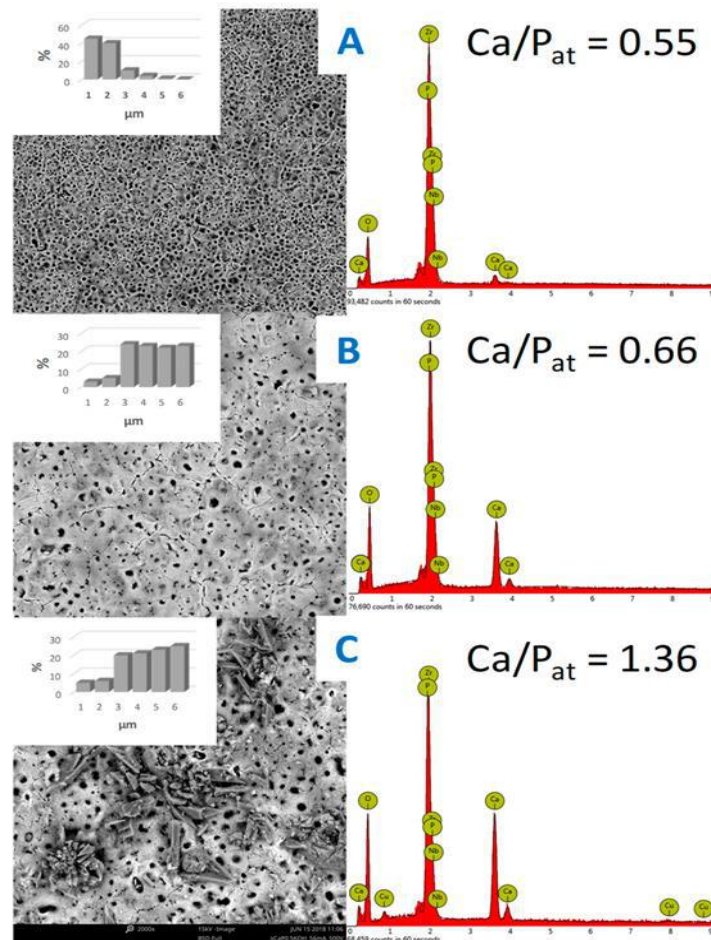


Рисунок 3.20 - SEM-поверхні сплаву ZrNb після ПЕОв Cu-вмісному розчині в різних режимах (300 V - (A), 450 V - (B) та 500 V - (C)) з частотою розподілу пор

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

У таблиці 3.6 представлені результати контактного кута. Усі досліджені поверхні ZrNb після модифікації ПЕО характеризуються контактним кутом нижче  $90^\circ$ , тому можна зробити висновок, що модифіковані поверхні гідрофільні. Крім того, пориста структура матеріалу імплантату може призвести до кращої змочуваності поверхні біоматеріалу. Відомо, що пори, які існують на шарі ПЕО, підтримують менший контактний кут з водою та вищу змочуваність завдяки можливості розповсюдження частинок води в порах. Деякими авторами спостерігалось зменшення контактного кута після ПЕО обробки титанових сплавів.

Таблиця 3.6 - Контактний кут поверхні ZrNb після обробки ПЕО в електроліті з CuNPs.

Зразок	Контактний кут
ZrNb-300	$57.4 \pm 1.9$
ZrNb-450	$40.7 \pm 4.3$
ZrNb-500	$28.7 \pm 1.4$

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

Коефіцієнт Zr/Ca зменшився з 15,56 у ZrNb-300 до 0,7 у зразках ZrNb-500, Zr/P одночасно зменшився з 7,51 до 1,0. Співвідношення Ca/P зросло з 0,55 у ZrNb-300 до 1,36 у ZrNb-500. Варто зазначити, що співвідношення Ca/P 1,36 (ZrNb-500) сильно схоже на співвідношення Ca/P для гідроксиапатиту (НА), яке дорівнює 1,67. Гідроксиапатит - це неорганічний фосфат кальцію і головний компонент кісткової тканини людини. Він відповідає за правильний зв'язок між матеріалом імплантату та кістковою тканиною людини. Це причина, чому співвідношення Ca/P ПЕО покриття ZrNb-500, подібного до гідроксиапатиту, може призвести до покращення біосумісних властивостей. Ці дані можуть свідчити про потовщення керамічного покриття зі збільшеною напругою, а також про збільшення включених елементів в оксидному шарі. Перша поява міді в поверхневому шарі була виявлена після

проведення ПЕО в електроліті при 500 V. Було помічено, що підвищення напруги під час процесу плазмової електрооксидзації в електроліті 0,1 М  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)$  призводить до зниження співвідношення  $\text{Ti}/\text{Ca}$  та  $\text{Ti}/\text{P}$ .

На рисунку 3.21 показані графіки рентгенівської дифракції сплаву  $\text{ZrNb}$ , обробленого ПЕО в електроліті, що містить  $\text{Ca}$ ,  $\text{P}$ ,  $\text{KOH}$  та наночастинки  $\text{Cu}$ .

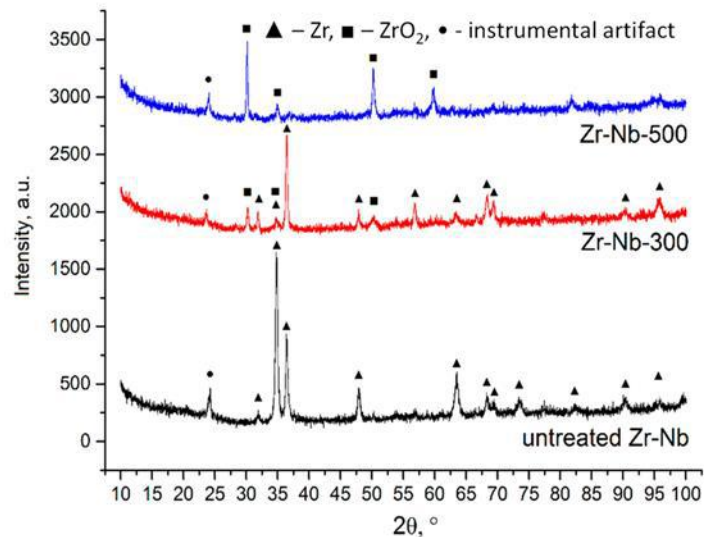


Рисунок 3.21 - діаграма рентгенівської дифракції сплавів  $\text{ZrNb}$  із покриттями ПЕО, утвореними в присутності наночастинок  $\text{Cu}$

Діаграма XRD необробленого сплаву наведена нижче. Піки, позначені трикутниками відповідали  $\text{Zr}$  (картка JCPDS 5-665). Домішки  $\text{Nb}$  не змінили пікових положень на малюнку. Відносна інтенсивність відображень відрізнялася від аналогічних показників карти JCPDS. На рентгенограммі зразків, оброблених ПЕО, при 300 V виникла фаза оксиду цирконію ( $\text{ZrO}_2$ , картка JCPDS 49-1642, піки, позначені квадратами). Отже, дифракційна картина  $\text{Zr}$  у цьому випадку повністю відповідає еталону карти, що може свідчити не тільки про утворення оксиду на поверхні, але й про перегрупування металевих шарів. На малюнку зразка, обробленого при 500 V, відмічаються лише піки, що відповідають оксиду цирконію, що свідчить про утворення на поверхні товстого оксидного шару з кристалічною структурою  $\text{ZrO}_2$ . Слід зазначити, що кристалічних фаз, що містять

мідь, не виявлено. Пік, позначений •, не можна віднести до жодної кристалічної фази, і, швидше за все, це інструментальний артефакт.

Експериментальне покриття, сформоване на сплаві ZrNb при 500 V, було проаналізовано за допомогою методики XPS, а результати вимірювань представлені на рисунку 3.22 та в таблиці 3.7.

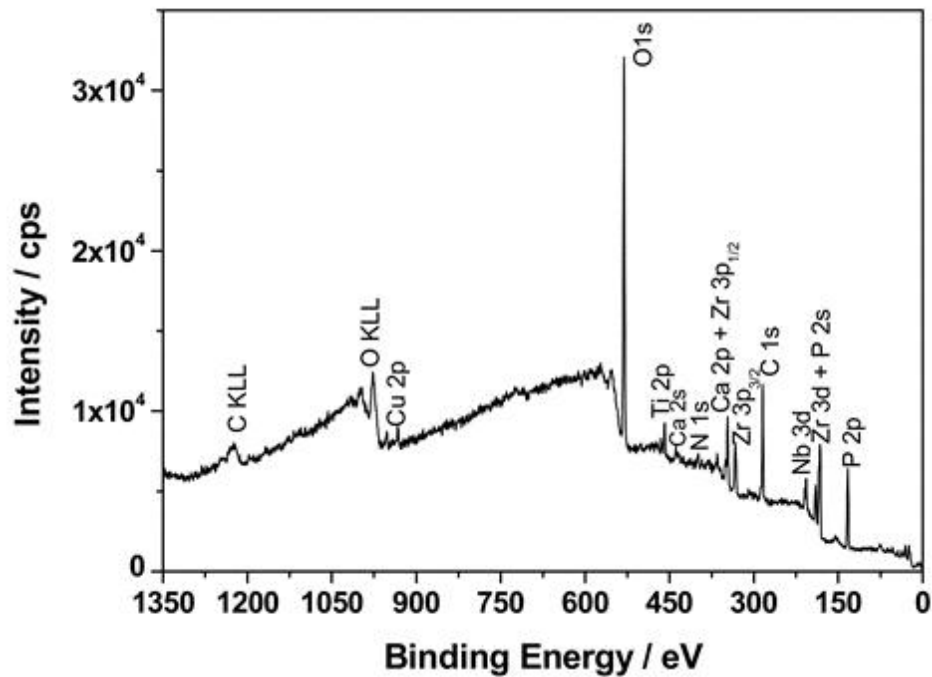


Рисунок 3.22 - XPS спектр зразка ZrNb-500

Хімічний склад шару ПЕО оцінювали за допомогою XPS-спектроскопії. Поверхневий аналітичний метод підтвердив наявність таких елементів: O, Zr, Nb, Ti, Ca, P, N, Cu та C, котрі показані на рисунку. Детальний аналіз спектрів XPS високої роздільної здатності після деконволюції. Процедура показала, що всі металеві елементи перебувають в окисленому стані (рисунок 3.3.5). Знайдено такі оксиди:  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  ( $\text{Nb}3d_{5/2}$  – 207,2 eV),  $\text{ZrO}$  – ( $\text{Zr}3d_{5/2}$  – 182,7 eV),  $\text{TiO}_2$  – ( $\text{Ti}2p_{3/2}$  – 458,7 eV) та  $\text{Cu}_2\text{O}$  – ( $\text{Cu}2p_{3/2}$  – 932,7 eV), де сигнал O1s при 530,1 було віднесено до металоокисневих зв'язків. Оксиди металів після ПЕО процесу сплаву Zr – Nb у розчинах на основі Ca та P були виявлені у присутності фосфатних та карбонатних груп. Характерні сигнали для O1s при – 531,2 eV,  $\text{P}2p_{3/2}$  при – 133,3 eV,  $\text{Ca}2p_{3/2}$



при – 347,4 eВ і C1s при – 88,9 eВ були віднесені до цих хімічних станів. Більше того, детальний XPS-аналіз піків C1s, O1s та N1s показав певний внесок в оксидний шар типових домішок у вигляді зв'язків C – C, C – O, C = O та C – N. Характерно, що калію в аналізованому оксидному шарі не виявлено. Титан, ймовірно, є забрудненням після процесу полірування. Результати XPS узагальнені в таблиці 3.7 та на рисунку 3.23

Таблиця 3.7 - Дані XPS, оцінені за результатами деконволюції Nb3d, Zr3d, Ti2p, Cu2p, P2p, Ca2p, O1s, C1s та N1s, спектри XPS, записані для зразка ZrNb-500

Binding Energy/eV High Resolution Spectra								Chemical Bonds/States	Chemical Composition/at. %	
Nb3d <sub>5/2</sub>	Zr3d <sub>5/2</sub>	Ti2p <sub>3/2</sub>	Cu2p <sub>3/2</sub>	P2p <sub>3/2</sub>	Ca2p <sub>3/2</sub>	O1s	C1s	N1s		
207.2	182.7	458.7	932.7			530.1			Me-O	Nb—1.2
				133.3	347.4	531.2	288.9		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	C—28.4
							284.5		C-C	Ca—3.0
							285.7	399.6	C-O/C-N	P—14.5
						532.7	287.4		C=O	Zr—3.9
								401.3	NH <sub>x</sub>	N—1.5
										Ti—2.0
										O—44.7
										Cu—1.0

Результати іонів, що виділяються з аналізованих покриттів, представлені на Рисунку. Аналізуючи результати вивільнення різних іонів із покриттів ПЕО, можна зробити висновок, що концентрація іонів Са була досить стабільною. Для всіх зразків та часу вивільнення рівень концентрації Са становив ~ 80,00 – 90,00 мг/л і не змінювався протягом 2–6 тижнів після вивільнення. Інший висновок можна зробити у випадку концентрації іонів фосфору. Концентрації іонів Р для ZrNb-300 та ZrNb-450 були не вище 1,00 мг/л, навіть після шести тижнів дослідження. Однак поверхня ZrNb анодизована в 500 V характеризується більш значним вивільненням іонів Р, приблизно 0,35 – 0,40 мг/л. Це може бути пов'язано з більшим вмістом фосфору в оксидному шарі під час процесу ПЕО, в зв'язку з застосуванням більш високої напруги (500 V). Подібні результати були отримані щодо вивільнення іонів Си. Зразки, анодовані при нижчій напрузі (300 V), характеризуються вивільненням іонів Си в концентрації менше ніж 0,10 мг/л, тоді як в умовах напруги 450 та 500 V з вивільнення іонів Си становлять ~ 0,35 – 0,40 мг/л.

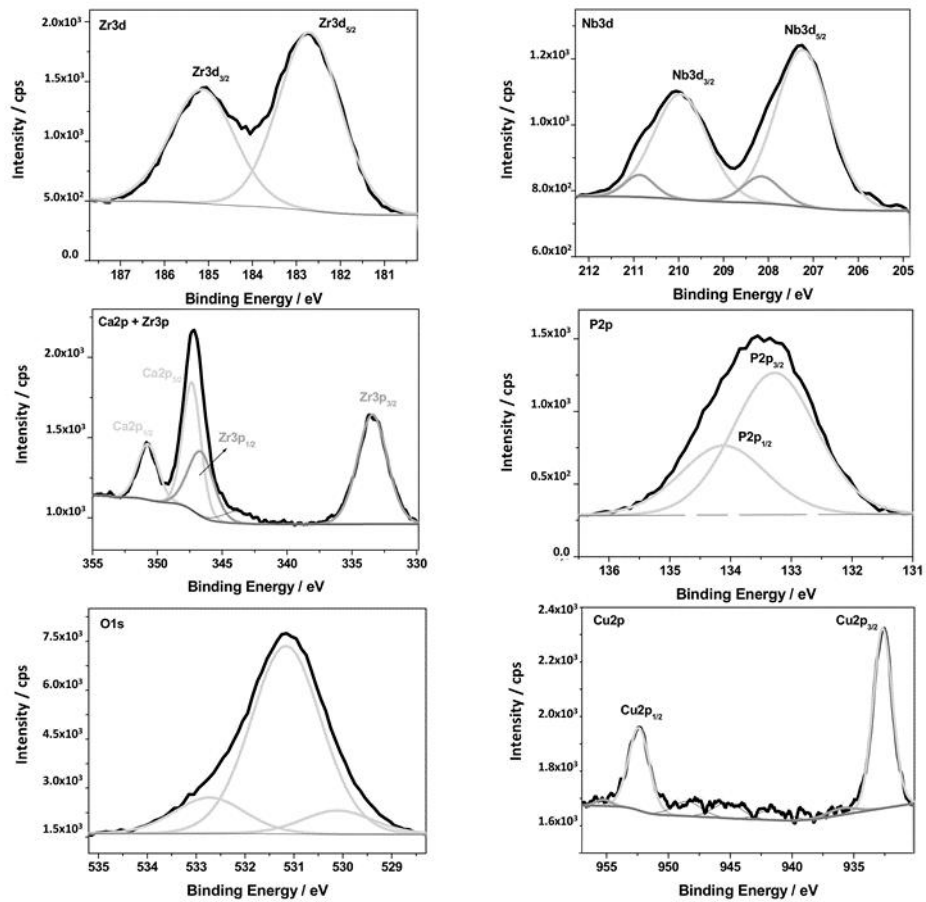


Рисунок 3.23 - спектри XPS з високою роздільною здатністю після процедури деконволюції

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

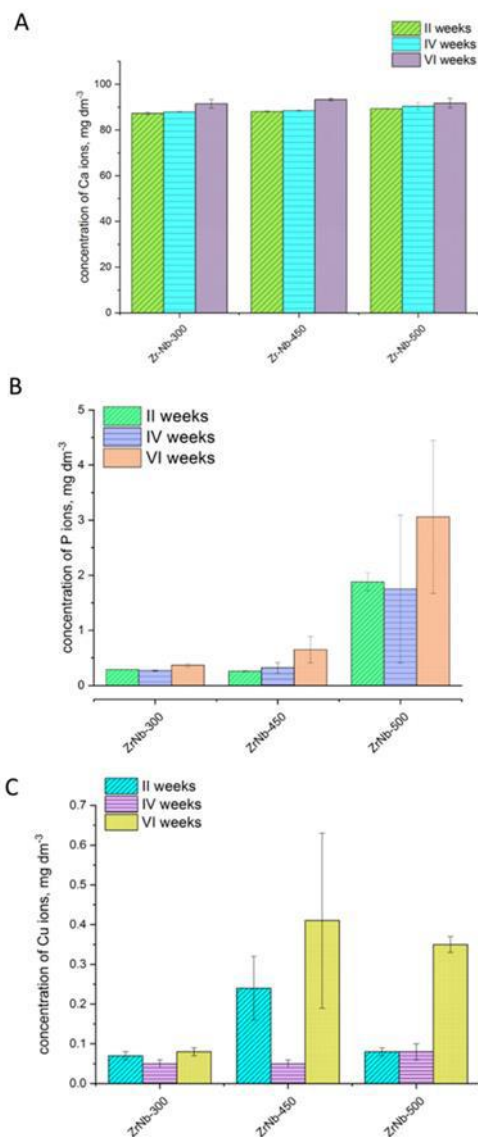


Рисунок 3.24 - концентрація іонів ((A) – Ca; (B) – P; (C) – Cu), що виділяються з покриттів після занурення в розчини Рінгера на термін до шести тижнів. Концентрація іонів Zr та Nb для всіх зразків після кожного вимірювання була нижче 0,01 мг / л (включаючи еталонну пробу)

На рисунку 3.25 представлені результати цитосумісності зразків до та після обробки ПЕО (з додаванням CuNP). Через 24 години та три дні проліферації клітин на поверхні контрольних зразків відмічається значно нижча цитосумісність; відсоток скорочення резазурину був нижчим ніж 20%, тоді як він становив ~ 35–63% для експериментальних покриттів з включеними CuNPs. Після семи днів культивування клітин необроблена поверхня імплантату також характеризувалася

відносно високою цитосумісністю, де відсоток резазурину становив  $\sim 55\%$ . Незважаючи на те, що всі досліджені зразки показали хороші показники цитосумісності через сім днів, варто зазначити, що покриття, яке включає CuNP, виявило кращу цитосумісність вже на перший день дослідження. Що є важливою особливістю для забезпечення належного росту та розмноження живих клітин відразу після імплантації.

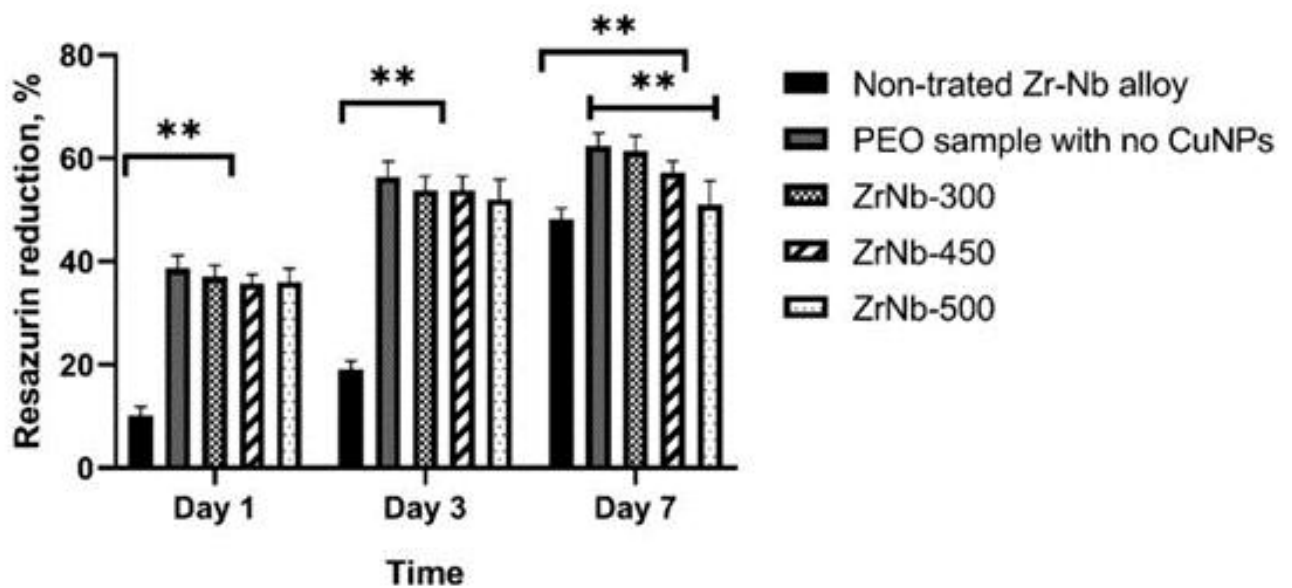


Рисунок 3.25 - тест на аналіз відновлення резазурину в різні періоди культивування остеобластів у зразках ZrNb з ПЕО в різних режимах напруги.

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

Усі зразки з CuNPs продемонстрували подібні адгезивні властивості бактерій через 2 год після культивації з максимальною концентрацією *S. aureus* при  $3,7 \log$  CFU (рисунок 3.26).

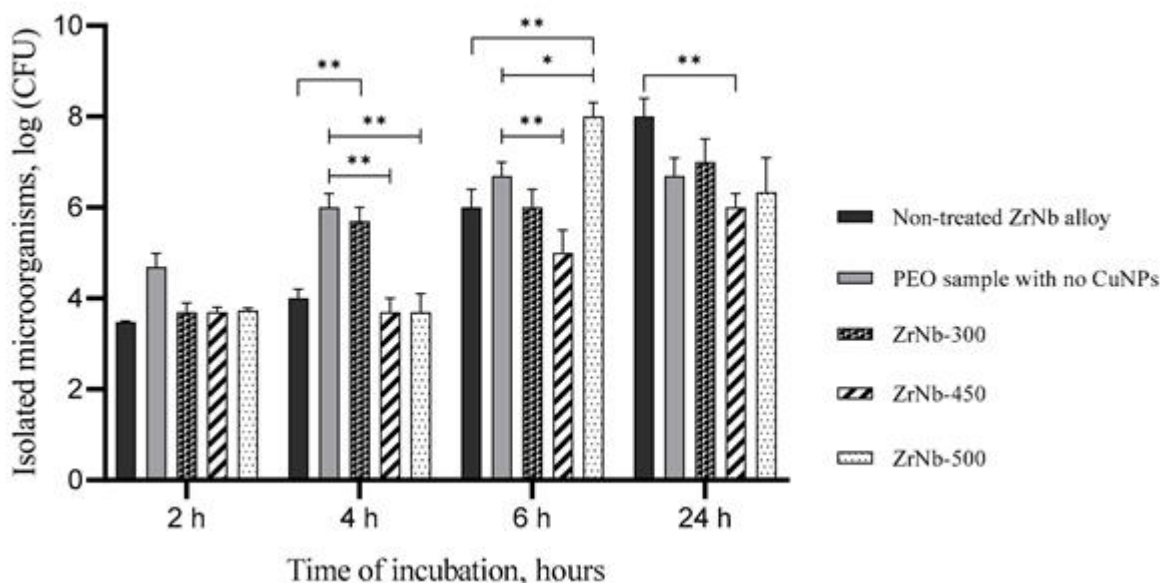


Рисунок 3.26 - кількість прикріплених бактерій на поверхнях зразків ZrNb у різні моменти часу інкубації. Дані є середніми та значення SD. Зірочками позначено значення  $p$  між групами: \* -  $p < 0,005$ ; \*\* -  $p < 0,0001$

Суттєвих відмінностей між кількістю бактерій у зразках як сплавів Zr – Nb без ПЕО, так і зразків з ПЕО без CuNPs та ZrNb-300, ZrNb-450 та ZrNb-500 не було. Надмірний ріст бактерій був виявлений в контрольних зразках ПЕО та зразках ZrNb-300 через 4 год інкубації (до 6 log CFU) із суттєвими відмінностями порівняно із ZrNb-450 та ZrNb-500 ( $p < 0,0001$ ), що забезпечували антиадгезивну активність. Однак виявлений швидкий ріст бактерій на поверхні ZrNb-500 через 6 год порівняно з усіма іншими зразками ( $p < 0,0001$ ). Слід зазначити, що всі зразки, оброблені ПЕО, демонстрували меншу адгезію бактерій за 24 години інкубації порівняно з контрольними, але суттєві відмінності можна було виявити лише у режимі ZrNb-450. Найменша адгезія бактерій на поверхні ZrNb-450 може бути пов'язана з найвищим виділенням іонів Cu з поверхні ZrNb-450. Антибактеріальні властивості ПЕО-легованих покриттів не були кращими протягом перших 2–6 год порівняно з поверхнею без покриття. Хоча через 24 години всі три типи покриттів - ПЕО з CuNP виявили сильніші бактеріостатичні ефекти, ніж необроблена поверхня. У цьому випадку кількість бактерій *S. aureus* була значно нижчою,  $\sim 10$

– 100 разів, ніж для необроблених зразків. Результати показують, що включені CuNP до покриття ПЕО, виявляють бактеріостатичні властивості протягом 24 годин після процесу імплантації. Процес імплантації, як різновид операції, вимагає захисту від контамінації бактерій протягом перших кількох днів після операції, тому важливо забезпечити виражені бактеріостатичні властивості відразу після процесу імплантації.

### **3.7 Біоактивність чистого магнію після плазмового електролітичного окислення в розчинах на основі силікатів**

#### **3.7.1 Характеристика покриттів**

Після плазмового електролітичного окислення поверхня магнієвих сплавів має типову пористу структуру. ПЕО в електроліті С1 утворює субмікронні пори розміром до 0,5 мкм. Є окремі пори діаметром від 1,0 до 5,0 мкм, але вони не впливали на пористість (рис. 3.27). Підвищення напруги ПЕО з 200 до 250 В призвело до значного зменшення площі пор, з 21 до 9%. Обробка ПЕО в електроліті С2 забезпечила утворення пор із середнім діаметром від 1 до 5 мкм з деякими поодинокими порами розміром до 25,0 мкм (рис. 3.27). Площа пор в покриттях С2 коливалась від 15% (250 В) до 12% (300 В). Розмір пор є одним із критичних і суперечливих моментів для адгезії та проліферації клітин. Є деякі дані, які свідчать про те, що розміри пор від 5 до 70 мкм є сприятливими для остеогенної адгезії та проліферації клітин [109]. Brennan C. et al. продемонстрували швидку адгезію білка до нанопористої поверхні з наступним прикріпленням клітини [110]. Інші дослідження продемонстрували протиобростаючі властивості нанопористої поверхні, які різко зменшують адгезію бактерій [111]. Однак більшість дослідників припустили, що хімічні компоненти, змочуваність і розмір пор можуть впливати на адгезію клітин і бактерій одночасно, і кожна нова поверхня вимагає детального аналізу.

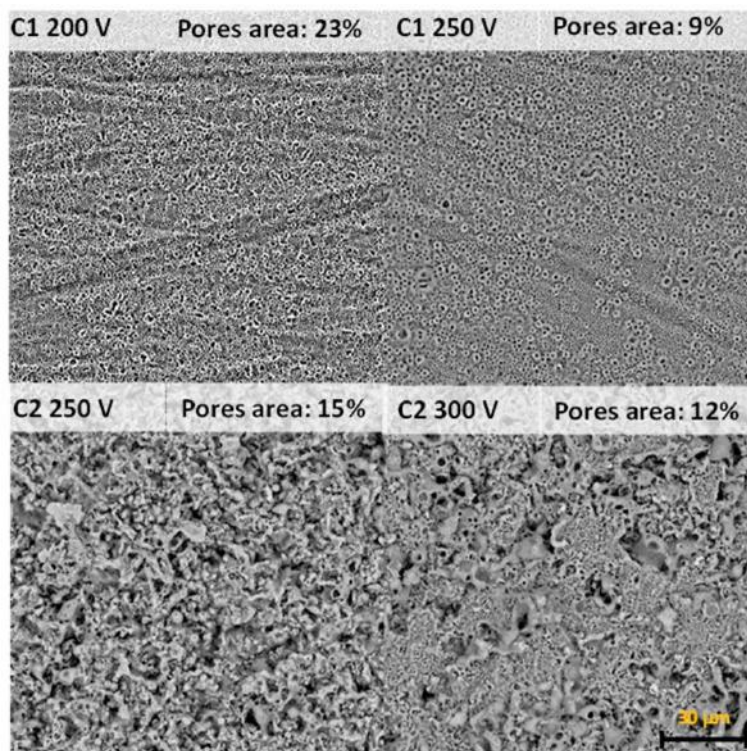


Рисунок 3.27 – Плоский вигляд SEM та площа пор поверхні зразків Mg після обробки ПЕО

Mg, O, Si, F були основними елементами, ідентифікованими на енергодисперсійних спектрах в обох покриттях електролітного типу (Рисунок 3.28, Таблиця 3.8). Спостерігається чітке включення Si в усі досліджені оксидні покриття. Вища концентрація Si була виявлена для електроліту типу C2. Також було помічено, що зі збільшенням напруги анодування в оксидне покриття включалося більше Si. 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 [109]. 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 (Таблиця 3.8).

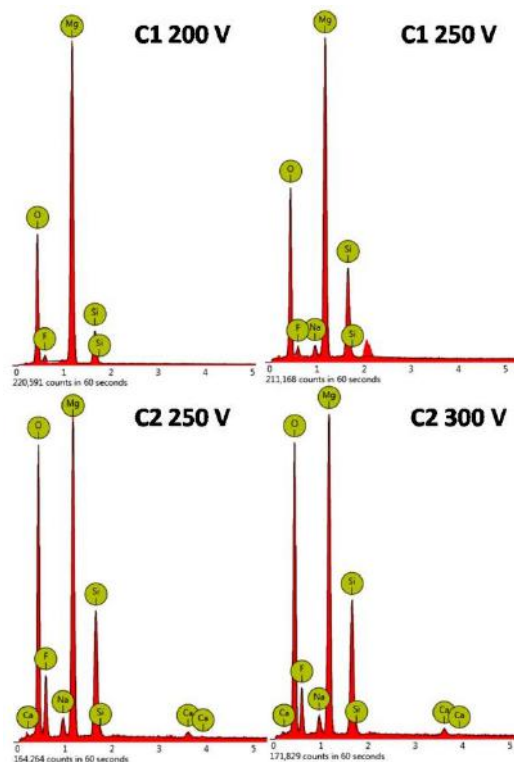


Рисунок 3.28 – Аналіз EDX зразків Mg після обробки ПЕО

Таблиця 3.8 – Аналіз EDX зразків Mg після процесу ПЕО.

Зразок	Напруга анодування, В	Виявлені елементи	Si/Mg співвідношення	F/Mg співвідношення	Ca/Mg співвідношення
C1	200	O, Mg, F, Si	$0,26 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	-
	250	O, Mg, F, Si, Na	$0,52 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,01$	-
C2	250	O, Mg, F, Si, Na, Ca	$0,54 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,01$
	300	O, Mg, F, Si, Na, Ca	$0,60 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$

Утворення стабільного оксидного шару є основним параметром, який вплине на стійкість до деградації, біосумісність та клінічні результати. Деякі дослідження продемонстрували, що товсте покриття запобігає ранній корозії *in vivo* і підвищує біосумісність Mg імплантатів [112, 113]. Електроліт C1 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 (C2) призвів до різкого збільшення



товщини оксидного шару, що досягло  $14,52 \pm 1,8$  мкм при напрузі 300 В (Рисунок 3.29).

Картування поперечного перерізу підтвердило утворення оксидних покриттів на підкладці Mg з включенням Si та F в оксидний шар (рис. 3.30).

Текстура поверхні має сильний вплив на адгезію осередків до покриття [110]. Отримані покриття продемонстрували спільні риси шарів — наявність пористості. З іншого боку, існує пряма залежність між прикладеною напругою, типом електроліту та шорсткістю. Товщина покриттів і параметри шорсткості Ra і Rz зростали зі збільшенням напруги для зразків типу C2. Покриття ПЕО, виготовлені в електроліті, що містить  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , показало тенденцію збільшення шорсткості зі збільшенням прикладеної напруги порівняно з електролітом C1. Значення параметрів шорсткості наведені на рисунку.

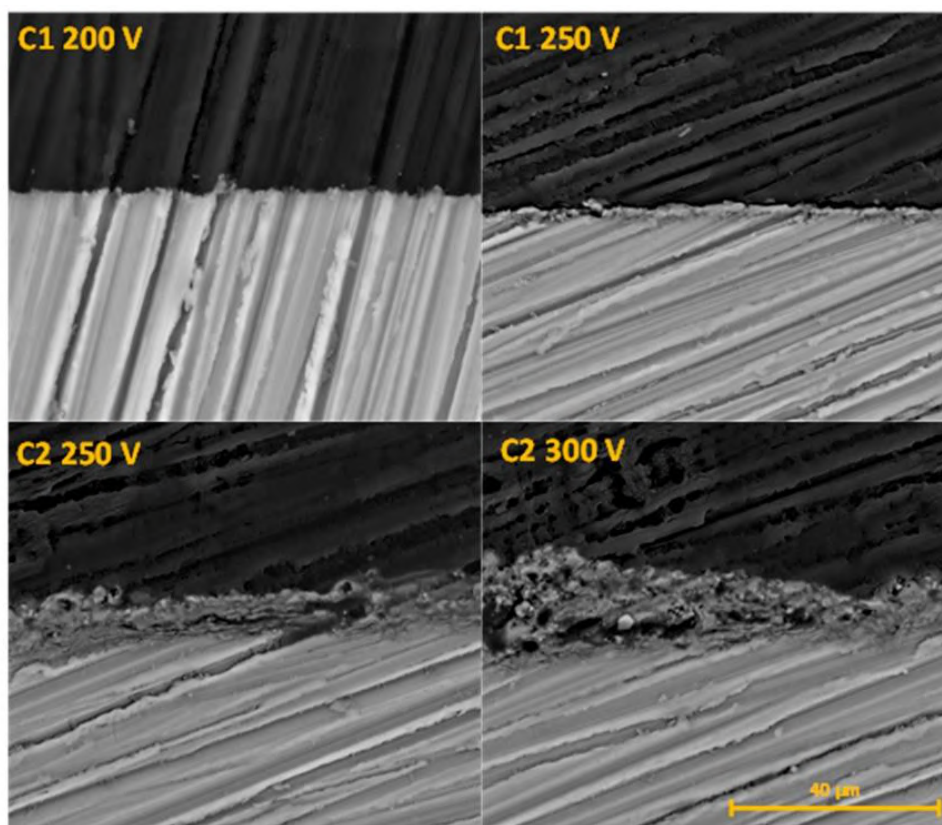


Рисунок 3.29 – Аналіз поперечного перерізу зразків Mg після процесу ПЕО

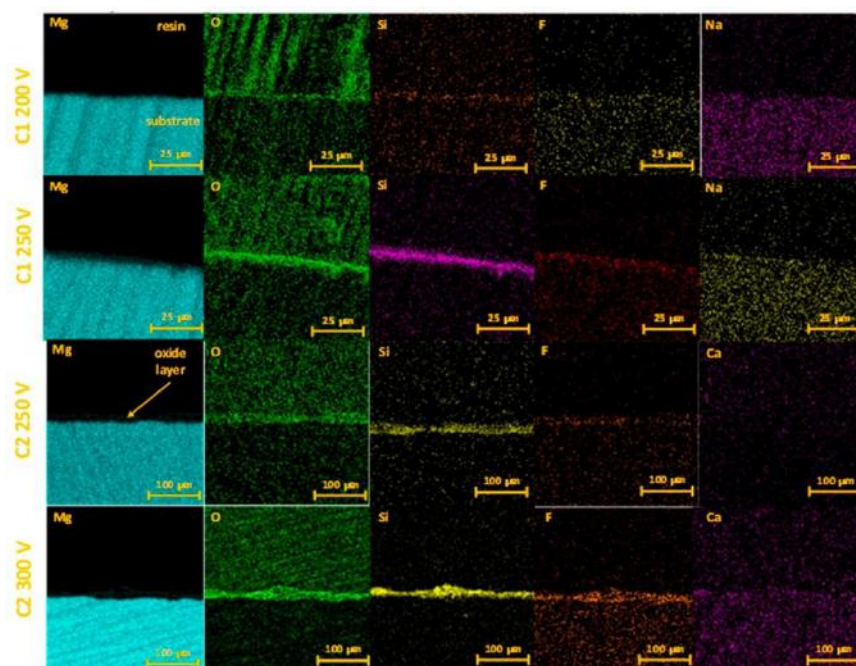


Рисунок 3.30 – EDX-картографування поперечного перерізу анодованих Mg зразків

Іншою важливою особливістю покриттів, що містять Ca, було явне підвищення гідрофільності (рис. 3.3.5). Змочуваність є важливою характеристикою поверхні, яка сприяє адгезії клітин у біомедичних застосуваннях. Гідрофільна поверхня підтримує осадження та адгезію білків [109]. Контактний кут поверхні C1 200V і C1 250V 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 250V. Крім того, поверхня C2 300V мала найнижчий контактний кут ( $0^\circ$ ) і була високо гідрофільною. Виявилось, що збільшення прикладеної напруги призвело до зменшення кута контакту. Згідно з цими даними, шорсткість поверхні корелювала зі значеннями контактного кута для покриттів типу C2. При менших кутах контакту було спрощено вищі значення текстури поверхні (Рисунок 3.31).

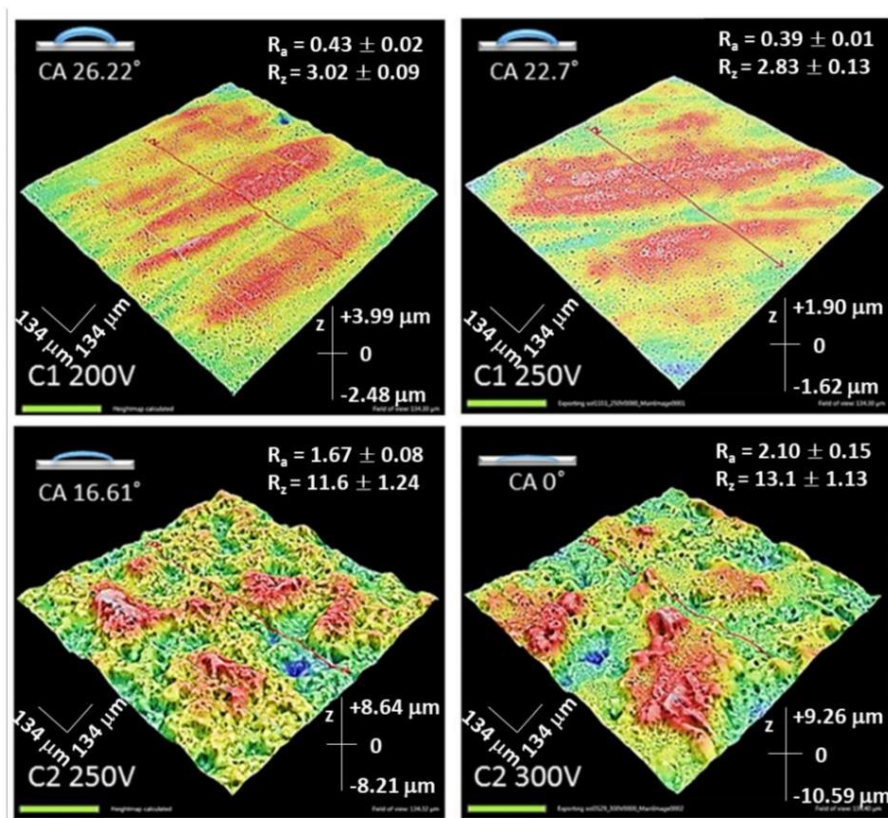


Рисунок 3.31 – 3D топографічні карти зразків анодованого магнію, а також шорсткість поверхні та параметри СА покриттів

Отримані спектри ФЛ зображено на рисунку 3.32. 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 [114–119]. Спостережуване випромінювання можна пояснити структурними дефектами [114]. Піки ФЛ, що спостерігаються в діапазоні 380–520 нм, пов'язані з F/F+-центрами (іони/атоми луку) та вакансіями кисню [114–119]. Спостережуване випромінювання ФЛ у діапазоні 600–800 нм пояснюється дефектами структури поверхні, такими як кисневі вакансії та проміжні вузли [114–118].

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

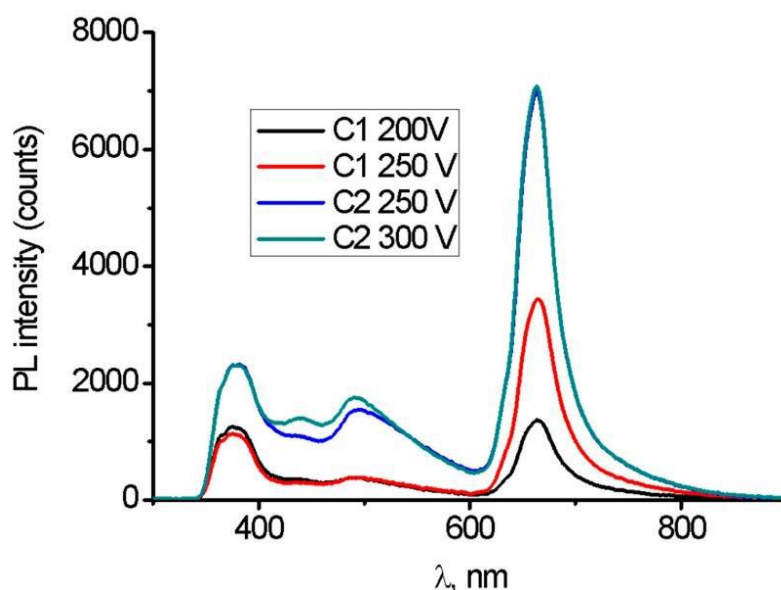


Рисунок 3.32 – Фотолюмінесценція анодованих Mg зразків

Проведено кореляцію даних ФЛ з результатами SEM та EDX. Показано, що  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  є важливою сполукою для окислення та модифікації поверхні Mg імплантатів, оброблених методом ПЕО. Додавання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  призводило 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.

### 3.7.2 Довгострокове занурення в SBF

Тривале занурення в розчин SBF характеризує стабільність поверхні та її здатність викликати осадження відкладень фосфату кальцію. Результати втрати ваги голого сплаву Mg та зразків із модифікованим ПЕО C1-C2 показані на рисунку 3.33.

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) [120]).

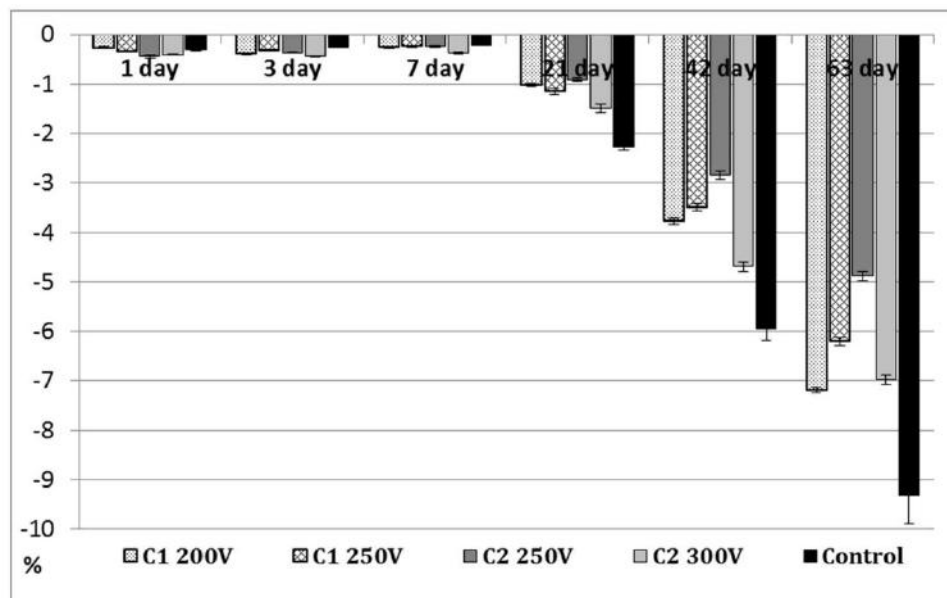
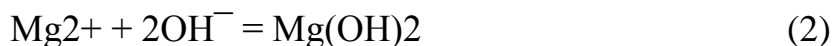


Рисунок 3.33 – Втрата ваги анодованих Mg зразків

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 [55]:



Через 21 день випробування зануренням було виявлено чітке збільшення деградації зразків. Однак зразки, оброблені ПЕО, показали менші втрати ваги порівняно з контрольним зразком Mg, але зазнали видимого процесу руйнування. Це тісно пов'язане з деградацією в прихованих закритих порах, які поступово

піддаються впливу електроліту протягом часу занурення. MgO, основний компонент ПЕО покриття, не є стабільним у водному середовищі [120] і сприяє реакції, показаній у рівнянні (3), що йде у несприятливому напрямку. Покриття C2 250V продемонструвало найкращу здатність до процесу деградації порівняно з іншими ПЕО покриттями. В результаті занурення на 42 і 63 дні C2 250V 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. Висока корозійна стійкість і знижена деградація в змодельованій рідині організму було доведено також у випадку сплавів Mg, анодованих в умовах ПЕО [65].

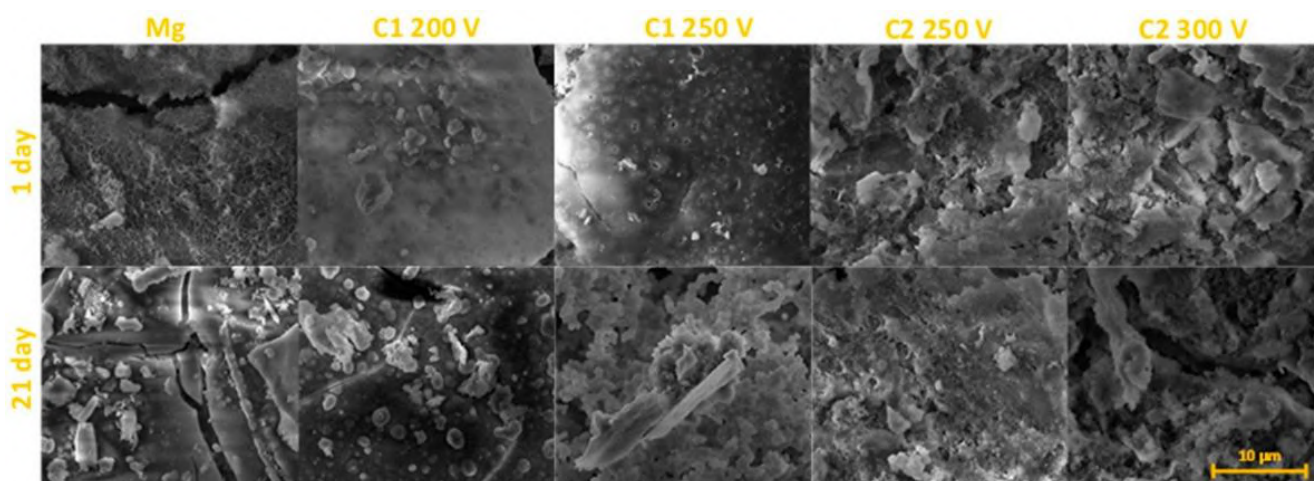


Рисунок 3.34 – Зображення SEM відібраних зразків магнію після занурення в розчин SBF

Оскільки фосфат кальцію з розчину SBF може утворюватись як на покритті, так і на поверхні металу одночасно [123], припускають, що ці осади є сполуками Ca-P. Поверхня поступово ущільнюється від осадів і скупчення продуктів корозії. Аналіз EDS, проведений через різні проміжки часу під час занурювального тесту, підтвердив осадження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{HPO}_4^{2-}$  як на поверхні контрольного зразка, так і на отриманих покриттях. Покриття з оксиду ПЕО, створені електролітом типу C2, демонстрували вище відношення Ca/P в порівнянні з поверхнями, отриманими з використанням електроліту типу C1. Найбільші відмінності були помітні протягом

першого тижня тесту занурення. 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 300В було найвищим і досягло 1,19. Концентрація Si і F поступово зменшувалася з часом занурення в SBF, що відбивалося на повільному процесі деградації покриття (дані не наведені).

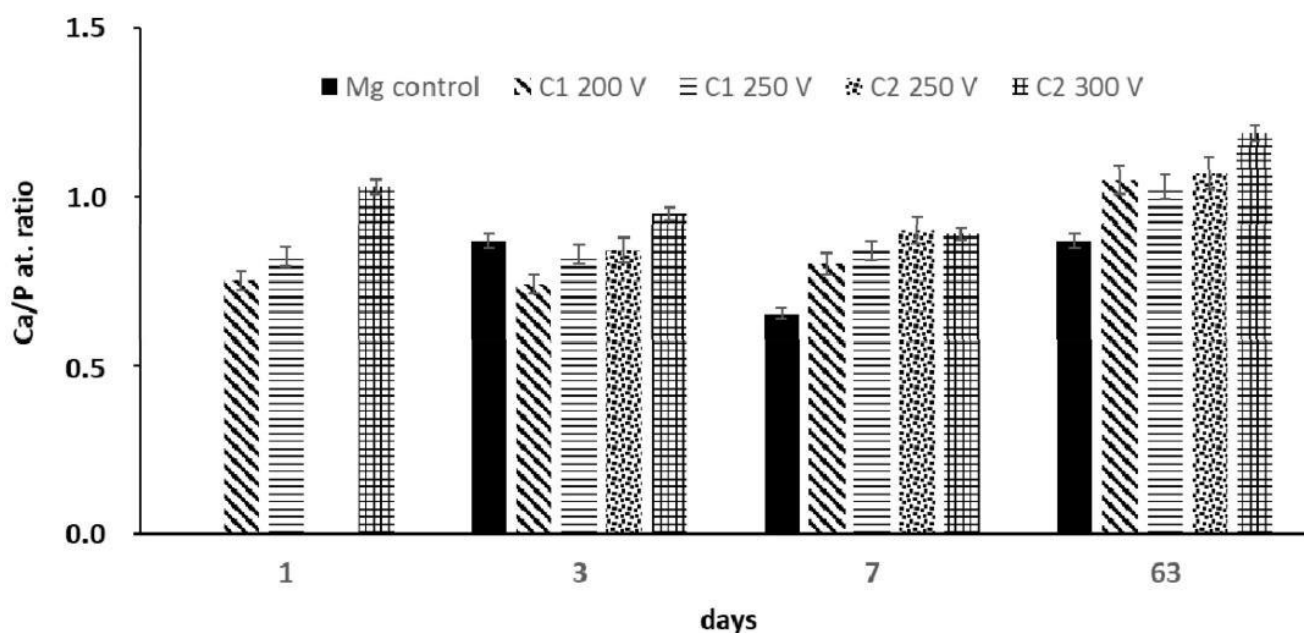


Рисунок 3.35 – Атомне співвідношення Ca/P на анодованих зразках Mg під час тривалого випробування зануренням

### 3.7.3 Життєздатність клітин

Клітини U2OS не приєдналися до контрольних зразків протягом 24 годин після посіву. Раніше повідомлялося, що продукти корозії, присутні на поверхні зразка, можуть значно змінити рН середовища та впливати на метаболізм клітин [62]. Минали дні, значення резазурину значно зменшувалося, що продемонструвало токсичний вплив продуктів корозії на життєздатність клітин. Усі модифіковані ПЕО зразки продемонстрували адекватну адгезію клітин із

заспокійливим зниженням з  $45,6 \pm 6,6$  до  $53,2 \pm 8,1$  % без істотної різниці між групами (Рисунок 3.36).

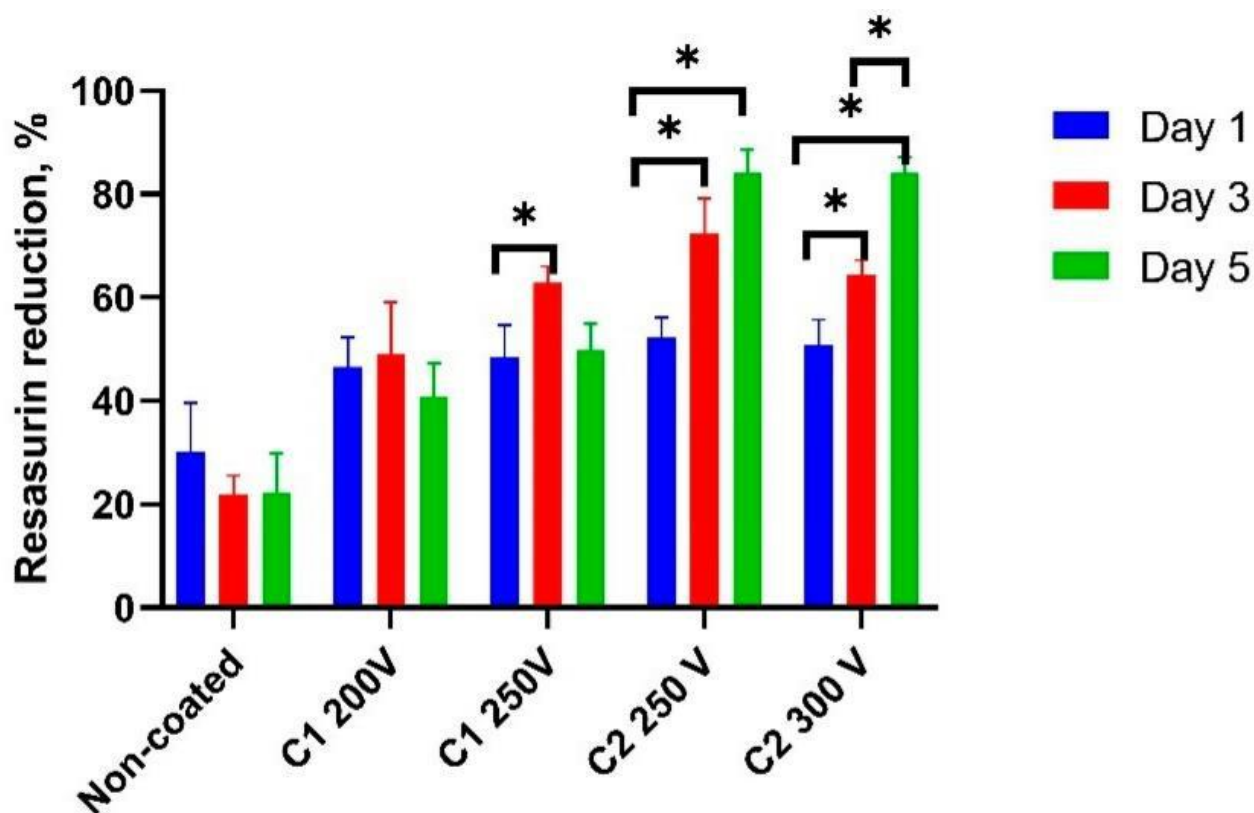


Рисунок 3.36 – Життєздатність клітин U2OS протягом 5 днів спільного культивування над зразками Mg (без покриття та обробленими ПЕО). зірочки вказують на достовірну різницю (\*  $p < 0,05$ )

На третій і п'ятий дні спостерігалася значна клітинна проліферація в покриттях типу C2 до  $83,8 \pm 7,4\%$ . На відміну від покриттів типу C2, клітини як на C1 200V, так і на C1 250V дещо проліферували на третій день, а значення резазурину значно зменшувалося до п'ятого дня. Швидкість проліферації на цьому терміні все ще перевищувала значення для контрольних зразків, але була значно нижча, ніж у покриттях типу C2. Аналіз SEM продемонстрував, що режими ПЕО типу C2 забезпечують більш товсте оксидне покриття, яке може захистити Mg субстрат від корозії. Деякі попередні дослідження довели, що повне точне покриття може покращити біосумісність і залежить від товщини покриття та його



стабільності [123-125]. Швидка корозія покриття або структурні дефекти призводять до порушення прикріплення клітини і призводять до значної токсичності.

### 3.7.4 Антибактеріальні властивості

Антибактеріальну активність зразків оцінювали за допомогою тесту, що залежить від часу, з використанням *S. aureus*. На рисунку 3.37 показано кількість бактеріальних клітин, що прилипли до 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. Таким чином, початкова кількість бактерій становила приблизно  $3,5 \log_{10}$  КУО/мл для зразків, оброблених ПЕО С1 200V і С2 250V. 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 С2 зростання бактерій збільшувалось поступово і швидше. Таким чином, обидва зразки С2 250V і С2 300V продемонстрували збільшення кількості бактерій до  $5,70 \log_{10}$  КУО/мл. Після 6 годин інкубації колонії досягли  $6,00 \log_{10}$  КУО/мл для С1 200 V і  $6,7 \log_{10}$  КУО/мл для зразків С2 250V, але все ще були значно нижчими, ніж для контрольних зразків. В іншому випадку через 24 години лише зразок С1 200V 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 C1 і контрольними в КУО/зразок. Більше того, результати показали більш високе інгібування бактеріальної адгезії для покриттів типу C1, ніж для покриттів типу C2. Можливе пояснення полягає в тому, що характеристики поверхні матеріалу можуть впливати на ріст і зменшення бактерій [126]. Величина шорсткості поверхні впливає на рельєф поверхні і, як наслідок, на ній відбувається накопичення бактерій [127].

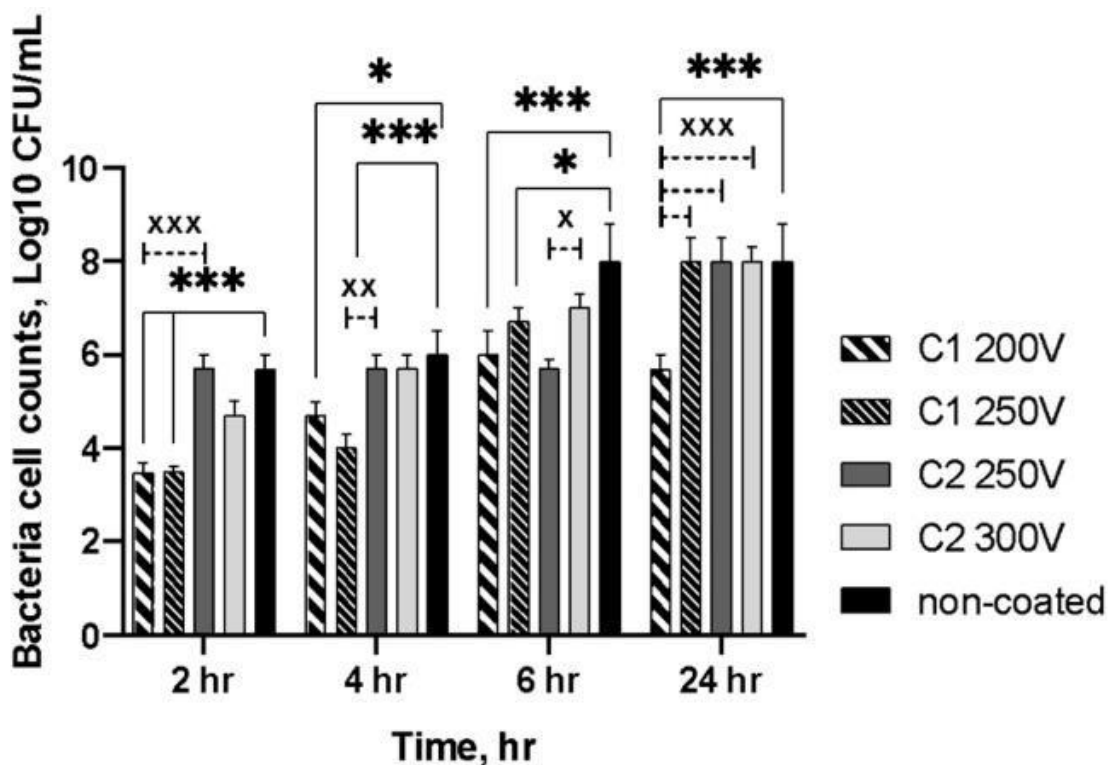


Рисунок 3.37 – Зростання та зменшення *S. aureus* на поверхнях зразків через різні проміжки часу; вказана значна різниця між контрольними та обробленими зразками (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ) і між різними обробленими зразками (x  $p < 0,05$ ; xx  $p < 0,005$ ; xxx  $p < 0,0005$ )

На шорсткість поверхні суттєво впливала обробка ПЕО залежно від складу електролітної ванни. 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 [128]. Крім того, більш гідрофільні покриття типу С2 можуть прискорити адгезію бактерій, забезпечуючи специфічні сайти зв'язування, потенційно через накопичення білків [129].

## ВИСНОВКИ

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

Всі типи експериментальних поверхонь за рахунок новоствореної мезопористою структури, в порівнянні з контрольними зразками характеризуються як більш сприятливі для адгезії та проліферації клітин (остеобластів людини). При цьому, необхідно зазначити, що збагачення електролітів наночастинками срібла та оксиду цинку, дозволяє отримати модифіковану поверхню, що не є цитотоксичною та не перешкоджає подальшій проліферації клітин остеобластів. Нова поверхня повинна бути перспективною для виготовлення медичних імплантатів.

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

в суспензію збудника, що може бути ефективним підходом для запобігання інфекційних ускладнень після імплантації.

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

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

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

Згідно з результатами, силікатне покриття є більш придатним для хірургічного застосування завдяки морфологічним властивостям та низькій швидкості

деградації. Більш того, необхідно провести додаткові дослідження, спрямовані на визначення цитотоксичності та цитосумісності експериментальних поверхонь з різними електролітами.

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

Використання плазмової електрооксидзації для модифікації поверхні зразків з чистого магнію в силікатних та фосфатних електролітах призводить до прогнозованого нами результату. ПЕО-покриття в обох варіантах експериментальних поверхонь представлені у вигляді відносно однорідних оксидних шарів. Мезопористість поверхні проявляється в різних формах, з мінімальним розміром пір для електроліту ванни 1 і набагато більшими порами для електроліту ванни 2. Обидві поверхні ПЕО є високо гідрофільними. ПЕО в електроліті ванни 2 забезпечує кращу корозійну стійкість. Отримані результати вимагають подальшого дослідження ПЕО-покриттів на зразках Mg у дослідженнях *in vitro* та *in vivo*, зокрема для визначення рівня їх цитотоксичності та можливої антибактеріальної дії.

В обох варіантах покриття РЕО представлено у вигляді однорідного шару пористого оксиду. За хімічним складом поверхні зразки відрізняються додатковими елементами за рахунок використання різнорідних сполук електроліту. Поверхнева структура силікатного покриття характеризується рівномірним розподілом пор розміром до 1 мкм і високими змочуваними властивостями. Фосфатні покриття мають пори до 4 мкм з низьким розподілом, гідрофобними властивостями та високим показником шорсткості порівняно з силікатним покриттям. Результати втрати ваги показали хорошу стійкість до корозії в електролітах обох типів. Тест на бактеріальну адгезію показав, що оксидні плівки,

створені за допомогою запропонованих електролітних композицій за допомогою ПЕО, можуть уповільнити початкову адгезію *S. aureus* на поверхні зразків, які можна використовувати для боротьби з утворенням біоплівки.

Згідно з результатами, силікатне покриття є більш прийнятним для хірургічних операцій через морфологічні властивості та низьку швидкість деградації. Крім того, необхідно провести додаткові дослідження, спрямовані на визначення цитотоксичності та цитосумісності експериментальних поверхонь з різними електролітами на прикладі клітин людини.

Плазмове електролітичне окислення чистого Mg у ваннах на основі силікатів забезпечило утворення низькорозчинного пористого оксидного покриття з пористістю, що збільшується в електроліті, що містить  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (тип C2). Було доведено, що  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  є вирішальним компонентом для окислення та модифікації поверхні Mg імплантатів, оброблених методом ПЕО. Додавання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  призводило до більш інтенсивного окислення поверхні Mg і зростання оксидного покриття з більшою активною площею поверхні. Анодування Mg у пропорованих електролітах зменшує режим деградації та значно покращує біосумісність. Електроліт, що містить  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , забезпечив більш придатне середовище для проліферації клітин, але демонстрував відсутність антибактеріальної активності. На закінчення слід зазначити, що ПЕО сплаву Mg у ванні на основі силіката, що містить  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , забезпечило утворення стабільних біосумісних оксидних покриттів, які можна було б використовувати при розробці комерційних імплантатів, що розкладаються.

## ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Radha R. and Sreekanth D. Insight of magnesium alloys and composites for orthopedic implant applications – a review. *Journal of Magnesium and Alloys*. 2017, vol. 5, no. 3, 286–312. DOI: 10.1016/j.jma.2017.08.003
2. Xue-Nan Gu, Yu-Feng Zheng. A review on magnesium alloys as biodegradable materials. *Frontiers of Materials Science in China*. 2010, vol. 4, issue 2, 111–115. DOI: 10.1007/s11706-010-0024-1
3. White, L.; Koo, Y.; Neralla, S.; Sankar, J.; Yun, Y. Enhanced mechanical properties and increased corrosion resistance of a biodegradable magnesium alloy by plasma electrolytic oxidation (PEO). *Mater. Sci. Eng. B Solid. State. Mater. Adv. Technol.* 2016, 208, 39-46.
4. Colombo, A.P.V.; Tanner, A.C.R. The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective. *J. Dent. Res.* 2019, 98 (4), 373-385.
5. Zhang, P.; Zhang, Z.; Li, W. Antibacterial Coating Incorporating Silver Nanoparticles by Microarc Oxidation and Ion Implantation. *J. Nanomater.* 2012, 2013, Article ID 542878.
6. Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomaterialia*. 2010;(6):1680-92.
7. Agarwal S, Curtin J, Duffy B, Jaiswal S. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Materials Science and Engineering*. 2016;68(1):948–9639. doi: 10.1016/j.msec.2016.06.020
8. Fagali NS, Grilloa CA, Puntarulo S, Fernández Lorenzo de Mele MA: Cytotoxicity of corrosion products of degradable Fe-based stents: Relevance of pH and insoluble products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128, 480–488 (2015)
9. Moravej M, Mantovani D: Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities. *Int J Mol Sci*. 12(7), 4250-4270 (2011)



10. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM: Coronary stents: A materials perspective. *Biomaterials* 28, 1689–1710 (2007)
11. Peuster M, Wohlsein P, Brugmann M, Ehlerding M, Seidler K, Fink C, Brauer H, Fischer A, Hausdorf G: A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6–18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart* 86, 563–569 (2001)
12. Purnama A, Hermawan H, Couet J, Mantovani D: Assessing the biocompatibility of degradable metallic materials: state-of-the-art and focus on the potential of genetic regulation. *Acta Biomater* 6, 1800–1807 (2010)
13. Kubásek J, Vojtěch D, Jablonská E, Pospíšilová I, Lipov J, Ruml T: Structure, mechanical characteristics and in vitro degradation, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of novel biodegradable Zn-Mg alloys. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 58, 24-35 (2016)
14. Murni NS, Dambatta MS, Yeap SK, Froemming GR, Hermawan H: Cytotoxicity evaluation of biodegradable Zn-3Mg alloy toward normal human osteoblast cells. *Materials Science and Engineering: C* 49, 560-566 (2015)
15. Sanchez AH, Luthringer BJ, Feyerabend F, Willumeit R: Mg and Mg alloys: How comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review. *Acta Biomater* 13, 16– 31 (2015)
16. Liu C, Xin Y, Tang G, Chu PK: Influence of heat treatment on degradation behavior of bio-degradable die-cast AZ63 magnesium alloy in simulated body fluid. *Mater Sci Eng A* 456, 350–357 (2007),
17. Wang Y, Liu G, Fan Z: A new heat treatment procedure for rheo-diecast AZ91D magnesium alloy. *Scripta Mater* 54, 903–908 (2006)
18. Zeng R, Zhang J, Huang W, Dietzel W, Kainer KU, Blawert C, et al.: Review of studies on corrosion of magnesium alloys. *T Nonferr Metal Soc* 16 (2), 763–771 (2006)
19. Youwen Y, Ping W, Qiyuan W, Hong W, Yong L, Youwen D, Yuanzhuo Z and Cijun S. The enhancement of Mg corrosion resistance by alloying Mn and laser-melting. *Materials*. 2016;9(216):1-10

20. Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3557-63
21. Long Li, Ming Zhang, Ye Li, Jie Zhao, Ling Qin and Yuxiao Lai. Corrosion and biocompatibility improvement of magnesium-based alloys as bone implant materials: a review. *Regenerative Biomaterials*. 2017, vol. 4, issue 2, 129–137. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx004>
22. Dong H. Surface engineering of light alloys: aluminiummagnesium and titanium alloys. Elsevier, 2010.
23. Hai-Lan W, Ying-Liang C, Ling-Ling L, et al. The anodization of ZK60 magnesium alloy in alkaline solution containing silicate and the corrosion properties of the anodized films. 2007; 253: 9387–9394
24. Liu Y, Yang F, Zhang Z, et al. Plasma electrolytic oxidation of AZ91D magnesium alloy in biosafety electrolyte for the surgical implant purpose. *Russ J Electrochem* 2013; 49: 987–993
25. Stojadinovi\_c S, Vasili\_c R, Petkovi\_c M, et al. Characterization of the plasma electrolytic oxidation of titanium in sodium metasilicate. *Appl Surf Sci* 2013; 265: 226–233
26. Zhang RF, Zhang SF, Shen YL, et al. Applied surface science influence of sodium borate concentration on properties of anodic coatings obtained by micro arc oxidation on magnesium alloys. *Appl Surf Sci* 2012; 258: 6602–6610
27. Sreekanth D, Rameshbabu N and Venkateswarlu K. Effect of various additives on morphology and corrosion behavior of ceramic coatings developed on AZ31 magnesium alloy by plasma electrolytic oxidation. *Ceram Int* 2012; 38: 4607–4615.]
28. S. Durdu, M. Usta, A.S. Berkem, Bioactive coatings on Ti6Al4V alloy formed by plasma electrolytic oxidation, *Surf. Coat. Technol.* 301 (2016) 85-93.
29. Pereira BL et al. Niobium treated by Plasma Electrolytic Oxidation with calcium and phosphorus electrolytes. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018; 77:347-352

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

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

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

33. Patel, A.R.; Patra, F.; Shah, N.P.; Shukla, D. Biological control of mycotoxins by probiotic lactic acid bacteria. *Dyn. Dairy Ind. Consum. Demands* 2017, 2015, 2–4.

34. Ehlers, M.R.; Todd, R.M. Genesis and Maintenance of Attentional Biases: The Role of the Locus Coeruleus-Noradrenaline System. *Neural Plast.* 2017, 1, 2–3.

35. Li, B.; Ge, Y.; Wu, Y.; Chen, J.; Xu, H.H.; Yang, M.; Li, M.; Ren, B.; Feng, M.; Weir, M.D.; et al. Anti-Bacterial and Microecosystem-Regulating Effects of Dental Implant Coated with Dimethylaminododecyl Methacrylate. *Molecules* 2017, 22, 2013

36. Velasco-Ortega, E.; Ortiz-García, I.; Jiménez-Guerra, A.; Monsalve-Guil, L.; Muñoz-Guzón, F.; Perez, R.A.; Gil, F.J. Comparison between sandblasted acid-etched and oxidized titanium dental implants: In vivo study. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3267.

37. Michalska, J.; Sowa, M.; Piotrowska, M.; Widziółek, M.; Tylko, G.; Dercz, G.; Socha, R.P.; Osyczka, A.M.; Simka, W. Incorporation of Ca ions into anodic oxide coatings on the Ti-13Nb-13Zr alloy by plasma electrolytic oxidation. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 104, 109957.

38. Polo, T.O.B.; da Silva, W.P.; Momesso, G.A.C.; Lima-Neto, T.J.; Barbosa, S.; Cordeiro, J.M.; Hassumi, J.S.; da Cruz, N.C.; Okamoto, R.; Barão, V.A.; et al. Plasma Electrolytic Oxidation as a Feasible Surface Treatment for Biomedical Applications: An in vivo study. *Sci. Rep.* 2020, 10, 1–11.

39. Yeung, W.K.; Reilly, G.C.; Matthews, A.; Yerokhin, A. In vitro biological response of plasma electrolytically oxidized and plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V alloy. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2013, 101, 939–949.
40. Chung, C.J.; Su, R.T.; Chu, H.J.; Chen, H.T.; Tsou, H.K.; He, J.L. Plasma electrolytic oxidation of titanium and improvement in osseointegration. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2013, 101, 1023–1030.
41. Insua, A.; Monje, A.; Wang, H.L.; Miron, R.J. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2017, 105, 2075–2089.
42. Liaw, K.; Delfini, R.H.; Abrahams, J.J. Dental Implant Complications. *Semin. Ultrasound CT MRI* 2015, 36, 427–433.
43. Kirmanidou, Y.; Sidira, M.; Drosou, M.E.; Bennani, V.; Bakopoulou, A.; Tsouknidas, A.; Michailidis, N.; Michalakis, K. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *BioMed Res. Int.* 2016, 2016, 2908570
44. Al-Radha, A.S.D.; Dymock, D.; Younes, C.; O’Sullivan, D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J. Dent.* 2012, 40, 146–153.
45. Siddiqi, K.S.; Husen, A.; Rao, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnol.* 2018, 16, 14.
46. Escárcega-González, C.E.; Garza-Cervantes, J.A.; Vazquez-Rodríguez, A.; Montelongo-Peralta, L.Z.; Treviño-Gonzalez, M.T.; Castro, E.D.B.; Saucedo-Salazar, E.M.; Morales, R.C.; Soto, D.R.; González, F.T.; et al. In vivo antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using acacia rigidula as a reducing and capping agent. *Int. J. Nanomed.* 2018, 13, 2349–2363.
47. Pokrowiecki, R.; Zareba, T.; Szaraniec, B.; Pałka, K.; Mielczarek, A.; Menaszek, E.; Tyski, S. In vitro studies of nanosilver-doped titanium implants for oral and maxillofacial surgery. *Int. J. Nanomed.* 2017, 12, 4285–4297. [CrossRef]
48. Molteni, C.; Abicht, H.K.; Solioz, M. Killing of bacteria by copper surfaces involves dissolved copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76, 4099–4101.

49. Oleshko, O.; Deineka, V.V.; Husak, Y.; Korniienko, V.; Mishchenko, O.; Holubnycha, V.; Pisarek, M.; Michalska, J.; Kazek-Keçsik, A.; JakóbiK-Kolon, A.; et al. Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy. *Materials* 2019, 12, 3742.
50. Shirazi, H.A.; Ayatollahi, M.R.; Asnafi, A. To reduce the maximum stress and the stress shielding effect around a dental implant–bone interface using radial functionally graded biomaterials. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng.* 2017, 20, 750–759.
51. Yu, S.R.; Zhang, X.P.; He, Z.M.; Liu, Y.H.; Liu, Z.H. Effects of Ce on the short-term biocompatibility of Ti-Fe-Mo-Mn-Nb-Zr alloy for dental materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004, 15, 687–691.
52. Hashim, D.; Cionca, N.; Courvoisier, D.S.; Mombelli, A. A systematic review of the clinical survival of zirconia implants. *Clin. Oral Investig.* 2016, 20, 1403–1417.
53. Zhao, X.L.; Li, L.; Niinomi, M.; Nakai, M.; Zhang, D.L.; Suryanarayana, C. Metastable Zr–Nb alloys for spinal fixation rods with tunable Young’s modulus and low magnetic resonance susceptibility. *Acta Biomater.* 2017, 62, 372–384.
54. Mishchenko, O.; Ovchynnykov, O.; Kapustian, O.; Pogorielov, M. New Zr-Ti-Nb alloy for medical application: Development, chemical and mechanical properties, and biocompatibility. *Materials* 2020, 13, 1306.
55. Hao, Y.; Huang, X.; Zhou, X.; Li, M.; Ren, B.; Peng, X.; Cheng, L. Influence of dental prosthesis and restorative materials interface on oral biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3157.
56. Yongjun Chen, Zhigang Xu, Christopher Smith, Jag Sankar, “Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants,” *Acta Biomater*, 10(11), pp. 4561-4573, Nov. 2014.
57. Y. Husak, O. Solodovnik, M. Pogorielov, O. Oleshko, Y. Kozik, A. Yusupova, O. Mishchenko. Mg alloys in vitro degradation in simulated body fluid and citrate solutions. *Proceedings of the 2017 IEEE 7th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties*, 04NB09, 2017.

58. Barati Darband Gh., Aliofkhazraei M., Hamghalam P., Valizade N., “Plasma electrolytic oxidation of magnesium and its alloys: Mechanism, properties and applications,” *Journal of Magnesium and Alloys*, vol 5. issue 1, pp. 74-132, 2017.

59. Peng Tian and Xuanyong Liu, “Surface modification of biodegradable magnesium and its alloys for biomedical applications,” *Regenerative Biomaterials*, 2(2), pp. 135–151, 2015.

60. Shuang Wu, Yong-Seok Jang, Yu-Kyoung Kim, Seo-Young Kim, Seung-O Ko and Min-Ho Lee, “Surface Modification of Pure Magnesium Mesh for Guided Bone Regeneration: In Vivo Evaluation of Rat Calvarial Defect,” *Materials*, vol 12, p.2684, 2019.

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

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

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

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

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

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

67. Y. Chen, Z. Xu, C. Smith, J. Sankar, “Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants,” *Acta Biomater*, vol. 10(11), pp. 4561–4573, Nov. 2014.

68. Y. Husak, O. Solodovnik, M. Pogorielov, O. Oleshko, Y. Kozik, A. Yusupova, O. Mishchenko, “Mg alloys in vitro degradation in simulated body fluid and citrate solutions.” *Proceedings of the 2017 IEEE 7th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties*, 04NB09, 2017.

69. Peng Tian and Xuanyong Liu, “Regenerative Surface modification of biodegradable magnesium and its alloys for biomedical applications,” *Biomaterials*, pp. 135–151, 2015.

70. S. Thomas, N.V. Medhekar, G.S. Frankel, N. Birbilis, “Corrosion mechanism and hydrogen evolution on Mg,” *Curr. Opin. Solid St. M.*, vol. 19, pp. 85–94, 2015.

71. N.-E. L. Saris, E. Mervaala, H. Karppanen et al., “Magnesium. An update on physiological, clinical, and analytical aspects,” *Clin Chim Acta*, vol. 294, pp. 1–26, 2000.

72. O. Jung, D. Porchetta, M.-L. Schroeder, M. Klein, N. Wegner, F. Walther, F. Feyerabend, M. Barbeck, and A. Kopp. “In Vivo Simulation of Magnesium Degradability Using a New Fluid Dynamic Bench Testing Approach,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, p. 4859, 2019.

73. P. Tian and X. Liu, “Surface modification of biodegradable magnesium and its alloys for biomedical applications,” *Regenerative Biomaterials*, vol. 2(2), pp. 135–151, 2015.

74. A. Chaya, S. Yoshizawa, K. Verdelis, N. Myers, B. J. Costello, D. T. Chou, S. Pal, S. Maiti, P. N. Kumta, C. Sfeir, “In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing,” *Acta Biomater*, vol. 18, pp. 262–269, 2015.

75. K. Glenske, P. Donkiewicz, A. Kowitsch, N. Milosevic-Oljaca, P. Rider, S. Rofall, J. Franke, O. Jung, R. Smeets, R. Schnettler, et al., “Applications of metals for bone regeneration,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, p. 826, 2018.

76. V. Dehnavi, W. J. Binns, J. J. Noël, D. W. Shoesmith, B. L. Lua, “Growth behaviour of low-energy plasma electrolytic oxidation coatings on a magnesium alloy,” *J. Magnes. Alloy.*, pp. 1–9, 2018.

77. X. Tu, C. Miao, Y. Zhang, Y. Xu, and J. Li, "Materials (Basel) Plasma Electrolytic Oxidation of Magnesium Alloy AZ31B in Electrolyte Containing Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>," *Sol as Additives*, vol. 11(9), p. 1618, Sep 2018.

78. G. B. Darband, M. Aliofkhazraei, P. Hamghalam, N. Valizade, "Plasma electrolytic oxidation of magnesium and its alloys: Mechanism, properties and applications," *J. Magnes. Alloy.*, vol. 5, no. 1, pp. 74–132, 2017.

79. S. Wu, Y.-S. Jang, Y.-K. Kim, S.-Y. Kim, S.-O. Ko, and M.-H. Lee, "Surface Modification of Pure Magnesium Mesh for Guided Bone Regeneration: In Vivo Evaluation of Rat Calvarial Defect," *Mater.*, vol. 12, p. 2684, 2019.

80. N. Nassif and I. Ghayad, "Corrosion Protection and Surface Treatment of Magnesium Alloys Used for Orthopedic Applications," *Biomaterials: Advances and Applications*, vol. 2013, p. 10, 2013.

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

82. I. Bružauskaitė, D. Bironaitė, E. Bagdonas, and E. Bernotienė, "Scaffolds and Cells for Tissue Regeneration: Different Scaffold Pore Sizes—Different Cell Effects," *Cytotechnology*, vol. 68(3), pp. 355–369, 2016.

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

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

85. Y. Wang, M. Chen, and Y. Zhao, "Preparation and Corrosion Resistance of Microarc Oxidation-Coated Biomedical Mg–Zn–Ca Alloy in the Silicon–Phosphorus-Mixed Electrolyte," *ACS Omega*, vol. 17, no. 4(25), pp. 20937–20947, Dec. 2019.



86. Li, J.; Jansen, J.A.; Walboomers, X.F.; van den Beucken, J.J. Mechanical Aspects of Dental Implants and Osseointegration: A Narrative Review. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020, 103, 103574. [CrossRef] [PubMed]

87. Abdel-Hady Gepreel, M.; Niinomi, M. Biocompatibility of Ti-alloys for Long-term Implantation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2013, 20, 407–415. [CrossRef] [PubMed]

88. Fage, S.W.; Muris, J.; Jakobsen, S.S.; Thyssen, J.P. Titanium: A Review on Exposure, Release, Penetration, Allergy, Epidemiology, and Clinical Reactivity. *Contact Dermatitis* 2016, 74, 323–345. [CrossRef] [PubMed]

89. Wang, J.L.; Xu, J.K.; Hopkins, C.; Chow, D.H.K.; Qin, L. Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics—A General Review and Perspectives. *Adv. Sci.* 2020, 7, 1902443. [CrossRef]

90. Kamrani, S.; Fleck, C. Biodegradable Magnesium Alloys as Temporary Orthopaedic Implants: A Review. *BioMetals* 2019, 32, 185–193. [CrossRef] [PubMed]

91. Heise, S.; Virtanen, S.; Boccaccini, A.R. Tackling Mg alloy Corrosion by Natural Polymer Coatings—A review. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2016, 104, 2628–2641. [CrossRef]

92. Ali, M.; Elsherif, M.; Salih, A.E.; Ul-Hamid, A.; Hussein, M.; Park, S.; Yetisen, A.K.; Butt, H. Surface modification and cytotoxicity of Mg-based bio-alloys: An overview of recent advances. *J. Alloys Compd.* 2020, 825, 154140. [CrossRef]

93. 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* 2016, 68, 948–963. [CrossRef]

94. Pogorielov, M.; Husak, E.; Solodivnik, A.; Zhdanov, S. Magnesium-Based Biodegradable Alloys: Degradation, Application, and Alloying Elements. *Interv. Med. Appl. Sci.* 2017, 9, 27–38. [CrossRef]

95. Wei, S.; Ma, J.X.; Xu, L.; Gu, X.S.; Ma, X.L. Biodegradable Materials for Bone Defect Repair. *Mil. Med. Res.* 2020, 7, 1–25. [CrossRef]

96. Höhlinger, M.; Christa, D.; Zimmermann, V.; Heise, S.; Boccaccini, A.R.; Virtanen, S. Influence of Proteins on The Corrosion Behavior of a Chitosan-Bioactive Glass Coated Magnesium Alloy. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 100, 706–714. [CrossRef]

97. Gray-Munro, J.E.; Seguin, C.; Strong, M. Influence of Surface Modification on the In Vitro Corrosion Rate of Magnesium Alloy AZ31. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2009, 91, 221–230. [CrossRef] [PubMed]
98. Wang, Z.L.; Yan, Y.H.; Wan, T.; Yang, H. Poly(L-Lactic Acid)/Hydroxyapatite/Collagen Composite Coatings on AZ31 Magnesium Alloy for Biomedical Application. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 2013, 227, 1094–1103. [CrossRef] [PubMed]
99. Kunjukunju, S.; Roy, A.; Ramanathan, M.; Lee, B.; Candiello, J.E.; Kumta, P.N. A Layer-By-Layer Approach to Natural Polymer-Derived Bioactive Coatings on Magnesium Alloys. *Acta Biomaterialia* 2013, 9, 8690–8703. [CrossRef]
100. Pina, S.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Adv. Mater.* 2015, 27, 1143–1169. [CrossRef] [PubMed]
101. Xiong, P.; Jia, Z.; Zhou, W. Osteogenic and pH Stimuli-Responsive Self-Healing Coating on Biomedical Mg-1Ca Alloy. *Acta Biomaterialia* 2019, 92, 336–350. [CrossRef]
102. Kyrylenko, S.; Warchoł, F.; Oleshko, O. Effects of The Sources of Calcium and Phosphorus on The Structural and Functional Properties of Ceramic Coatings on Titanium Dental Implants Produced by Plasma Electrolytic Oxidation. *Mater. Sci. Eng. C* 2021, 119, 111607. [CrossRef]
103. Echeverry-Rendon, M.; Duque, V.; Quintero, D.; Harmsen, M.C.; Echeverria, F. Novel Coatings Obtained by Plasma Electrolytic Oxidation to Improve the Corrosion Resistance of Magnesium-based Biodegradable Implants. *Surf. Coat. Technol.* 2018, 354, 28–37. [CrossRef]
104. Dong, K.; Song, Y.; Shan, D.; Han, E.H. Corrosion Behavior of a Self-Sealing Pore Micro-Arc Oxidation Film on AM60 Magnesium Alloy. *Corros. Sci.* 2015, 100, 275–283. [CrossRef]
105. Peng, F.; Wang, D.; Tian, Y.; Cao, H.; Qiao, Y.; Liu, X. Sealing the Pores of PEO Coating with Mg-Al Layered Double Hydroxide: Enhanced Corrosion Resistance, Cytocompatibility and Drug Delivery Ability. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1–12. [CrossRef]

106. Rehman, Z.U.; Koo, B.H.; Jung, Y.G.; Lee, J.H.; Choi, D. Effect of K<sub>2</sub>ZrF<sub>6</sub> Concentration on The Two-Step PEO Coating Prepared on AZ91 Mg Alloy In Alkaline Silicate Solution. *Materials* 2020, 13, 499. [CrossRef]
107. Bigham, A.; Saudi, A.; Rafienia, M.; Rahmati, S.; Bakhtiyari, H.; Salahshouri, F.; Sattary, M.; Hassanzadeh-Tabrizi, S.A. Electrophoretically Deposited Mesoporous Magnesium Silicate with Ordered Nanopores as An Antibiotic-Loaded Coating On Surface-Modified Titanium. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 96, 765–775. [CrossRef] [PubMed]
108. Wierzbicka, E.; Pillado, B.; Mohedano, M.; Arrabal, R.; Matykina, E. Calcium Doped Flash-PEO Coatings for Corrosion Protection of Mg Alloy. *Metals* 2020, 10, 916. [CrossRef]
109. Wang, C.; Duoling, X.; Shujun, L.; Chen, Y.; Xiliu, Z.; Yi, H.; Dongsheng, Y. Effect of Pore Size on the Physicochemical Properties and Osteogenesis of Ti6Al4V Porous Scaffolds with Bionic Structure. *ACS Omega* 2020, 5, 28684–28692. [CrossRef] [PubMed]
110. Brennan, C.M.; Eichholz, K.F.; Hoey, D.A. The effect of pore size within fibrous scaffolds fabricated using melt electrowriting on human bone marrow stem cell osteogenesis. *Biomed. Mater.* 2019, 14, 065016. [CrossRef] [PubMed]
111. Verhorstert, K.W.J.; Guler, Z.; De Boer, L.; Riool, M.; Roovers, J.P.W.R.; Zaat, S.A.J. In Vitro Bacterial Adhesion and Biofilm Formation on Fully Absorbable Poly-4-hydroxybutyrate and Nonabsorbable Polypropylene Pelvic Floor Implants. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, 12, 53646–53653. [CrossRef]
112. Tian, P.; Liu, X.; Ding, C. In Vitro Degradation Behavior and Cytocompatibility of Biodegradable AZ31 Alloy With PEO/HT Composite Coating. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2015, 128, 44–54. [CrossRef] [PubMed]
113. Santos-Coquillat, A.; Martínez-Campos, E.; Vargas-Alfredo, N.; Arrabal, R.; Rodríguez-Hernández, J.; Matykina, E. Hierarchical Functionalized Polymeric-Ceramic Coatings on Mg-Ca Alloys for Biodegradable Implant Applications. *Macromol. Biosci.* 2019, 19, 1900179. [CrossRef]
114. Aziz, B.K.; Karim, M.A.H. Efficient Catalytic Photodegradation of Methylene Blue From Medical LabWastewater Using MgO Nanoparticles Synthesized by Direct Precipitation Method. *React. Kinet. Mech. Catal.* 2019, 128, 1127–1139. [CrossRef]
115. Janet, C.M.; Viswanathan, B.; Viswanath, R.P.; Varadarajan, T.K. Characterization and Photoluminescence Properties of MgO Microtubes Synthesized From Hydromagnesite Flowers. *J. Phys. Chem. C* 2007, 111, 10267–10272. [CrossRef]
116. El-Shaer, A.; Abdelfatah, M.; Mahmoud, K.R.; Momay, S.; Eraky, M.R. Correlation Between Photoluminescence and Positron Annihilation Lifetime

Spectroscopy to Characterize Defects in Calcined MgO Nanoparticles as A First Step to Explain Antibacterial Activity. *J. Alloys Compd.* 2020, 817, 152799. [CrossRef]

117. Sellaiyan, S.; Uedono, A.; Sivaji, K.; Janet Priscilla, S.; Sivasankari, J.; Selvalakshmi, T. Vacancy Defects and Defect Clusters in Alkali Metal Ion-Doped MgO Nanocrystallites Studied by Positron Annihilation and Photoluminescence Spectroscopy. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 2016, 122, 1–9. [CrossRef]

118. Soma, H.; Uchino, T. Blue and Orange Photoluminescence and Surface Band-Gap Narrowing in Lithium-Doped MgO Microcrystals. *J. Phys. Chem. C.* 2017, 121, 1884–1892. [CrossRef]

119. Li, X. Pressure-induced photoluminescence of MgO. *J. Phys. Condens. Matter.* 2018, 30, 194002. [CrossRef] [PubMed]

120. Song, G.; Atrens, A. Understanding Magnesium Corrosion. A Framework for Improved Alloy Performance. *Adv. Eng. Mater.* 2003, 5, 837–858. [CrossRef]

121. Yang, J.; Lu, X.; Blawert, C.; Di, S.; Zheludkevich, M.L. Microstructure and Corrosion Behavior of Ca/P Coatings Prepared On Magnesium By Plasma Electrolytic Oxidation. *Surf Coatings Technol.* 2017, 319, 359–369. [CrossRef]

122. Sakiewicz, P.; Piotrowski, K.; Bajorek, A.; Młynarek, K.; Babilas, R.; Simka, W. Surface Modification of Biomedical MgCa<sub>4.5</sub> and MgCa<sub>4.5</sub>Gd<sub>0.5</sub> Alloys by Micro-Arc Oxidation. *Materials* 2021, 14, 1360. [CrossRef]

123. Habibovic, P.; Barrère, F.; Van Blitterswijk, C.A.; De Groot, K.; Layrolle, P. Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants. *J. Am. Ceram. Soc.* 2002, 85, 517–522. [CrossRef]

124. Wang, Y.; Ouyang, Y.; Peng, X.; Mao, L.; Yuan, G.; Jiang, Y.; He, Y. Effects of Degradable Mg-Nd-Zn-Zr alloy on Osteoblastic Cell Function. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2012, 25, 597–606. [CrossRef]

125. Niu, J.; Yuan, G.; Liao, Y.; Mao, L.; Zhang, J.; Wang, Y.; Ding, W. Enhanced Biocorrosion Resistance and Biocompatibility of Degradable Mg-Nd-Zn-Zr Alloy by Brushite Coating. *Mater. Sci. Eng. C* 2013, 33, 4833–4841. [CrossRef] [PubMed]

126. Yu, P.; Wang, C.; Zhou, J.J.; Xue, J.; Li, W. Influence of Surface Properties on Adhesion Forces and Attachment of *Streptococcus Mutans* to Zirconia In Vitro. *Biomed. Res. Int.* 2016, 2016. [CrossRef] [PubMed]

127. Sousa, C.; Teixeira, P.; Oliveira, R. Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus Epidermidis* to Acrylic and Silicone. *Int. J. Biomater.* 2009, 2009, 1–9. [CrossRef]

128. Katsikogianni, M.; Missirlis, Y.F.; Harris, L.; Douglas, J. Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterials and of Techniques Used In Estimating Bacteria-Material Interactions. *Eur. Cells Mater.* 2004, 8, 37–57. [CrossRef] [PubMed]

129. Ge, J.; Catt, D.M.; Gregory, R.L. Streptococcus Mutons Surface A-Enolase Binds Salivary Mucin MG2 and Human Plasminogen. *Infect. Immun.* 2004, 72, 6748–6752. [CrossRef] [PubMed]